



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I667258 B

(45)公告日：中華民國 108 (2019) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：102124926

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 07 月 11 日

(51)Int. Cl. : C07K19/00 (2006.01)

A61K38/36 (2006.01)

A61P7/04 (2006.01)

(30)優先權：2012/07/11 美國

61/670,401

2013/02/01 美國

61/759,819

2013/03/15 美國

61/801,504

2013/03/15 美國

61/801,544

2013/05/24 美國

61/827,158

2013/06/28 美國

61/840,811

(71)申請人：美商生物化學醫療公司(美國) BIOVERATIV THERAPEUTICS INC. (US)
美國(72)發明人：喬巴拉 艾可塔 CHHABRA, EKTA SETH (IN)；劉 彤瑤 LIU, TONGYAO
(US)；章佩雲 CHANG, PEI YUN (TW)；彼得斯 羅伯特 PETERS, ROBERT T.
(US)；庫門 約翰 KULMAN, JOHN (US)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

CN 102348715A

WO 2011/060242A2

WO 2011/069164A2

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：49 項 圖式數：16 共 697 頁

(54)名稱

因子V I I I與XTEN及范威爾邦德(VON WILLEBRAND)因子蛋白質之複合物及其用途

FACTOR VIII COMPLEX WITH XTEN AND VON WILLEBRAND FACTOR PROTEIN, AND USES THEREOF

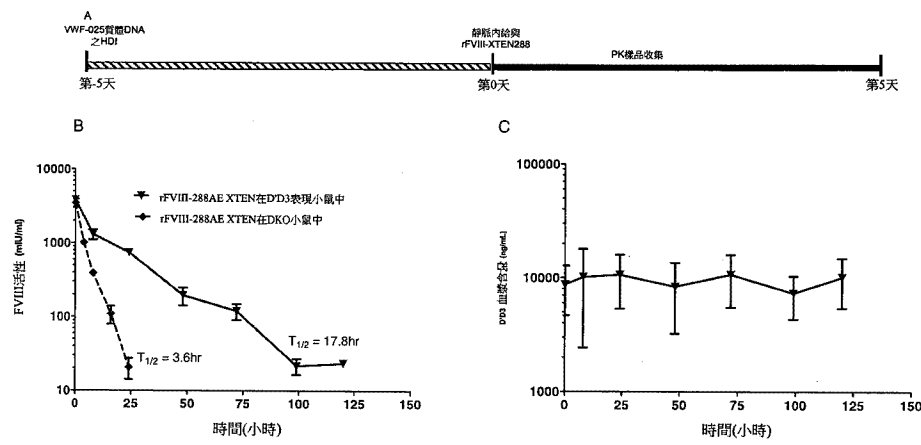
(57)摘要

本發明提供一種嵌合蛋白，其包含含有 VWF 之 D'域及 D3 域之 VWF 蛋白質、一或多個 XTEN 序列、及 FVIII 蛋白質，其中該 VWF 片段、該 XTEN 序列或該 FVIII 蛋白質係彼此連接或締合。該嵌合蛋白可進一步包含一或多個 Ig 恆定區或其部分(例如 Fc 區)。包含本發明之 VWF 片段之多肽鏈與包含連接於 XTEN 序列之 FVIII 蛋白質之多肽鏈結合或締合，且包含該 VWF 片段之該多肽鏈可阻止或抑制內源性 VWF 結合連接於該 XTEN 序列之該 FVIII 蛋白質。藉由阻止或抑制內源性 VWF 結合 FVIII 蛋白質，VWF 片段可誘導包含 FVIII 蛋白質之嵌合蛋白之半衰期延長，其中該結合為 FVIII 之半衰期限制因素。本發明亦包括核苷酸、載體、宿主細胞、使用 VWF 片段或嵌合蛋白之方法。

The present invention provides a chimeric protein comprising a VWF protein comprising the D' domain and D3 domain of VWF, one or more XTEN sequence, and a FVIII protein, wherein the VWF fragment, the XTEN sequence, or the FVIII protein are linked to or associated with each other. The chimeric protein

can further comprise one or more Ig constant region or a portion thereof (e.g., an Fc region). A polypeptide chain comprising a VWF fragment of the invention binds to or is associated with a polypeptide chain comprising a FVIII protein linked to an XTEN sequence and the polypeptide chain comprising the VWF fragment can prevent or inhibit binding of endogenous VWF to the FVIII protein linked to the XTEN sequence. By preventing or inhibiting binding of endogenous VWF to the FVIII protein, which is a half-life limiting factor for FVIII, the VWF fragment can induce extension of half-life of the chimeric protein comprising a FVIII protein. The invention also includes nucleotides, vectors, host cells, methods of using the VWF fragment, or the chimeric proteins.

指定代表圖：



由VWF D'D3片段引起之FVIII-XTEN半衰期再延長5倍

圖 2

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

因子 VIII 與 XTEN 及范威爾邦德(VON

WILLEBRAND)因子蛋白質之複合物及其用途

Factor VIII complex with XTEN and von Willebrand factor protein, and
uses thereof

【技術領域】

[0001] 本發明係關於一種嵌合蛋白及其用途，特定言之，係關於一種因子 VIII 與 XTEN 及范威爾邦德(VON WILLEBRAND)因子蛋白質之複合物及其用於止血病症之治療劑之用途。

【先前技術】

[0002] A 型血友病(Haemophilia A)為一種由編碼凝血因子 VIII(FVIII)之基因中之缺陷引起的流血病症且影響萬分之一至二之出生男嬰。Graw 等人，*Nat. Rev. Genet.* 6(6): 488-501 (2005)。受 A 型血友病影響之患者可藉由輸注純化或重組產生之 FVIII 加以治療。然而，已知所有市售 FVIII 產品之半衰期皆為約 8-12 小時，從而需要頻繁地向患者進行靜脈內投藥。參見 Weiner M.A.及 Cairo, M.S., *Pediatric Hematology Secrets*, Lee, M.T., 12. Disorders of Coagulation, Elsevier Health Sciences, 2001；Lillicrap, D.

Thromb. Res. 122 增刊 4:S2-8 (2008)。此外，已嘗試許多方法來延長 FVIII 半衰期。舉例而言，正在開發中的用以延長凝結因子之半衰期之方法包括聚乙二醇化、醣聚乙二醇化及與白蛋白結合。參見 Dumont 等人, Blood. 119(13): 3024-3030(2012 年 1 月 13 日線上發表)。然而，無論所用蛋白質工程改造如何，當前正在開發中之長效 FVIII 產品據報導具有有限半衰期-在臨床前動物模型中僅為約 1.5 至 2 小時。參見同上。已在人類中證明一致結果，例如相較於 ADVATE®，據報導 rFVIIIFc 在 A 型血友病患者中之半衰期提高至多約 1.7 倍。參見同上。因此，儘管提高較少，但半衰期增加可指示存在其他 T1/2 限制因素。參見 Liu, T.等人, 2007 ISTH 會議，摘要#P-M-035；Henrik, A.等人, 2011 ISTH 會議，摘要#P=MO-181；Liu, T.等人, 2011 ISTH 會議，摘要#P-WE-131。

[0003] 血漿范威爾邦德因子(VWF)之半衰期為約 12 小時(在 9 至 15 小時之範圍內)。

http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/vwd/2_scientificoverview.htm (2011 年 10 月 22 日最後訪問)。VWF 半衰期可受以下許多因素影響：糖基化型態、ADAMTS-13(具有血栓反應素(thrombospondin)基元-13 之去整合素(disintegrin)及金屬蛋白酶)及 VWF 中之各種突變。

[0004] 在血漿中，95-98%之 FVIII 以與全長 VWF 形成之緊密非共價複合物形式循環。此複合物之形成對於維持活體內 FVIII 之適當血漿含量而言為重要的。Lenting

等人, *Blood*. 92(11): 3983-96 (1998); Lenting 等人, *J. Thromb. Haemost.* 5(7): 1353-60 (2007)。全長野生型 FVIII 主要以具有重鏈(MW 200 kD)及輕鏈(MW 73 kD)之雜二聚體形式存在。當 FVIII 由於在重鏈中之位置 372 及 740 處及輕鏈中之位置 1689 處發生蛋白水解而活化時, 結合於 FVIII 之 VWF 自活化型 FVIII 移除。活化型 FVIII 連同活化型因子 IX、鈣及磷脂一起(「因子 X 酶複合物(tenase complex)」)誘導因子 X 活化, 從而產生大量凝血酶。凝血酶又接著裂解纖維蛋白原形成可溶性纖維蛋白單體, 該等單體接著自發聚合形成可溶性纖維蛋白聚合物。凝血酶亦活化因子 XIII, 因子 XIII 連同鈣一起用於交聯及穩定化可溶性纖維蛋白聚合物, 從而形成交聯(不溶性)纖維蛋白。活化型 FVIII 藉由蛋白水解自循環快速清除。

[0005] 歸因於頻繁給藥及由給藥時程所致之不便, 仍然需要開發不需要頻繁投藥之 FVIII 產品, 亦即半衰期長於 1.5 至 2 倍半衰期限限制之 FVIII 產品。

【發明內容】

[0006] 本發明係有關一種嵌合蛋白, 其包含(i)包含范威爾邦德因子(VWF)之 D'域及 D3 域之 VWF 片段, (ii)XTEN 序列, 及(iii)FVIII 蛋白質, 其中該 VWF 片段及該 XTEN 序列係由視情況選用之連接子連接且其中該 VWF 片段或該 XTEN 序列與該 FVIII 蛋白質連接或締合。嵌合蛋白可包含含有 VWF 片段、XTEN 序列及 FVIII 蛋白

質之單一多肽鏈；或兩條多肽鏈，第一鏈包含 VWF 片段且第二鏈包含 FVIII 蛋白質，其中 XTEN 多肽連接於 VWF 片段或 FVIII 蛋白質。

[0007] 在一個實施例中，本發明之嵌合蛋白包含含有以下之式：

- (a) V-X-FVIII，
- (b) FVIII-X-V，
- (c) V-X:FVIII，
- (d) X-V:FVIII，
- (e) FVIII:V-X，或
- (f) FVIII:X-V，

其中 V 包含 VWF 片段，

X 包含一或多個 XTEN 序列，且

FVIII 包含 FVIII 蛋白質。連字符(-)可為連接子，例如可裂解連接子。

[0008] 在另一實施例中，嵌合蛋白進一步包含(iv)連接於 VWF 片段、XTEN 序列、FVIII 蛋白質或其任何組合之免疫球蛋白(Ig)恆定區或其部分(亦指示為 F1 或第一 Ig 恆定區或其部分)。在其他實施例中，嵌合蛋白進一步包含另一 Ig 恆定區或其部分(亦指示為 F2 或第二 Ig 恆定區或其部分)。第一 Ig 恆定區或其部分可連接於 VWF 片段或 XTEN 序列，且第二 Ig 恆定區可連接於 FVIII 蛋白質。第一 Ig 恆定區、第二 Ig 恆定區或其部分或兩者可延長 FVIII 蛋白質之半衰期。

[0009] 在一些實施例中，第二 Ig 恆定區或其部分 (F2)藉由連接子(例如可加工連接子)連接於 VWF 片段。在其他實施例中，第二 Ig 恆定區或其部分 (F2)與(第一)Ig 恆定區或其部分 (F1)締合。第二 Ig 恆定區或其部分 (F2)與第一 Ig 恆定區或其部分 (F1)可相同或不同。第二 Ig 恆定區或其部分可藉由共價鍵(例如二硫鍵)與 Ig 恆定區或其部分締合。連接於第一 Ig 恆定區或其部分之 VWF 片段亦可藉由非共價鍵與連接於第二 Fc 區之 FVIII 蛋白質締合。在某些實施例中，FVIII 蛋白質可進一步包含一或多個連接於 FVIII 蛋白質之 C 末端或 N 末端或緊靠 FVIII 蛋白質中之一或多個胺基酸(例如一或多個 XTEN 插入位點)之下游插入的其他 XTEN 序列。在一些實施例中，相較於野生型 FVIII 或無 VWF 片段之 FVIII 蛋白質，FVIII 蛋白質之半衰期延長。

[0010] 在一些實施例中，嵌合蛋白包含含有以下之式：

- (g) V-L2-X-L1-F1: FVIII-L3-F2；
- (h) V-L2-X-L1-F1:F2-L3-FVIII；
- (i) F1-L1-X-L2-V: FVIII-L3-F2；
- (j) F1-L1-X-L2-V:F2-L3-FVIII；
- (k) V-L2-X-L1-F1-L4-FVIII-L3-F2；
- (l) F2-L3-FVIII-L4-F1-L1-X-L2-V；
- (m) FVIII-L3-F2-L4-V-L2-X-L1-F1；及
- (n) F1-L1-X-L2-V-L4-F2-L3-FVIII，

其中 V 包含 VWF 片段，

L1、L2 及 L3 各自包含視情況選用之連接子，例如可裂解連接子，

L4 為視情況選用之連接子，例如可加工連接子，

FVIII 包含 FVIII 蛋白質，

X 包含一或多個 XTEN 序列，

F1 包含視情況選用之第一 Ig 恆定區或其部分，

F2 包含視情況選用之第二 Ig 恆定區或其部分，且

(:)為共價鍵或非共價鍵。

[0011] 本發明亦係有關一種嵌合蛋白，其包含 (i)FVIII 蛋白質，(ii)XTEN 序列，及(iii)Ig 恆定區或其部分，其中該 XTEN 序列由視情況選用之連接子在該 FVIII 蛋白質之 N 末端或 C 末端連接於該 FVIII 蛋白質或緊靠該 FVIII 蛋白質中之一或多個胺基酸(例如一或多個插入位點)之下游插入且其中該 Ig 恆定區或其部分與該 FVIII 蛋白質或該 XTEN 序列連接或締合。在一個實施例中，適用於嵌合蛋白之 Ig 恆定區或其部分包含第一 Fc 區。在另一實施例中，嵌合蛋白進一步包含另一 Ig 恆定區或其部分。適用於本發明之另一 Ig 恆定區或其部分可包含例如藉由共價鍵與第一 Fc 區連接或締合之第二 Fc 區。在其他實施例中，第一 Fc 區藉由連接子(例如可加工連接子)連接於第二 Fc 區。

[0012] 在其他態樣中，嵌合蛋白包含 (i)FVIII 蛋白質，(ii)XTEN 序列，(iii)VWF 片段，及(iv)Ig 恆定區或其

部分，其包含 VWF 之 D'域及 D3 域，其中該 XTEN 序列由視情況選用之連接子在該 FVIII 蛋白質之 N 末端或 C 末端連接於該 FVIII 蛋白質或緊靠該 FVIII 蛋白質中之一或多個胺基酸(例如一或多個插入位點)之下游插入，該 VWF 片段與該 FVIII 蛋白質或該 XTEN 序列連接或締合，且該 Ig 恆定區或其部分連接於該 FVIII 蛋白質、該 XTEN 序列、該 VWF 片段或其任何組合。嵌合蛋白之非限制性實例可包含含有以下之式：

- (1) FVIII(X1)-L1-F1:V-L2-X2-L3-F2；
- (2) FVIII(X1)-L1-F1:F2-L3-X2-L2-V；
- (3) F1-L1-FVIII(X1): V-L2-X2-L3-F2；
- (4) F1-L1-FVIII(X1); F2-L3-X2-L2-V；
- (5) FVIII(X1)-L1-F1-L4-V-L2-X2-L3-F2；
- (6) FVIII(X1)-L1-F1-L4-F2-L3-X2-L2-V；
- (7) F1-L1-FVIII(X1)-L4-V-L2-X2-L3-F2，或
- (8) F1-L1-FVIII(X1)-L4-F2-L3-X2-L2-V，

其中 FVIII(X1)包含 FVIII 蛋白質及一或多個 XTEN 序列，其中 XTEN 序列中之一或多者連接於 FVIII 蛋白質之 N 末端或 C 末端或緊靠 FVIII 蛋白質中之一或多個胺基酸(例如一或多個 XTEN 插入位點)之下游插入；

L1、L2 或 L3 各自包含視情況選用之連接子，例如可裂解連接子；

L4 為連接子，可加工連接子；

X2 包含一或多個 XTEN 序列；

F1 包含 Ig 恆定區或其部分；

F2 包含視情況選用之另一 Ig 恆定區或其部分，且

V 包含 VWF 片段；

(-)爲肽鍵或一或多個胺基酸；且

(:)包含共價鍵或非共價鍵。

[0013] 本發明之一個態樣爲適用於嵌合蛋白之 VWF 片段不結合 VWF 清除受體，該 VWF 清除受體阻止或抑制 FVIII 蛋白質與內源性 VWF 之相互作用。因此，包含 VWF 片段之嵌合蛋白不經由 VWF 清除路徑清除。本發明之另一態樣爲 VWF 片段能夠保護 FVIII 蛋白質免遭一或多種蛋白酶裂解、保護 FVIII 蛋白質免遭活化、穩定 FVIII 蛋白質之重鏈及/或輕鏈、或防止 FVIII 蛋白質由一或多種清除受體(scavenger receptor)清除。

[0014] 由於 VWF 片段能夠阻止或抑制 FVIII 蛋白質與內源性 VWF 之間的相互作用，所以相較於無 VWF 片段之 FVIII 蛋白質，FVIII 蛋白質之半衰期得以延長。在一個實施例中，FVIII 蛋白質之半衰期延長至野生型 FVIII 之半衰期之至少約 1.5 倍、至少約 2 倍、至少約 2.5 倍、至少約 3 倍、至少約 4 倍、至少約 5 倍、至少約 6 倍、至少約 7 倍、至少約 8 倍、至少約 9 倍、至少約 10 倍、至少約 11 倍或至少約 12 倍長。在另一實施例中，FVIII 蛋白質之半衰期爲至少約 10 小時、至少約 11 小時、至少約 12 小時、至少約 13 小時、至少約 14 小時、至少約 15 小時、至少約 16 小時、至少約 17 小時、至少約 18 小時、

至少約 19 小時、至少約 20 小時、至少約 21 小時、至少約 22 小時、至少約 23 小時、至少約 24 小時、至少約 36 小時、至少約 48 小時、至少約 60 小時、至少約 72 小時、至少約 84 小時、至少約 96 小時或至少約 108 小時。

[0015] 適用於嵌合蛋白之 Ig 恆定區或其部分包含由視情況選用之連接子(例如可裂解連接子)連接於 VWF 片段之第一 Fc 區。嵌合蛋白可進一步包含由視情況選用之連接子連接於 FVIII 蛋白質或 XTEN 序列、Ig 恆定區或其部分、VWF 片段或其任何組合之另一 Ig 恆定區或其部分。在一個實施例中，另一 Ig 恆定區或其部分由視情況選用之連接子連接於 FVIII 蛋白質。另一 Ig 恆定區或其部分可包含第二 Fc 區。

[0016] 適用於本發明中之 Ig 恆定區或其部分與適用於本發明中之另一 Ig 恆定區或其部分相同或不同。

[0017] 在一些態樣中，FVIII 蛋白質在 FVIII 蛋白質之 C 末端或 N 末端連接於 XTEN 序列或緊靠成熟天然人類 FVIII 中之一或多個胺基酸(例如一或多個插入位點)之下游插入或其任何組合。FVIII 蛋白質中之一或多個插入位點可位於 FVIII 蛋白質中一或多個選自由以下組成之群之域內：A1 域、a1 酸性區、A2 域、a2 酸性區、A3 域、B 域、C1 域、C2 域及其任何組合；或位於 FVIII 蛋白質中一或多個選自由以下組成之群之域之間：A1 域與 a1 酸性區、a1 酸性區與 A2 域、A2 域與 a2 酸性區、a2 酸性區與 B 域、B 域與 A3 域、A3 域與 C1 域、C1 域與 C2 域及

其任何組合；或位於 FVIII 蛋白質中選自由以下組成之群之兩個域之間：A1 域與 a1 酸性區、a1 酸性區與 A2 域、A2 域與 a2 酸性區、a2 酸性區與 B 域、B 域與 A3 域、A3 域與 C1 域、C1 域與 C2 域及其任何組合。

[0018] 在一個實施例中，一或多個插入位點位於緊靠成熟天然人類 FVIII(例如 SEQ ID NO: 4[成熟 FVIII 序列-全長])中之一或多個選自由表 7、8、9、10、11 中之胺基酸殘基或其任何組合組成之群之胺基酸的下游。

[0019] 在另一實施例中，一或多個插入位點位於成熟天然人類 FVIII 之一或多個容許環中。在其他實施例中，一或多個插入位點位於成熟天然人類 FVIII 之 a3 區中。舉例而言，XTEN 序列可緊靠對應於 SEQ ID NO: 4(全長成熟 FVIII)之胺基酸 1656 之下游插入。在其他實施例中，FVIII 蛋白質連接於至少兩個 XTEN 序列，第一 XTEN 序列插入在 a3 區內，且第二 XTEN 序列插入在 FVIII 蛋白質中之容許環(例如 A1-1、A1-2、A2-1、A2-2、A3-1 或 A3-2)內。在其他實施例中，FVIII 蛋白質連接於至少三個 XTEN 序列，第一 XTEN 序列插入在 a3 區內且第二 XTEN 序列及第三 XTEN 序列插入在 FVIII 蛋白質中之一或兩個容許環(例如 A1-1、A1-2、A2-1、A2-2、A3-1 或 A3-2)內。

[0020] 在某些實施例中，用於一或多個 XTEN 插入之一或多個插入位點緊靠一或多個選自由以下組成之群之胺基酸的下游：

- (1)胺基酸 3， (2)胺基酸 18， (3)胺基酸 22，
 (4)胺基酸 26， (5)胺基酸 32， (6)胺基酸 40，
 (7)胺基酸 60， (8)胺基酸 65， (9)胺基酸 81，
 (10)胺基酸 116， (11)胺基酸 119， (12)胺基酸 130，
 (13)胺基酸 188， (14)胺基酸 211， (15)胺基酸 216，
 (16)胺基酸 220， (17)胺基酸 224， (18)胺基酸 230，
 (19)胺基酸 333， (20)胺基酸 336， (21)胺基酸 339，
 (22)胺基酸 375， (23)胺基酸 399， (24)胺基酸 403，
 (25)胺基酸 409， (26)胺基酸 416， (26)胺基酸 442，
 (28)胺基酸 487， (29)胺基酸 490， (30)胺基酸 494，
 (31)胺基酸 500， (32)胺基酸 518， (33)胺基酸 599，
 (34)胺基酸 603， (35)胺基酸 713， (36)胺基酸 745，
 (37)胺基酸 1656， (38)胺基酸 1711， (39)胺基酸 1720，
 (40)胺基酸 1725， (41)胺基酸 1749， (42)胺基酸 1796，
 (43)胺基酸 1802， (44)胺基酸 1827， (45)胺基酸 1861，
 (46)胺基酸 1896， (47)胺基酸 1900， (48)胺基酸 1904，
 (49)胺基酸 1905， (50)胺基酸 1910， (51)胺基酸 1937，
 (52)胺基酸 2019， (53)胺基酸 2068， (54)胺基酸 2111，
 (55)胺基酸 2120， (56)胺基酸 2171， (57)胺基酸 2188，
 (58)胺基酸 2227， (59)胺基酸 2277， 及
 (60)其兩種或兩種以上組合。

[0021] 在一些實施例中，插入一個 XTEN。在一些實施例中，插入兩個 XTEN。在一些實施例中，插入 3 個

XTEN。

[0022] 在一特定實例中，第一 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 26 之下游插入，且第二 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4(全長成熟 FVIII)之胺基酸 1720 之下游插入。在另一實例中，第一 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 403 之下游插入，且第二 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1720 之下游插入。在一些實例中，第一 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1656 之下游插入，且第二 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1720 之下游插入。在其他實例中，第一 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 26 之下游插入，第二 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1656 之下游插入，且第三 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1720 之下游插入。在其他實施例中，第一 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 403 之下游插入，第二 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1656 之下游插入，且第三 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1720 之下游插入。在其他實施例中，第一 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 403 與 404 之間，第二 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1656 之下游插入，且第三 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1720 之下游插入。在某些實施例中，第一 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4(全長成熟 FVIII)之胺基酸 26 之下游插入，第二 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1720

之下游插入，且第三 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1900 之下游插入。在一些實施例中，第一 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 26 之下游插入，第二 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 1656 之下游插入，第三 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1720 之下游插入，且第四 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1900 之下游插入。在另一實例中，XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 745 之下游插入。在另一實例中，第一 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1656 之下游插入且第二 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1900 之下游插入。在一些實施例中，第一 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 26 之下游插入，第二 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1656 之下游插入，且第三 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1900 之下游插入。在另一實例中，第一 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 403 之下游插入且第二 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 745 之下游插入。在一些實施例中，第一 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 745 之下游插入，且第二 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1900 之下游插入。在一些實施例中，第一 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 18 之下游插入，且第二 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 745 之下游插入。

[0023] 在一些實施例中，FVIII 蛋白質為雙鏈 FVIII

同功異型物。在一些實施例中，FVIII 蛋白質為單鏈 FVIII 同功異型物。

[0024] 在一些實施例中，插入之 XTEN 為 SEQ ID NO: 39(AE288)。在一些實施例中，插入之 XTEN 為 SEQ ID NO: 38 及 37(AG144 及 AE144)。在一些實施例中，插入之 XTEN 為 SEQ ID NO: 37、38 及 37(AE144、AG144 及 AE144)。在一些實施例中，插入之 XTEN 為 SEQ ID NO: 37 及 40(AE144 及 AE288)。

[0025] 適用於本發明中之 FVIII 蛋白質可包含 B 域或其部分，例如 SQ B 域缺失之 FVIII。在一個實施例中，FVIII 蛋白質包含單鏈 FVIII。在另一實施例中，單鏈 FVIII 在對應於全長成熟因子 VIII 多肽(SEQ ID NO: 4)之殘基 1648、殘基 1645 或兩者或 SQ BDD 因子 VIII(SEQ ID NO: 6)之殘基 754、殘基 751 或兩者的殘基處含有至少一個胺基酸取代。在其他實施例中，胺基酸取代為除精胺酸以外之胺基酸。在一些實施例中，FVIII 蛋白質包含 FVIII 之重鏈及 FVIII 之輕鏈，其中該重鏈與該輕鏈藉由金屬鍵彼此締合。

[0026] FVIII 蛋白質可例如藉由含有至少一個使對低密度脂蛋白受體相關蛋白質(LRP)之親和力降低或消除與 LRP 之結合之胺基酸取代而對 LRP 具有低親和力或不結合 LRP。此至少一個胺基酸取代可位於對應於全長成熟 FVIII 之殘基 471、殘基 484、殘基 487、殘基 490、殘基 497、殘基 2092、殘基 2093 或其兩種或兩種以上組合之

殘基處。在一特定實施例中，在殘基 471、484 或 497 處之胺基酸取代為除精胺酸以外之胺基酸，在殘基 487 處之胺基酸取代為除酪胺酸以外之胺基酸，在殘基 2092 處之胺基酸取代為除離胺酸以外之胺基酸，或在殘基 2093 處之胺基酸取代為除苯丙胺酸以外之胺基酸。

[0027] 在一些實施例中，FVIII 蛋白質含有至少一個胺基酸取代，其誘導 FVIII 蛋白質比無該取代之 FVIII 蛋白質更穩定。此等取代可位於 FVIII 蛋白質之 A2 域及 A3 域中，例如在對應於全長成熟 FVIII 之殘基 664、殘基 1826、殘基 662、殘基 1828 或其兩種或兩種以上組合之殘基處。

[0028] 適用於本發明之 VWF 片段包含共同能夠結合 FVIII 之 D'域及 D3 域。VWF 片段可包含與 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 866 至少 90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致之 D'域胺基酸序列及/或與 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 867 至 1240 至少 90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致之 D3 域胺基酸序列。在一個實施例中，VWF 片段為單體。在另一實施例中，VWF 片段包含至少兩個 VWF 片段、至少三個 VWF 片段、至少四個 VWF 片段、至少五個 VWF 片段或至少六個 VWF 片段。VWF 片段可包含與 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 1240 至少 90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致之胺基酸。VWF 片段可基本上由以下組成或由以下組成：SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 1240。在某些實施例中，

VWF 片段可在對應於 SEQ ID NO: 2 之殘基 1099、殘基 1142 或殘基 1099 與 1142 兩者之殘基處含有至少一個胺基酸取代。在其他實施例中，VWF 片段進一步包含 VWF 之 D1 域、D2 域、或 D1 及 D2 域。

[0029] VWF 片段可進一步包含選自由以下組成之群之 VWF 域：A1 域、A2 域、A3 域、D4 域、B1 域、B2 域、B3 域、C1 域、C2 域、CK 域、其一或多個片段及其任何組合。舉例而言，VWF 片段可基本上由以下組成或由以下組成：(1)VWF 之 D'及 D3 域或其片段；(2)VWF 之 D1、D'及 D3 域或其片段；(3)VWF 之 D2、D'及 D3 域或其片段；(4)VWF 之 D1、D2、D'及 D3 域或其片段；或(5)VWF 之 D1、D2、D'、D3 及 A1 域或其片段。在一些實施例中，VWF 片段進一步包含 VWF 或 FVIII 之可操作地連接於 VWF 片段之信號肽。

[0030] 適用於本發明中之一或多個連接子之長度為至少約 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1200、1400、1600、1800 或 2000 個胺基酸。在一些實施例中，一或多個連接子之長度為約 1 至約 2000 個胺基酸。在一個實施例中，一或多個連接子之長度為至少約 20、35、42、48、73、75、95、98、144、288、324、333、576 或 864 個胺基酸。在另一實施例中，一或多個

連接子包含 gly/ser 肽、XTEN 序列或兩者。gly/ser 肽之實例包括(但不限於)式 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ (SEQ ID NO: 139) 或 $\text{S}(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ (SEQ ID NO: 140)，其中 n 為選自由以下組成之群之正整數：1、2、3、4、5、6、7、8、9 及 10。舉例而言， $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ 連接子可為 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ (SEQ ID NO: 63) 或 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_4$ (SEQ ID NO: 138)。在一個實施例中，連接子包含在連接子之 N 末端之至少一個第一裂解位點、在連接子之 C 末端之至少一個第二裂解位點或兩者。在另一實施例中，連接子包含 20 個胺基酸、35 個胺基酸、48 個胺基酸、73 個胺基酸或 95 個胺基酸的凝血酶(thrombin)可裂解連接子。可裂解連接子可包含一或多個由選自由以下組成之群之蛋白酶裂解的裂解位點：因子 XIa、因子 XIIa、胰舒血管素(kallikrein)、因子 VIIa、因子 IXa、因子 Xa、因子 IIa(凝血酶)、彈性蛋白酶(Elastase)-2、粒酶(Granzyme)-B、TEV、腸激酶、蛋白酶 3C、分選酶(Sortase)A、MMP-12、MMP-13、MMP-17 及 MMP-20，例如 TLDPRSFLLRNPNDKYEPFWEDDEEK(SEQ ID NO: 8)。一或多個裂解位點之非限制性實例包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：RRRR(SEQ ID NO: 9)、RKRRKR(SEQ ID NO: 10)、RRRRS(SEQ ID NO: 11)、TQSFNDFTR(SEQ ID NO: 12)、SVSQTSKLTR(SEQ ID NO: 13)、DFLAEGGGVR(SEQ ID NO: 14)、TTKIKPR(SEQ ID NO: 15)、LVPRG(SEQ ID NO: 16)、ALRPR(SEQ ID NO: 17)、KLTRAET(SEQ ID NO: 18)、DFTRVVG(SEQ ID NO: 19)、

TMTRIVGG(SEQ ID NO: 20)、SPFRSTGG(SEQ ID NO: 21)、LQVRIVGG(SEQ ID NO: 22)、PLGRIVGG(SEQ ID NO: 23)、IEGRTVGG(SEQ ID NO: 24)、LTPRSLLV(SEQ ID NO: 25)、LGPVSGVP(SEQ ID NO: 26)、VAGDSLEE(SEQ ID NO: 27)、GPAGLGGA(SEQ ID NO: 28)、GPAGLRGA(SEQ ID NO: 29)、APLGLRLR(SEQ ID NO: 30)、PALPLVAQ(SEQ ID NO: 31)、ENLYFQG(SEQ ID NO: 32)、DDDKIVGG(SEQ ID NO: 33)、LEVLFQGP(SEQ ID NO: 34)及 LPKTGSES(SEQ ID NO: 35)。在一些實施例中，第一裂解位點與第二裂解位點相同或不同。

[0031] 適用於本發明之 XTEN 序列可選自由以下組成之群：AE42(SEQ ID NO: 36)、AE144(SEQ ID NO: 37)、AG144(SEQ ID NO: 38)、AE288(SEQ ID NO: 39)、AG288(SEQ ID NO: 40)、AE576(SEQ ID NO: 41)、AG576(SEQ ID NO: 42)、AE864(SEQ ID NO: 43)、AE72(SEQ ID NO: 127)、AE144_2A(SEQ ID NO: 128)、AE144_3B(SEQ ID NO: 129)、AE144_4A(SEQ ID NO: 130)、AE144_5A(SEQ ID NO: 131)、AE144_6B(SEQ ID NO: 132)、AG144_A(SEQ ID NO: 133)、AG144_B(SEQ ID NO: 134)、AG144_C(SEQ ID NO: 135)、AG144_F(SEQ ID NO: 136)、AE288_2(SEQ ID NO: 137)或 AG864(SEQ ID NO: 44)。在一特定實施例中，XTEN 序列包含 AE288 或 AG288。

[0032] 本發明之嵌合蛋白可經聚唾液酸化、聚乙二醇化或羥乙基澱粉化。

[0033] 本發明亦係有關一種編碼嵌合蛋白之聚核苷酸或一組編碼嵌合蛋白之聚核苷酸。聚核苷酸可進一步包含編碼 PC5 或 PC7 之聚核苷酸鏈。本發明亦係有關一種包含該聚核苷酸或該組聚核苷酸及一或多個可操作地連接於該聚核苷酸或該組聚核苷酸之啓動子的載體。載體可進一步包含含有編碼 PC5 或 PC7 之聚核苷酸鏈之另一載體。本發明亦係有關一種包含該聚核苷酸或該載體之宿主細胞。宿主細胞可為哺乳動物細胞，例如 HEK293 細胞、CHO 細胞或 BHK 細胞。在一些實施例中，宿主細胞之 PC5 或 PC7 裂解 VWF 之 D1D2 域。

[0034] 本發明亦係有關一種包含該嵌合蛋白、該聚核苷酸、該載體或該宿主細胞及醫藥學上可接受之載劑之醫藥組合物。因此，相較於野生型 FVIII 蛋白質，本發明之組合物具有延長之半衰期。FVIII 蛋白質之半衰期延長至野生型 FVIII 之半衰期之至少約 1.5 倍、至少約 2 倍、至少約 2.5 倍、至少約 3 倍、至少約 4 倍、至少約 5 倍、至少約 6 倍、至少約 7 倍、至少約 8 倍、至少約 9 倍、至少約 10 倍、至少約 11 倍或至少約 12 倍長。因子 VIII 之半衰期為至少約 17 小時、至少約 18 小時、至少約 19 小時、至少約 20 小時、至少約 21 小時、至少約 22 小時、至少約 23 小時、至少約 24 小時、至少約 25 小時、至少約 26 小時、至少約 27 小時、至少約 28 小時、至少約 29

小時、至少約 30 小時、至少約 31 小時、至少約 32 小時、至少約 33 小時、至少約 34 小時、至少約 35 小時、至少約 36 小時、至少約 48 小時、至少約 60 小時、至少約 72 小時、至少約 84 小時、至少約 96 小時或至少約 108 小時。

[0035] 本發明之組合物可藉由選自由以下組成之群之途徑投與：局部投與、眼內投與、非經腸投與、鞘內投與、硬膜下投與及經口投與。在一個實施例中，組合物係經由非經腸投藥，例如靜脈內或皮下投藥加以投與。本發明之組合物適用於治療有需要之個體之流血疾病或病狀。流血疾病或病狀係選自由以下組成之群：流血凝血病症、關節積血、肌肉流血、口腔流血、出血、向肌肉中出血、口腔出血、創傷、頭部創傷、胃腸流血、顱內出血、腹內出血、胸內出血、骨折、中樞神經系統流血、咽後間隙中流血、腹膜後間隙中流血、髂腰肌鞘中流血及其任何組合。在一個實施例中，用嵌合蛋白治療之個體預定經歷手術。在另一實施例中，治療為預防性或按需治療。

[0036] 本發明亦係有關一種阻止或抑制 FVIII 蛋白質與內源性 VWF 結合的方法，其包含向有需要之個體添加有效量之嵌合蛋白、聚核苷酸、載體、宿主細胞或組合物，其中 VWF 片段結合 FVIII 蛋白質且因此阻止或抑制內源性 VWF 之結合。本發明更係有關一種延長或增加 FVIII 蛋白質之半衰期之方法，其中該方法包含向有需要之個體添加有效量之嵌合蛋白、聚核苷酸、載體、宿主細

胞或組合物，其中 VWF 片段結合 FVIII 蛋白質且因此延長或增加 FVIII 蛋白質之半衰期。亦提供一種阻止或抑制 FVIII 蛋白質自細胞清除之方法，其中該方法包含向包含 FVIII 蛋白質或編碼該 FVIII 蛋白質之聚核苷酸之細胞添加有效量之嵌合蛋白、聚核苷酸、載體、宿主細胞或組合物，其中具有 VWF 活性之蛋白質結合 FVIII 蛋白質。適用於本發明方法之個體為動物，例如人類，例如罹患 A 型血友病之患者。

[0037] 本發明亦提供一種治療有需要之個體之流血疾病或病症的方法，其包含投與有效量之嵌合蛋白、聚核苷酸、載體、宿主細胞或組合物，其中該流血疾病或病症係選自由以下組成之群：流血凝血病症、關節積血、肌肉流血、口腔流血、出血、向肌肉中出血、口腔出血、創傷、頭部創傷、胃腸流血、顱內出血、腹內出血、胸內出血、骨折、中樞神經系統流血、咽後間隙中流血、腹膜後間隙中流血及髂腰肌鞘中流血。治療可為預防性或按需治療。在一個實施例中，有效量為 0.1 $\mu\text{g/kg}$ 至 500 mg/kg 。

[0038] 本發明亦包括一種製備嵌合蛋白之方法，其包含用聚核苷酸或載體轉染一或多種宿主細胞及在宿主細胞中表現該嵌合蛋白。

【圖式簡單說明】

[0039] 圖 1A-D. VWF 片段之示意圖。圖 1A 展示適用於本發明之三個示範性 VWF 片段，例如 VWF-002、

VWF-010 及 VWF-013。VWF-002 含有 SEQ ID NO: 124 之胺基酸 1 至 477(SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 1240)且合成爲無前肽/肽原序列。除 D'D3 域之外，VWF-010 亦含有 D1D2 域。除在 SEQ ID NO: 123 之殘基 336 及 379 處取代半胱胺酸之丙胺酸殘基之外，VWF-013 亦含有 D1D2D'D3 域。圖 1B 展示 VWF-031，其含有藉由可裂解連接子(例如 48 個胺基酸之凝血酶可裂解連接子)融合於 Ig 恆定區或其部分(例如 Fc 區)的 D1D2D'D3 域。圖 1C 展示 VWF-025，其爲含於 pLIVE 載體中之編碼 D1D2D'D3 域之核苷酸序列；及 VWF-029，其爲 pLIVE 載體中之編碼具有兩個胺基酸取代 C336A 及 C379A 之 D1D2D'D3 域的核苷酸序列。圖 1D 展示包含肽原(D1 及 D2 域)及成熟次單元(D'、D3、A1、A2、A3、D4、B1-3、C1-2 域)之全長 VWF 片段。VWF 片段爲約 250 kDa 蛋白質且藉由二硫化物鍵結形成多聚體(> 20 MDa)。VWF 片段與 FVIII(95-98%)締合成非共價複合物且接著藉由保護 FVIII 免遭蛋白酶裂解/活化、穩定化重鏈及輕鏈、及阻止 FVIII 由清除受體清除來延長 FVIII 之半衰期。VWF 片段亦可藉由經由 VWF 受體清除 FVIII-VWF 複合物及阻止胞飲作用及使 rFVIIIIFc 再循環來限制 FVIII 之半衰期。

[0040] 圖 2. rFVIII-XTEN(rFVIII-AE288 或 rFVIII-288AE)在 VWF D'D3 表現小鼠中或在 FVIII 及 VWF 雙重基因剔除(DKO)小鼠中之藥物動力學概況。圖 2A 展示流體動力學注射(HDI)D'D3 域編碼質體 DNA(VWF-025)(第-5

天)、靜脈內給與 rFVIII-XTEN AE288(第 0 天)及 PK 樣品收集(第 5 天)之時間線。圖 2B 展示在 D1D2D'D3 小鼠中靜脈內給與 rFVIII-XTEN288(倒三角)及在 DKO 小鼠中靜脈內給與 rFVIII-XTEN288(菱形)之後藉由 FVIII 顯色分析量測的 FVIII 活性。圖 2C 展示在投與 VWF-025 之後的 D'D3 血漿含量(ng/mL)。X 軸表示以小時計之時間。

[0041] 圖 3. 示範性 VWF:FVIII 雜二聚體構築體之示意圖。構築體具有表示為式 FVIII-F1-L1-V-X-L2-F2 之共同結構，但含有不同可變連接子之實例。所示構築體(FVIII-161)含有連接於第一 Fc 區及 VWF 片段之雜二聚 FVIII(重鏈與輕鏈係藉由金屬鍵締合)，該 VWF 片段為連接於 XTEN 序列之 VWF 之 D'及 D3 域(亦即 SEQ ID NO: 2 之具有胺基酸取代 C336A 及 C379A 之胺基酸 1 至 477)，該 XTEN 序列進一步連接於可裂解連接子及第二 Fc 區。FVIII-161 中所含之 XTEN 序列為 XTEN AE288 序列，且連接子為具有 35 個胺基酸之凝血酶可裂解連接子。在 FVIII-161 中，連接於第一 Fc 區之 FVIII 蛋白質藉由可加工連接子連接於 VWF 片段。表現時，可加工連接子可由細胞內加工酶裂解，由此使得構築體成為彼此締合之三條多肽鏈。

[0042] 圖 4 為 FVIII-VWF 雜二聚體或單體實例之示意圖。FVIII-168、FVIII-175、FVIII-172、FVIII-174 及 FVIII170。構築體 FVIII-168 包含連接於第一 Fc 區之單鏈 FVIII 序列(在殘基 1645 及 1648 處具有丙胺酸殘基取代精

胺酸殘基)，該第一 Fc 區接著融合於藉由具有 48 個胺基酸之凝血酶可裂解連接子連接於第二 Fc 區之 VWF 片段。AE288 XTEN 插入單鏈 FVIII 序列之 B 域中。第一 Fc 區與 VWF 片段之間的鍵聯包含能夠由細胞內加工酶裂解之連接子，亦即可加工連接子。構築體 FVIII-175 包含連接於 AE288 XTEN 及第一 Fc 區之單鏈 FVIII(在殘基 1645 及 1648 處具有丙胺酸殘基取代精胺酸殘基)，該第一 Fc 區藉由連接子(例如可加工連接子)連接於第二 Fc 區。AE288 XTEN 插入單鏈 FVIII 序列之 B 域中。構築體 FVIII-172 包含兩條多肽鏈，第一鏈包含融合於 AE 288 XTEN 之重鏈 FVIII 序列，第二鏈包含輕鏈 FVIII 序列、第一 Fc 區、連接子(例如可加工連接子)、VWF 片段、凝血酶可裂解連接子(例如 48 個胺基酸)及第二 Fc 區。構築體 FVIII-174 包含兩條多肽鏈，第一鏈包含融合於 AE288 XTEN 之重鏈 FVIII 序列且第二鏈包含輕鏈 FVIII、第一 Fc 區、連接子(例如可加工連接子)及第二 Fc 區。構築體 FVIII-170 包含 VWF 片段、AE288 XTEN、連接子(例如長度為 35 個胺基酸之凝血酶可裂解連接子)及單鏈 FVIII 序列。

[0043] 圖 5. 含有 XTEN 序列與 Fc 區之組合之 FVIII/VWF 雜二聚體的藥物動力學概況。在每只小鼠 100 μ g 之劑量下藉由流體動力學注射(HDI)向 FVIII:VWF 雙重基因剔除(DKO)小鼠投與構築體 FVIII-161、FVIII-168 及 FVIII-172。在每只小鼠 50 μ g 之劑量下藉由 HDI 向 FVIII:VWF DKO 小鼠投與構築體 FVIII-170。藉由 FVIII

顯色分析，持續 HDI 後 24 小時分析 HDI 後血漿 FVIII 活性。將含有 XTEN 序列及 Fc 域之 FVIII:VWF 雜二聚體的 FVIII 活性與無 VWF 片段、XTEN 序列及 Fc 域之 BDD-FVIII 的 FVIII 活性進行比較。

[0044] 圖 6. FVIII-VWF 雜二聚體實例共轉染系統之示意圖。圖 6A。構築體 FVIII-169 含有連接於 Fc 區之全長 FVIII 序列(在 1645 及 1648 處具有取代精胺酸殘基之丙胺酸殘基且在單鏈 FVIII 序列中插入 XTEN 序列)。VWF-031 含有以 48 凝血酶可裂解連接子連接於另一 Fc 區之 D1D2D'D3 片段(在 336 及 379 處具有取代半胱胺酸殘基之丙胺酸殘基)。在細胞內加工之後，構築體 FVIII-169 產生融合於一個 Fc 片段及 XTEN 序列之全長單鏈 FVIII(SCFVIII)，且構築體 VWF-031 產生連接於另一 Fc 片段之含 477 個胺基酸之 D'D3 片段。在連接於 SC FVIII 或 D'D3 片段之 Fc 片段之間可形成兩個共價鍵，此又允許 FVIII 與 D'D3 非共價締合。圖 6B。構築體 FVIII-173 含有雜二聚 FVIII 序列，亦即連接於 XTEN 序列之重鏈 FVIII 序列及連接於 Fc 區之輕鏈 FVIII 序列。VWF-031 係如上文所述。在細胞內加工之後，構築體 FVIII-173 產生雜二聚蛋白質，重鏈 FVIII 融合於 XTEN 序列，輕鏈 FVIII 融合於一個 Fc 片段，且構築體 VWF-031 產生連接於另一 Fc 片段之含 477 個胺基酸之 D'D3 片段。在連接於輕鏈 FVIII 或 D'D3 片段之 Fc 片段之間可形成兩個共價鍵，此又允許 FVIII 與 D'D3 非共價締合。

[0045] 圖 7. 含有 XTEN 序列及 Fc 域之示範性 FVIII:VWF 與固定 hVWF 在 Octet 分析中之結合親和力。使用基於生物層干涉量測術之量測法 (Octet 分析) 測試 FVIII-169/VWF-031 及 FVIII-057(rFVIIIIFc) 融合於固定 hVWF 之結合親和力。圖 7A 展示 FVIII169 及 FVIIIIFc 藥物 (陽性對照) 對固定 hVWF 之以奈莫耳計之結合反應。圖 7B 展示人類 IgG1 (陰性對照) 對固定人類 VWF 之結合反應。

[0046] 圖 8. FVIII-169 在 HemA 小鼠及 FVIII:VWF 雙重基因剔除 (DKO) 小鼠中之藥物動力學 (PK) 概況。圖 8A 展示 FVIII-169/VWF-031 及 FVIIIIFc 在 HemA 小鼠中之 PK 概況。HemA 小鼠用單次靜脈內劑量之 FVIII-169/VWF-031 以 200 IU/kg 治療。藉由 FVIII 顯色分析測試自小鼠收集之血漿樣品。使用 WinNonlin 程式計算 FVIII-169/VWF-031 之半衰期。圖 8B 展示 FVIII-169/VWF-031、FVIII-169/Fc 及 FVIIIIFc 在 FVIII/VWF DKO 小鼠中之 PK 概況。

[0047] 圖 9. FVIII-XTEN 變異體在 D'D3 表現 FVIII/VWF DKO 小鼠中之 PK 概況。圖 9A 展示 FVIII-XTEN 變異體、具有一個 XTEN 之 FVIII、具有兩個 XTEN 之 FVIII 及具有三個 XTEN 之 FVIII 的 PK 概況比較。一個、兩個或三個 XTEN 插入 FVIII 之各種部分，包括 C 末端及 B 域中。CT 指示 XTEN 連接於 FVIII 之 C 末端。插入位點 B/CT 指示一個 XTEN 插入在 FVIII 蛋白質之胺基

酸殘基 745 與胺基酸殘基 746 之間且另一 XTEN 連接於 FVIII 蛋白質之 C 末端。胺基酸殘基編號對應於 SQ BDD FVIII 蛋白質序列。插入位點 1900/B/CT 指示第一 XTEN 插入在 FVIII 之胺基酸殘基 1900 與胺基酸殘基 1901 之間，第二 XTEN 插入在 FVIII 之胺基酸殘基 745 與胺基酸殘基 746 之間，且第三 XTEN 連接於 FVIII 之 C 末端。用於投與 FVIII-XTEN 變異體之小鼠品系為表現 D'D3 域之 DKO 小鼠品系。圖 9B 展示具有三個 XTEN 插入之 FVIII-XTEN 之 PK 概況。向 FVIII/VWF DKO 小鼠或 HemA 小鼠投與 FVIII-XTEN(1900/B/CT) 變異體。比較 FVIII-XTEN(1900/B/CT)之半衰期。

[0048] 圖 10. 藉由顯色分析量測之 FVIIIFc(中空三角)、FVIII169:Fc(實心圓圈)及 FVIII169:VWF31(中空三角)在小鼠 DKO 血漿中之 FVIII 活性。FVIII:Fc 含有融合於 Fc 二聚體之雙鏈 FVIII(重鏈及輕鏈)(亦即單體-二聚體雜交物)。在上文描述 FVIII169(緊靠對應於成熟 FVIII 序列之胺基酸 745 之下游在 B 域中含有 AE288)。FVIII169:Fc 含有融合於 Fc 二聚體之 FVIII169。除 Fc 二聚體之外，FVIII169:VWF31 亦含有 VWF31，FVIII169 融合於第一 Fc 區且 VWF31 融合於第二 Fc 區，其中第一 Fc 區與第二 Fc 區形成共價鍵，例如一或多個二硫鍵。

[0049] 圖 11. Fc、XTEN 及 VWF-D'D3 片段對 FVIII 半衰期延長之影響。向 FVIII 及 VWF 雙重基因剔除(DKO)小鼠投與 BDD-FVIII(REFACTO®)(方塊)、FVIIIFc(圓圈)、

FVIII169/Fc(三角)及 FVIII169/VWF031(倒三角)。藉由顯色分析量測 FVIII 活性，且使用 WinNonlin-Phoenix 程式計算半衰期。X 軸展示時間，且 Y 軸展示以 mU/mL 計之 FVIII 血漿活性。

[0050] 圖 12A-C. 在 HemA 小鼠中 rFVIII-XTEN/VWF 雜二聚體中之不同 XTEN 之作用。圖 12A 展示相較於緊靠對應於成熟 FVIII 序列之殘基 745 之下游含有 XTEN 的 FVIII-169，緊靠對應於成熟 FVIII 序列(亦即 FVIII-195(雙鏈 FVIII 同功異型物)及 FVIII-199(單鏈 FVIII 同功異型物))之殘基 1900 及 1656 之下游插入之兩個 XTEN 之相對於 5 分鐘值校正的 FVIII 血漿活性(%)。在 HemA 小鼠中投與 FVIII-169/VWF-031(實心圓圈)、FVIII-199/VWF-031(實心方塊)及 FVIII-195/VWF031(中空方塊)以量測 FVIII 血漿活性。圖 12B 展示相較於 FVIII-169(僅在 B 域中具有 XTEN 插入)，緊靠對應於成熟 FVIII 序列之殘基 403(A2 域)及 745(B 域)(亦即 FVIII-203)以及殘基 745(B 域)及 1900(A3 域)(FVIII-204)之下游之第二 XTEN 插入的半衰期延長作用。向 HemA 小鼠投與 FVIII-204/VWF031(實心三角)、FVIII-169/VWF-031(實心圓圈)、FVIII-203/VWF-031(實心方塊)及 scBDD-FVIII(中空菱形)。X 軸展示相對於 5 分鐘值校正之 FVIII 血漿活性(%)，且 y 軸展示以小時計之時間。圖 12C 展示相較於 FVIII-169(在 B 域中具有單一 XTEN 插入)及無任何 Fc 區或任何 XTEN 之單鏈 FVIII(亦即 FVIII-207)，緊靠殘基

18(A1 域)及 745(B 域)(亦即 FVIII-205)之下游之兩個 XTEN 插入的半衰期延長作用。圖 12C 另外展示相較於 FVIII-169(緊靠殘基 745 之下游具有單一 XTEN 插入), 緊靠殘基 26(A1 域)、1656(A3 域)及 1900(A3 域)(亦即 FVIII-201)之下游併入之三個 XTEN 插入的半衰期延長作用。向 HemA 小鼠投與 FVIII-205/VWF-031(實心方塊)、FVIII-201/VWF-031(倒三角)、FVIII-169/VWF-031(實心圓圈)及 FVIII-207(中空菱形)。隨以小時計之時間(Y 軸)量測相對於 5 分鐘值校正之 FVIII 血漿活性(%) (X 軸)。

[0051] 圖 13. rFVIII-XTEN/VWF-XTEN 雜二聚體在 FVIII/VWF DKO 小鼠中之 FVIII 活性。藉由 FVIII 顯色分析來分析血漿樣品之 FVIII 活性, 且繪製血漿 FVIII 活性(X 軸)隨時間(Y 軸)變化之回歸曲線。使 FVIII-155(無任何 XTEN 之 scFVIIIIFc)與 VWF-034(具有 AE 288 XTEN 加含 35 個殘基之凝血酶可裂解連接子之 VWF-Fc)共表現。將 FVIII-155/VWF-034 之半衰期與具有插入 FVIII 之 B 域接合點(緊靠對應於成熟 FVIII 多肽之殘基 745 之下游)中之 AE 288 XTEN 的 FVIII-169/VWF-031 之半衰期進行比較。

[0052] 圖 14A-H. 各種 rFVIII-XTEN/VWF 構築體之示意圖。此等構築體亦描述於本文其他章節中。圖 14A 展示單鏈 B 域缺失之 FVIII 蛋白質(在本文中有時表示為 scBDD-FVIII)。scBDD-FVIII 構築體在殘基 1645 及 1648 處含有 Arg 取代為 Ala 之兩個取代。圖 14B 展示含兩條多肽鏈之構築體(FVIII155/VWF031), 第一鏈包含連接於 Fc

區之無任何 XTEN 之單鏈 FVIII 且第二鏈包含連接於 Fc 區之 VWF D'D3 片段。此構築體用作對照。圖 14C 展示含兩條多肽鏈之構築體(FVIII199/VWF031)，第一鏈包含連接於 Fc 區之單鏈 FVIII，其中第一 XTEN 緊靠對應於成熟 FVIII 序列之殘基 1900 之下游插入且第二 XTEN 緊靠對應於成熟 FVIII 序列之殘基 1656 之下游插入，且第二鏈包含連接於 Fc 區之 VWF D'D3 片段。圖 14D 展示含兩條多肽鏈之構築體(FVIII201/VWF031)，第一鏈包含連接於 Fc 區之單鏈 FVIII 蛋白質，其中第一 XTEN 緊靠對應於成熟 FVIII 序列之殘基 26 之下游插入，第二 XTEN 緊靠對應於成熟 FVIII 序列之殘基 1656 之下游插入，且第三 XTEN 緊靠對應於成熟 FVIII 序列之殘基 1900 之下游插入，且第二鏈包含連接於 Fc 區之 VWF D'D3 片段。圖 14E 展示含兩條多肽鏈之構築體(FVIII169/VWF031)，第一鏈包含連接於 Fc 區之單鏈 FVIII 蛋白質，其中 XTEN 緊靠對應於成熟 FVIII 序列之殘基 745(表示為「B」)之下游插入，且第二鏈包含連接於 Fc 區之 VWF D'D3 片段。圖 14F 展示含兩條多肽鏈之構築體(FVIII203/VWF031)，第一鏈包含單鏈 FVIII 蛋白質，其中第一 XTEN 在對應於成熟 FVIII 序列之殘基 745(「B」)處插入且第二 XTEN 在對應於成熟 FVIII 序列之殘基 1900 處插入，且第二鏈包含連接於 Fc 區之 VWF D'D3 片段。圖 14G 展示含兩條多肽鏈之構築體(FVIII204/VWF031)，第一鏈包含連接於 Fc 區之單鏈 FVIII 蛋白質，其中第一 XTEN 緊靠對應於成熟

FVIII 序列之殘基 403 之下游插入且第二 XTEN 緊靠對應於成熟 FVIII 序列之殘基 745(「B」)之下游插入，且第二鏈包含連接於 Fc 區之 VWF D'D3 片段。圖 14H 展示含兩條多肽鏈之構築體(FVIII205/VWF031)，第一鏈包含單鏈 FVIII，其中第一 XTEN 緊靠對應於成熟 FVIII 序列之殘基 18 之下游插入且第二 XTEN 緊靠對應於成熟 FVIII 序列之殘基 745(「B」)之下游插入，且第二鏈包含連接於 Fc 區之 VWF D'D3 片段。

[0053] 圖 15. rFVIII-XTEN/VWF 及 BDD-FVIII 在 FVIII/VWF DKO 小鼠中之 FVIII 活性。藉由 FVIII 顯色分析來分析血漿樣品之 FVIII 活性，且繪製血漿 FVIII 活性(X 軸)隨時間(Y 軸)變化之回歸曲線。將 rFVIII-XTEN/VWF(FVIII-205/VWF-031)之半衰期與 BDD-FVIII 及 rFVIII-Fc 之半衰期進行比較。

[0054] 圖 16. 使用尾夾放血模型測定之 FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 雜二聚體在 HemA 小鼠中之功效。HemA 小鼠尾夾放血模型用於比較 FVIII169/VWF034、FVIII205/VWF031 及 BDD-FVIII 之功效。將 200 IU/kg 之 FVIII169/VWF034 及 FVIII205/VWF031 之以 ml 計之中值失血量與 200 IU/kg BDD-FVIII、65 IU/kg BDD-FVIII、20 IU/kg BDD-FVIII、及媒劑進行比較。

【實施方式】

定義

[0055] 應注意術語「一(a/an)」實體係指一或多個彼實體；例如「一核苷酸序列」應理解成表示一或多個核苷酸序列。因此，術語「一」、「一或多個」及「至少一個」在本文中可互換使用。

[0056] 術語「聚核苷酸」或「核苷酸」意欲涵蓋單個核酸以及複數個核酸，且係指經分離核酸分子或構築體，例如信使 RNA(mRNA)或質體 DNA(pDNA)。在某些實施例中，聚核苷酸包含習知磷酸二酯鍵或非習知鍵(例如醯胺鍵，諸如見於肽核酸(PNA)中)。術語「核酸」係指存在於聚核苷酸中之任何一或多個核酸區段，例如 DNA 或 RNA 片段。就「經分離」核酸或聚核苷酸而言，其意欲為已自天然環境移除之核酸分子、DNA 或 RNA。舉例而言，出於本發明之目的，載體中所含之編碼因子 VIII 多肽之重組聚核苷酸被視為經分離。經分離聚核苷酸之其他實例包括維持在異源宿主細胞中或自其他聚核苷酸純化(部分或實質上純化)之呈溶液形式之重組聚核苷酸。經分離 RNA 分子包括本發明聚核苷酸之活體內或活體外 RNA 轉錄物。本發明之經分離聚核苷酸或核酸進一步包括合成產生之此等分子。此外，聚核苷酸或核酸可包括調控元件，諸如啟動子、增強子、核糖體結合位點或轉錄終止信號。

[0057] 如本文所用，「編碼區」或「編碼序列」為由可轉譯成胺基酸之密碼子組成之一部分聚核苷酸。儘管「終止密碼子」(TAG、TGA 或 TAA)通常不轉譯成胺基

酸，但其可被視為編碼區之一部分，然而任何側接序列(例如啓動子、核糖體結合位點、轉錄終止子、內含子及其類似序列)皆不為編碼區之部分。編碼區之邊界通常由在 5'末端之起始密碼子(編碼所得多肽之胺基末端)及在 3'末端之轉譯終止密碼子(編碼所得多肽之羧基末端)來確定。本發明之兩個或兩個以上編碼區可存在於單一聚核苷酸構築體中，例如在單一載體上，或存在於各別聚核苷酸構築體中，例如在各別(不同)載體上。則由此可見單一載體可僅含有單一編碼區，或包含兩個或兩個以上編碼區，例如單一載體可分別編碼如下所述之結合域 A 及結合域 B。此外，本發明之載體、聚核苷酸或核酸可編碼融合或未融合於編碼本發明之結合域之核酸的異源編碼區。異源編碼區包括(但不限於)專門化元件或基元，諸如分泌信號肽或異源功能域。

[0058] 由哺乳動物細胞分泌之某些蛋白質與分泌信號肽締合，一旦逐漸增長之蛋白質鏈跨越粗糙內質網之輸出已啓動，該信號肽即自成熟蛋白質裂解。一般技藝人士應瞭解信號肽通常融合於多肽之 N 末端，且自完全或「全長」多肽裂解以產生多肽之分泌或「成熟」形式。在某些實施例中，使用天然信號肽、或彼序列之保留引導與其可操作地締合之多肽分泌之能力的功能性衍生物。或者，可使用異源哺乳動物信號肽，例如人類組織血纖維蛋白溶酶原活化因子(TPA)或小鼠 β -葡糖醛酸酶(β -glucuronidase)信號肽或其功能性衍生物。

[0059] 術語「下游」係指位於參照核苷酸序列之 3' 方向之核苷酸序列。在某些實施例中，下游核苷酸序列涉及在轉錄起始點之後之序列。舉例而言，基因之轉譯起始密碼子位於轉錄起始位點之下游。

[0060] 術語「上游」係指位於參照核苷酸序列之 5' 方向之核苷酸序列。在某些實施例中，上游核苷酸序列涉及位於編碼區或轉錄起始點之 5' 側之序列。舉例而言，大多數啓動子位於轉錄起始位點之上游。

[0061] 如本文所用，術語「調控區」係指位於編碼區之上游(5'非編碼序列)、內部或下游(3'非編碼序列)，且影響相關編碼區之轉錄、RNA 加工、穩定性或轉譯之核苷酸序列。調控區可包括啓動子、轉譯前導序列、內含子、聚腺苷酸化識別序列、RNA 加工位點、效應物結合位點及莖-環結構。若編碼區意欲在真核細胞中表現，則聚腺苷酸化信號及轉錄終止序列將通常位於編碼序列之 3' 方向。

[0062] 編碼基因產物(例如多肽)之聚核苷酸可包括與一或多個編碼區可操作地締合之啓動子及/或其他轉錄或轉譯控制元件。在可操作締合中，基因產物(例如多肽)之編碼區以將該基因產物之表現置於調控區之影響或控制下的方式與一或多個調控區締合。舉例而言，若誘導啓動子功能會導致編碼由編碼區編碼之基因產物之 mRNA 轉錄，且若啓動子與編碼區之間的鍵聯之性質不干擾啓動子引導基因產物表現之能力或不干擾 DNA 模板被轉錄之能力，

則編碼區及啓動子係「可操作地締合」。除啓動子之外，其他轉錄控制元件(例如增強子、操縱子、阻遏子及轉錄終止信號)亦可與編碼區可操作地締合以引導基因產物表現。

[0063] 多種轉錄控制區爲熟習此項技術者所知。此等轉錄控制區包括(但不限於)在脊椎動物細胞中起作用之轉錄控制區，諸如(但不限於)來自巨細胞病毒(即刻早期啓動子，連同內含子-A 一起)、猿猴病毒 40(早期啓動子)及逆轉錄病毒(諸如勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma virus))之啓動子及增強子區段。其他轉錄控制區包括源於脊椎動物基因(諸如肌動蛋白(actin)、熱休克蛋白、牛生長激素及兔 β -球蛋白)之彼等控制區、以及能夠控制真核細胞中之基因表現之其他序列。其他適合轉錄控制區包括組織特異性啓動子及增強子以及淋巴因子(lymphokine)誘導性啓動子(例如可由干擾素或介白素誘導之啓動子)。

[0064] 類似地，多種轉譯控制元件爲一般技藝人士所知。此等轉譯控制元件包括(但不限於)核糖體結合位點、轉譯起始及終止密碼子、及源於微小核糖核酸病毒之元件(特定言之內部核糖體進入位點或 IRES，亦稱爲 CITE 序列)。

[0065] 如本文所用之術語「表現」係指聚核苷酸藉以產生基因產物(例如 RNA 或多肽)之過程。其包括(但不限於)聚核苷酸轉錄成信使 RNA(mRNA)、轉移 RNA(tRNA)、小髮夾 RNA(shRNA)、小干擾 RNA(siRNA)

或任何其他 RNA 產物，及 mRNA 轉譯成多肽。表現產生「基因產物」。如本文所用，基因產物可為核酸(例如藉由基因轉錄產生之信使 RNA)或自轉錄物轉譯之多肽。本文所述之基因產物進一步包括具有轉錄後修飾(例如聚腺苷酸化或剪接)之核酸、或具有轉譯後修飾(例如甲基化、糖基化、添加脂質、與其他蛋白質次單元締合、或蛋白水解裂解)之多肽。

[0066] 「載體」係指用於將核酸選殖及/或轉移至宿主細胞中之任何媒介物。載體可為可與另一核酸區段連接以達成所連接區段複製之複製子。「複製子」係指在活體內充當自主複製單元，亦即能夠在自身控制下複製之任何遺傳元件(例如質體、噬菌體、黏質體、染色體、病毒)。術語「載體」包括用於在活體外、離體或在活體內將核酸引入細胞中之病毒媒介物與非病毒媒介物兩者。此項技術中已知且使用許多載體，包括例如質體、經修飾真核病毒或經修飾細菌病毒。將聚核苷酸插入適合載體中可藉由將適當聚核苷酸片段連接至具有互補黏性末端之所選載體中來達成。

[0067] 載體可經工程改造以編碼提供對已併有載體之細胞之選擇或鑒別的可選擇標記或報導體。可選擇標記或報導體之表現允許鑒別及/或選擇併有且表現載體上所含之其他編碼區之宿主細胞。此項技術中已知且使用之可選擇標記基因之實例包括：提供對胺苄青黴素(ampicillin)、鏈黴素(streptomycin)、健他黴素

(gentamycin) 、 康 黴 素 (kanamycin) 、 潮 黴 素 (hygromycin)、 雙 丙 胺 膦(bialaphos)除 草 劑、 磺 醯 胺 及 其 類 似 物 之 抗 性 之 基 因； 及 用 作 表 型 標 記 之 基 因， 亦 即 花 青 素 (anthocyanin)調 控 基 因、 異 戊 基 轉 移 酶 基 因 及 其 類 似 物。 此 項 技 術 中 已 知 且 使 用 之 報 導 體 之 實 例 包 括： 螢 光 素 酶 (luciferase, Luc)、 綠 色 螢 光 蛋 白 (GFP)、 氯 黴 素 乙 醯 轉 移 酶 (CAT)、 -半 乳 糖 苷 酶 (galactosidase, LacZ)、 -葡 萄 糖 醛 酸 酶 (glucuronidase, Gus)及 其 類 似 物。 可 選 擇 標 記 亦 可 視 為 報 導 體。

[0068] 術 語 「 質 體 」 係 指 染 色 體 外 元 件， 其 常 攜 帶 不 為 細 胞 之 中 心 代 謝 之 部 分 的 基 因， 且 通 常 呈 環 狀 雙 股 DNA 分 子 形 式。 此 等 元 件 可 為 源 於 任 何 來 源 之 單 股 或 雙 股 DNA 或 RNA 之 線 性、 環 狀 或 超 螺 旋 自 主 複 製 序 列、 基 因 組 整 合 序 列、 噬 菌 體 或 核 苷 酸 序 列， 其 中 許 多 核 苷 酸 序 列 已 接 合 或 重 組 成 能 夠 將 啓 動 子 片 段 及 所 選 基 因 產 物 之 DNA 序 列 連 同 適 當 3'末 轉 譯 序 列 一 起 引 入 細 胞 中 之 獨 特 構 造。

[0069] 可 使 用 之 真 核 病 毒 載 體 包 括 (但 不 限 於)腺 病 毒 載 體、 逆 轉 錄 病 毒 載 體、 腺 相 關 病 毒 載 體 及 痘 病 毒 (例 如 牛 痘 病 毒)載 體、 桿 狀 病 毒 載 體 或 胞 疹 病 毒 載 體。 非 病 毒 載 體 包 括 質 體、 脂 質 體、 帶 電 荷 脂 質 (細 胞 轉 染 劑)、 DNA-蛋 白 質 複 合 物 及 生 物 聚 合 物。

[0070] 「 選 殖 載 體 」 係 指 一 種 「 複 製 子 」， 其 為 依 序 複 製 且 包 含 複 製 起 點 的 單 位 長 度 之 核 酸 (諸 如 質 體、 噬

菌體或黏質體)，另一核酸區段可與其連接以達成所連接區段之複製。某些選殖載體能夠在一個細胞類型(例如細菌)中複製且在另一細胞類型(例如真核細胞)中表現。選殖載體通常包含一或多種可用於選擇包含載體之細胞之序列及/或一或多個用於插入相關核酸序列之多選殖位點。

[0071] 術語「表現載體」係指設計成使插入之核酸序列能夠在插入宿主細胞中之後表現之載體。插入之核酸序列安置成與如上所述之調控區可操作締合。

[0072] 藉由此項技術中熟知之方法將載體引入宿主細胞中，該等方法例如轉染、電穿孔、顯微注射、轉導、細胞融合、DEAE 葡聚糖、磷酸鈣沈澱、脂質體轉染(溶酶體融合)、使用基因槍、或 DNA 載體轉運體(transporter)。

[0073] 如本文所用之「培養(Culture/to culture)」意謂在允許細胞生長或分裂之活體外條件下培育細胞或意謂使細胞維持存活狀態。如本文所用之「培養細胞」意謂在活體外繁殖之細胞。

[0074] 如本文所用，術語「多肽」意欲涵蓋單個「多肽」以及複數個「多肽」，且係指由藉由醯胺鍵(亦稱為肽鍵)線性連接之單體(胺基酸)構成之分子。術語「多肽」係指具有兩個或兩個以上胺基酸之任何一或多個鏈，且不指特定長度之產物。因此，肽、二肽、三肽、寡肽、「蛋白質」、「胺基酸鏈」或用於表示具有兩個或兩個以上胺基酸之一或多個鏈之任何其他術語均包括在「多肽」

之定義內且術語「多肽」可替代任何此等術語使用或可與任何此等術語互換使用。術語「多肽」亦意欲表示多肽之表現後修飾產物，該等修飾包括(但不限於)糖基化、乙醯化、磷酸化、醯胺化、由已知保護/阻斷基團達成之衍生化、蛋白水解裂解、或由非天然存在之胺基酸達成之修飾。多肽可源於天然生物來源或藉由重組技術產生，但未必自指定核酸序列轉譯。其可以任何方式產生，包括藉由化學合成。

[0075] 「經分離」多肽或其片段、變異體或衍生物係指不在天然環境中之多肽。不要求特定純化程度。舉例而言，經分離多肽可自其原生或天然環境簡單地移除。出於本發明之目的，在宿主細胞中表現之重組產生之多肽及蛋白質被視為經分離，已藉由任何適合技術分離、分級分離、或部分或實質上純化之天然或重組多肽亦視為經分離。

[0076] 本發明中亦包括多肽之片段或變異體及其任何組合。術語「片段」或「變異體」在提及本發明之多肽結合域或結合分子時包括保留參照多肽之至少一些性質(例如 FcRn 結合域或 Fc 變異體之 FcRn 結合親和力、FVIII 變異體之凝血活性、或 VWF 片段之 FVIII 結合活性)之任何多肽。除在本文中其他地方論述之特定抗體片段之外，多肽之片段亦包括蛋白水解片段以及缺失片段，但不包括天然存在之全長多肽(或成熟多肽)。本發明之多肽結合域或結合分子之變異體包括如上所述之片段以及胺

基酸序列歸因於胺基酸取代、缺失或插入而改變之多肽。變異體可為天然存在的或非天然存在的。非天然存在之變異體可使用此項技術已知之突變誘發技術來產生。變異型多肽可包含保守或非保守胺基酸取代、缺失或添加。

[0077] 本文中使用的術語「VWF 片段(VWF fragment/VWF fragments)」意謂與 FVIII 相互作用且保留至少一或多種通常由全長 VWF 提供給 FVIII 之性質之任何 VWF 片段，該等性質例如阻止過早活化成 FVIIIa、阻止過早蛋白水解、阻止與磷脂膜進行可導致過早清除之締合、阻止結合可結合裸 FVIII 而非結合有 VWF 之 FVIII 之 FVIII 清除受體，及/或穩定化 FVIII 重鏈及輕鏈相互作用。

[0078] 「保守胺基酸取代」為胺基酸殘基經具有類似側鏈之胺基酸殘基置換之胺基酸取代。具有類似側鏈之胺基酸殘基之家族已在此項技術中定義，包括鹼性側鏈(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、酸性側鏈(例如天冬胺酸、麩胺酸)、不帶電荷極性側鏈(例如甘胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸、絲胺酸、酥胺酸、酪胺酸、半胱胺酸)、非極性側鏈(例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸)、 β -分支側鏈(例如酥胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及芳族側鏈(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。因此，若多肽中之胺基酸經來自同一側鏈家族之另一胺基酸置換，則取代視為保守性取代。在另一實施例中，一串胺基酸可經側鏈家族成員

之順序及/或組成不同之在結構上類似之串保守置換。

[0079] 如此項技術中所知，藉由比較一個多肽之胺基酸序列與第二多肽之序列來確定兩個多肽之間的「序列一致性」。當在本文中論述時，任何特定多肽是否與另一多肽至少約 50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或 100%一致可使用此項技術中已知之方法及電腦程式/軟體來確定，諸如(但不限於)BESTFIT 程式(用於 Unix 之 Wisconsin 序列分析包，第 8 版，Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711)。BESTFIT 使用 Smith 及 Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981)之局部同源性算法以得到兩個序列之間的最佳同源性區段。當使用 BESTFIT 或任何其他序列比對程式來確定特定序列與本發明之參照序列是否例如 95%一致時，當然設置參數以便計算參照多肽序列全長上之一致性百分比且允許同源性間隙佔參照序列中之胺基酸總數之至多 5%。

[0080] 如本文所用，藉由比對以使第一 VWF 或 FVIII 序列與第二 VWF 或 FVIII 序列之間的一致性或相似性達到最大來鑒別 VWF 序列或 FVIII 蛋白質序列中之「對應於...之胺基酸」或「等效胺基酸」。用於鑒別第二 VWF 或 FVIII 序列中之等效胺基酸之編號係基於用於鑒別第一 VWF 或 FVIII 序列中之相應胺基酸之編號。

[0081] 如本文所用，術語「插入位點」係指 FVIII 多

肽或其片段、變異體或衍生物中緊靠可插入異源部分之位置上游的位置。以編號指定「插入位點」，該編號為成熟天然 FVIII(SEQ ID NO:4)中由插入位點所對應之胺基酸的編號，該胺基酸緊靠插入位置之 N 端方向。舉例而言，片語「a3 在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1656 之插入位點處包含 XTEN」指示異源部分位於對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1656 及胺基酸 1657 之兩個胺基酸之間。

[0082] 如本文所用之片語「緊靠胺基酸之下游」係指緊接於胺基酸之末端羧基之位置。類似地，片語「緊靠胺基酸之上游」係指緊接於胺基酸之末端胺基之位置。因此，如本文所用之片語「在插入位點之兩個胺基酸之間」係指 XTEN 或任何其他多肽插入在兩個相鄰胺基酸之間所處之位置。因此，片語「緊靠胺基酸之下游插入」及「插入在插入位點之兩個胺基酸之間」與「在插入位點處插入」同義使用。

[0083] 如本文所用之術語「插入」、「經插入」、「插入...中」或語法相關術語係指相對於天然成熟人類 FVIII 中之類似位置，XTEN 在嵌合多肽中之位置。如本文所用，該等術語係指重組 FVIII 多肽相對於天然成熟人類 FVIII 之特徵，且不指示、暗示或意指製備嵌合多肽之任何方法或過程。舉例而言，對於本文提供之嵌合多肽，片語「將 XTEN 緊靠 FVIII 多肽之殘基 745 之下游插入」意謂該嵌合多肽在緊靠對應於天然成熟人類 FVIII 中之胺基酸 745 之胺基酸的下流包含 XTEN，其例如由對應於天

然成熟人類 FVIII 之胺基酸 745 及 746 之胺基酸所界定。

[0084] 「融合」或「嵌合」蛋白包含第一胺基酸序列連接於在自然界中其未天然連接之第二胺基酸序列。通常存在於各別蛋白質中之胺基酸序列可集合在一起形成融合多肽，或通常存在於同一蛋白質中之胺基酸序列可以新排列安置在融合多肽中，該融合多肽例如為本發明之因子 VIII 域與 Ig Fc 域之融合體。例如藉由化學合成，或藉由產生並轉譯肽區以所要關係編碼之聚核苷酸來產生融合蛋白。嵌合蛋白可進一步包含藉由共價非肽鍵或非共價鍵與第一胺基酸序列締合之第二胺基酸序列。

[0085] 如本文所用，術語「半衰期」係指特定多肽在活體內之生物半衰期。半衰期可由向個體投與之量的一半自動物中之循環及/或其他組織清除所需要的時間表示。當構建指定多肽作為時間之函數之清除曲線時，曲線通常為雙相的，具有快速 α 相及較長 β 相。 α 相通常表示所投與 Fc 多肽在血管間隙內與血管間隙外之間達到平衡且部分地由多肽之大小決定。 β 相通常表示多肽在血管內間隙中之分解代謝。在一些實施例中，FVIII 及包含 FVIII 之嵌合蛋白為單相的，且因此不具有 α 相，而僅具有單一 β 相。因此，在某些實施例中，如本文所用之術語半衰期係指多肽在 β 相中之半衰期。人類抗體在人類中之典型 β 相半衰期為 21 天。

[0086] 如本文所用之術語「連接」係指第一胺基酸序列或核苷酸序列分別共價或非共價接合於第二胺基酸序

列或核苷酸序列。第一胺基酸或核苷酸序列可直接接合或毗連於第二胺基酸或核苷酸序列，或者介入序列可將第一序列共價接合於第二序列。術語「連接」不僅意謂第一胺基酸序列在 C 末端或 N 末端融合於第二胺基酸序列，而且亦包括將整個第一胺基酸序列(或第二胺基酸序列)插入第二胺基酸序列(或相應地第一胺基酸序列)中之任何兩個胺基酸中。在一個實施例中，第一胺基酸序列可藉由肽鍵或連接子連接於第二胺基酸序列。第一核苷酸序列可藉由磷酸二酯鍵或連接子連接於第二核苷酸序列。連接子可為肽或多肽(用於多肽鏈)或核苷酸或核苷酸鏈(用於核苷酸鏈)或任何化學部分(用於多肽與聚核苷酸鏈兩者)。術語「連接」亦藉由連字符(-)加以指示。

[0087] 如本文所用，術語「與...締合」係指在第一胺基酸鏈與第二胺基酸鏈之間形成共價或非共價鍵。在一個實施例中，術語「與...締合」意謂共價非肽鍵或非共價鍵。此締合可由冒號，亦即(:)指示。在另一實施例中，其意謂除肽鍵之外之共價鍵。舉例而言，胺基酸半胱胺酸包含可與第二半胱胺酸殘基上之硫醇基形成二硫鍵或二硫橋之硫醇基。在大多數天然存在之 IgG 分子中，CH1 區與 CL 區藉由二硫鍵締合且兩個重鏈藉由在對應於 239 及 242 之位置處的兩個二硫鍵締合，該等位置係使用 Kabat 編號系統(位置 226 或 229，EU 編號系統)。共價鍵之實例包括(但不限於)肽鍵、金屬鍵、氫鍵、二硫鍵、 σ 鍵、 π 鍵、 δ 鍵、糖苷鍵、抓氫鍵、彎曲鍵、偶極鍵、 π 反向

鍵、雙鍵、參鍵、四鍵、五鍵、六鍵、結合、超結合、芳香性、哈普托數(hapticity)或反鍵結。非共價鍵之非限制性實例包括離子鍵(例如陽離子- π 鍵或鹽鍵)、金屬鍵、氫鍵(例如二氫鍵、二氫複合物、低障壁氫鍵、或對稱氫鍵)、凡得瓦(Van der Waals)力、倫敦分散力(London dispersion force)、機械鍵、鹵素鍵、親金性、插入、堆疊、熵力或化學極性。

● [0088] 本文使用之術語「單體-二聚體雜交物」係指包含藉由二硫鍵彼此締合之第一多肽鏈及第二多肽鏈之嵌合蛋白，其中該第一鏈包含凝結因子(例如因子 VIII)及第一 Fc 區，且該第二鏈包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：無凝結因子之第二 Fc 區。因此，單體-二聚體雜交物構築體為一種雜交物，其包含僅具有一個凝結因子之單體態樣及具有兩個 Fc 區之二聚體態樣。

● [0089] 如本文所用，術語「裂解位點」或「酶促裂解位點」係指由酶識別之位點。某些酶促裂解位點包含細胞內加工位點。在一個實施例中，多肽具有由在凝結級聯期間活化之酶裂解之酶促裂解位點，使得此等位點之裂解發生在凝塊形成之部位。示範性此類位點包括例如由凝血酶、因子 XIa 或因子 Xa 識別者。示範性 FXIa 裂解位點包括例如 TQSFNDFTR(SEQ ID NO: 45) 及 SVSQTSKLTR(SEQ ID NO: 46)。示範性凝血酶裂解位點包括例如 DFLAEGGGVR(SEQ ID NO: 47)、TTKIKPR(SEQ ID NO: 48)、LVPRG(SEQ ID NO: 49)及 ALRPR(SEQ ID

NO: 50 之胺基酸 1 至 5)。其他酶促裂解位點在此項技術中為已知的。

[0090] 如本文所用，術語「加工位點」或「細胞內加工位點」係指多肽中一種類型之酶促裂解位點，其為在該多肽轉譯之後起作用之酶的目標。在一個實施例中，此等酶在自高爾基體內腔(Golgi lumen)轉運至反面高爾基體(trans-Golgi)區室期間起作用。細胞內加工酶在蛋白質自細胞分泌之前裂解多肽。此等加工位點之實例包括例如由內肽酶之 PACE/弗林蛋白酶(furin)(其中 PACE 為成對鹼性胺基酸裂解酶(Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme)之頭字語)家族所靶向者。此等酶定位於高爾基體膜且在序列基元 Arg-[任何殘基]-(Lys 或 Arg)-Arg 之羧基端側上裂解蛋白質。如本文所用，「弗林蛋白酶」酶家族包括例如 PCSK1(亦稱為 PC1/Pc3)、PCSK2(亦稱為 PC2)、PCSK3(亦稱為弗林蛋白酶或 PACE)、PCSK4(亦稱為 PC4)、PCSK5(亦稱為 PC5 或 PC6)、PCSK6(亦稱為 PACE4)、或 PCSK7(亦稱為 PC7/LPC、PC8 或 SPC7)。其他加工位點在此項技術中為已知的。

[0091] 在包括一個以上加工或裂解位點之構築體中，應瞭解此等位點可相同或不同。

[0092] 術語「弗林蛋白酶」係指對應於 EC 編號 3.4.21.75 之酶。弗林蛋白酶為枯草桿菌蛋白酶樣前蛋白轉化酶，其亦稱為 PACE(成對鹼性胺基酸裂解酶(Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme))。弗林蛋白酶使無活

性前驅體蛋白質之部分缺失以將其轉化成生物活性蛋白質。在其細胞內轉運期間，VWF 之肽原可由弗林蛋白酶自成熟 VWF 分子裂解。在一些實施例中，弗林蛋白酶自 VWF 之 D'D3 裂解 D1D2。在其他實施例中，編碼弗林蛋白酶之核苷酸序列可連同編碼 VWF 片段之核苷酸序列一起表現以使 D1D2 域可由弗林蛋白酶在細胞內裂解去除。

[0093] 在包括一個以上加工或裂解位點之構築體中，應瞭解此等位點可相同或不同。

[0094] 如本文所用之「可加工連接子」係指包含至少一個在本文中其他地方描述之細胞內加工位點的連接子。

[0095] 如本文所用之止血病症意謂特徵在於由於形成纖維蛋白凝塊之能力降低或不能形成纖維蛋白凝塊而有自發出血或由於創傷而出血之傾向的遺傳繼承性或獲得性病狀。此等病症之實例包括血友病。三種主要形式為 A 型血友病(因子 VIII 缺乏症)、B 型血友病(因子 IX 缺乏症或「克雷司馬斯病(Christmas disease)」)及 C 型血友病(因子 XI 缺乏症，輕度流血傾向)。其他止血病症包括例如范威爾邦德病；因子 XI 缺乏症(PTA 缺乏症)；因子 XII 缺乏症；纖維蛋白原、凝血酶原、因子 V、因子 VII、因子 X 或因子 XIII 缺乏症或結構異常；伯納德-蘇里爾症候群(Bernard-Soulier syndrome)，其為一種 GPIb 缺陷症或缺乏症。VWF 之受體 GPIb 可為有缺陷的且導致缺乏初級凝塊形成(初級止血)及流血傾向增加)、以及格蘭茨曼

(Glanzman) 及 內 格 利 (Naegeli) 血 小 板 無 力 症 (thrombasthenia)(格 蘭 茨 曼 血 小 板 無 力 症)。在 肝 衰 竭 (急 性 及 慢 性 形 式) 中，由 肝 之 凝 血 因 子 產 生 不 足；此 可 增 加 流 血 風 險。

[0096] 本發明之嵌合分子可預防性使用。如本文所用，術語「預防性治療」係指在流血事件之前投與分子。在一個實施例中，需要一般性止血劑之個體正經歷或即將經歷手術。本發明之嵌合蛋白可在手術之前或之後作為預防劑投與。本發明之嵌合蛋白可在手術期間或之後投與以控制急性流血事件。手術可包括(但不限於)肝移植、肝切除、牙齒程序或幹細胞移植。

[0097] 本發明之嵌合蛋白亦用於按需治療。術語「按需治療」係指回應於流血事件之症狀或在可能導致流血之活動之前投與嵌合分子。在一個態樣中，按需治療可在流血開始時(諸如在損傷之後)或在預期會流血時(諸如在手術之前)給與個體。在另一態樣中，按需治療可在會增加流血風險之活動(諸如接觸性運動)之前給與。

[0098] 如本文所用，術語「急性流血」係指無論潛在原因如何之流血事件。舉例而言，個體可具有創傷、尿毒症、遺傳性流血病症(例如因子 VII 缺乏症)、血小板病症，或歸因於產生針對凝結因子之抗體的抗性。

[0099] 如本文所用之治療(Treat/treatment/treating)係指例如減輕疾病或病狀之嚴重性；減少疾病病程之持續時間；改善與疾病或病狀相關之一或多種症狀；向患有疾病

或病狀之個體提供有益作用，而未必治癒該疾病或病狀；或預防與疾病或病狀相關之一或多種症狀。在一個實施例中，術語「治療(treating/treatment)」意謂藉由投與本發明之嵌合蛋白或 VWF 片段來使個體之 FVIII 谷底含量維持在至少約 1 IU/dL、2 IU/dL、3 IU/dL、4 IU/dL、5 IU/dL、6 IU/dL、7 IU/dL、8 IU/dL、9 IU/dL、10 IU/dL、11 IU/dL、12 IU/dL、13 IU/dL、14 IU/dL、15 IU/dL、16 IU/dL、17 IU/dL、18 IU/dL、19 IU/dL 或 20 IU/dL。在另一實施例中，治療意謂維持 FVIII 谷底含量在以下之間：約 1 與約 20 IU/dL、約 2 與約 20 IU/dL、約 3 與約 20 IU/dL、約 4 與約 20 IU/dL、約 5 與約 20 IU/dL、約 6 與約 20 IU/dL、約 7 與約 20 IU/dL、約 8 與約 20 IU/dL、約 9 與約 20 IU/dL、或約 10 與約 20 IU/dL。治療疾病或病狀亦可包括使個體體內之 FVIII 活性維持在類似於非血友病個體體內 FVIII 活性之至少約 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或 20%的程度。治療所需之最小谷底含量可藉由一或多種已知方法進行量測且可針對每個人進行調整(增加或減少)。

嵌合蛋白

[0100] 本發明係有關使用 VWF 片段及 XTEN 序列，藉由阻止或抑制 FVIII 半衰期限制因素(亦即內源性 VWF)與 FVIII 蛋白質締合來延長因子 VIII 蛋白質之半衰期。內

源性 VWF 與約 95%至約 98%之 FVIII 締合成非共價複合物。儘管內源性 VWF 為 FVIII 半衰期限制因素，但亦已知內源性 VWF 結合於 FVIII 蛋白質會以各種方式保護 FVIII。舉例而言，全長 VWF(呈具有約 250 kDa 之多聚體形式)可保護 FVIII 免遭蛋白酶裂解及 FVIII 活化，穩定化 FVIII 重鏈及/或輕鏈，且阻止 FVIII 由清除受體清除。但同時，內源性 VWF 藉由阻止胞飲作用及藉由經由 VWF 清除路徑自系統清除 FVIII-VWF 複合物而限制 FVIII 半衰期。儘管不受理論束縛，但咸信內源性 VWF 為阻止融合於半衰期延長劑之 FVIII 蛋白質之半衰期長於野生型 FVIII 之約兩倍的半衰期限制因素。因此，本發明係有關使用 VWF 片段來阻止或抑制內源性 VWF 與 FVIII 蛋白質之間的相互作用，藉此藉由使用單獨 XTEN 序列或 XTEN 序列與 Ig 恆定區或其部分之組合來增加 FVIII 蛋白質之半衰期。XTEN 序列可連接於 FVIII 蛋白質或 VWF 片段。因此，與 VWF 片段締合之 FVIII 蛋白質更緩慢地由一或多種 VWF 清除受體自循環清除且接著相較於野生型 FVIII 或無 VWF 片段之 FVIII 蛋白質，可使 XTEN 序列或 XTEN 序列與 Ig 恆定區之組合之半衰期充分延長。

[0101] 在一個實施例中，VWF 片段藉由共價或非共價鍵與 FVIII 蛋白質締合(或連接)。然而，在一些情況下，VWF 片段與 FVIII 蛋白質之間的物理阻斷或化學締合(例如非共價鍵結)之強度可能不足以在內源性 VWF 存在下提供包含 FVIII 蛋白質及 VWF 片段之穩定複合物。舉

例而言，在無任何其他連接下與 FVIII 蛋白質形成非共價鍵之 VWF 片段在活體內在內源性 VWF 存在下可能易於解離，從而該 VWF 片段(例如重組 VWF，亦即 rVWF)經內源性 VWF 置換。因此，非共價結合於內源性 VWF 之 FVIII 蛋白質將經歷 VWF 清除路徑且易於自系統清除。為阻止 VWF 片段與 FVIII 蛋白質解離，在一些實施例中，FVIII 蛋白質與 VWF 片段之間的締合或鍵聯為共價鍵，例如肽鍵、一或多個胺基酸、或二硫鍵。在某些實施例中，輔助部分與 FVIII 蛋白質之間的締合(亦即鍵聯)為 FVIII 蛋白質與 VWF 片段之間的肽鍵或連接子(「FVIII/VWF 連接子」)。連接子之非限制性實例在本文中其他地方描述。在一些實施例中，VWF 片段為包含以下、基本上由以下組成、或由以下組成之多肽：至少約 10、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2500、3000 或 4000 個胺基酸。VWF 片段之非限制性實例在本文中其他地方描述。

[0102] 在某些實施例中，VWF 片段以化學方式(例如非共價地)結合或以物理方式阻斷 FVIII 蛋白質上之一或多個 VWF 結合位點。FVIII 蛋白質上之 VWF 結合位點位於 FVIII 蛋白質之 A3 域或 C2 域內。在其他實施例中，FVIII 蛋白質上之 VWF 結合位點位於 A3 域及 C2 域內。舉例而言，FVIII 蛋白質上之 VWF 結合位點可對應於 SEQ ID NO: 4[全長成熟 FVIII]之胺基酸 1669 至 1689 及/或

2303 至 2332。

[0103] 本發明亦提供一種進一步包含一或多個提供額外半衰期延長性質之 XTEN 序列的嵌合蛋白(包含 FVIII 蛋白質及 VWF 片段)。一或多個 XTEN 序列可插入在 FVIII 蛋白質或 VWF 片段內或連接於 FVIII 蛋白質或 VWF 片段之 N 末端或 C 末端。本發明亦包括一種連接於 XTEN 序列(第一半衰期延長部分)及 Ig 恆定區或其部分(第二半衰期延長部分)的 FVIII 蛋白質，以便兩個半衰期延長部分經由兩種不同機制延長 FVIII 蛋白質之半衰期。

[0104] 在一些實施例中，嵌合蛋白包含連接於第一 Ig 恆定區或其部分(例如第一 FcRn 結合搭配物)之 FVIII 蛋白質、連接於第二 Ig 恆定區或其部分(例如第二 FcRn 結合搭配物)之 VWF 片段、及一或多個插入或連接於該 FVIII 蛋白質或該 VWF 片段之 XTEN 序列，其中該 VWF 片段阻止 FVIII 半衰期限制因素(例如內源性 VWF)結合該 FVIII 蛋白質，其中第一及第二 Ig 恆定區或其部分形成共價鍵(例如二硫鍵)，且一或多個 XTEN 序列延長該 FVIII 蛋白質之半衰期。

[0105] 在某些實施例中，本發明之嵌合蛋白包含由視情況選用之連接子(亦即 FVIII/VWF 連接子)連接於 VWF 片段之 FVIII 蛋白質及一或多個插入或連接於該 FVIII 蛋白質或該 VWF 片段之 XTEN 序列，其中該 VWF 片段阻止 FVIII 半衰期限制因素(例如內源性 VWF)結合該 FVIII 蛋白質且該一或多個 XTEN 序列延長該 FVIII 蛋白

質之半衰期。在一個態樣中，視情況選用之連接子(FVIII/VWF 連接子)包含分選酶識別基元。在另一態樣中，視情況選用之連接子(FVIII/VWF 連接子)包含可裂解位點。裂解連接子(亦即含有一或多個裂解位點之連接子)之實例在本文中其他地方描述。

[0106] 本發明之嵌合蛋白包括(但不限於)：

(1)包含 D'域及 D3 域之 VWF 片段、XTEN 序列及 FVIII，其中該 XTEN 序列連接於該 VWF 片段；

(2)FVIII 蛋白質、XTEN 序列及 Ig 恆定區或其部分，其中該 FVIII 蛋白質連接於 XTEN 序列及該 Ig 恆定區或其部分，或

(3)FVIII 蛋白質、XTEN 序列及 VWF 片段，其中該 XTEN 序列在 C 末端或 N 末端連接於該 FVIII 蛋白質或緊靠 FVIII 之一或多個胺基酸(例如一或多個 XTEN 插入位點)之下游插入，且該 VWF 片段與該 FVIII 蛋白質彼此締合。

(1)連接於 XTEN 及 FVIII 之范威爾邦德因子(VWF)片段

[0107] 本發明係有關一種嵌合蛋白，其包含(i)包含 VWF 之 D'域及 D3 域之 VWF 片段，(ii)XTEN 序列、及(iii)FVIII 蛋白質，其中(i)、(ii)及(iii)彼此連接或締合。作為本發明嵌合蛋白之一部分連接於 XTEN 序列的 VWF 片段與 FVIII 蛋白質締合，由此阻止或抑制內源性 VWF 與 FVIII 蛋白質之間的相互作用。在某些實施例中，能夠

阻止或抑制 FVIII 蛋白質與內源性 VWF 結合之 VWF 片段可同時具有至少一種 VWF 樣 FVIII 保護性質。VWF 樣 FVIII 保護性質之實例包括(但不限於)保護 FVIII 免遭蛋白酶裂解及 FVIII 活化，穩定化 FVIII 重鏈及/或輕鏈，及阻止 FVIII 由清除受體清除。因此，VWF 片段可阻止經由 VWF 清除路徑清除 FVIII 蛋白質，由此減少 FVIII 自系統之清除。在一些實施例中，本發明之 VWF 片段結合 FVIII 蛋白質或與 FVIII 蛋白質締合及/或物理或化學阻斷 FVIII 蛋白質上之 VWF 結合位點。因此，相較於野生型 FVIII 或未與 VWF 片段締合之 FVIII，與 VWF 片段締合之 FVIII 蛋白質更緩慢地自循環清除。

[0108] 在一個實施例中，本發明係有關一種嵌合蛋白，其包含(i)包含 VWF 之 D'域及 D3 域之 VWF 片段，(ii)XTEN 序列，及(iii)FVIII 蛋白質，其中該 XTEN 序列連接於該 VWF 片段(例如(a1)V-X 或(a2)X-V，其中 V 包含 VWF 片段且 X 包含 XTEN 序列)，且該 VWF 片段與該 FVIII 蛋白質連接或締合。在另一實施例中，VWF 片段與 XTEN 序列可藉由連接子(例如(a3)V-L-X 或(a4)X-L-V)或肽鍵連接。連接子可為可在凝血部位處裂解之可裂解連接子，例如凝血酶可裂解連接子。在其他實施例中，將 VWF 片段、XTEN 序列及 FVIII 蛋白質安置在單一多肽鏈中。在其他實施例中，嵌合蛋白包含兩條多肽鏈，第一鏈包含 VWF 片段及 XTEN 序列且第二鏈包含 FVIII 蛋白質。在其他實施例中，嵌合蛋白包含三條多肽鏈，第一鏈

包含 VWF 片段及 XTEN 序列，第二鏈包含 FVIII 之輕鏈且第三鏈包含 FVIII 之重鏈，其中該第一鏈及該第二鏈彼此締合(例如共價鍵，例如二硫鍵)，且該第二鏈與該第三鏈彼此締合(例如金屬鍵)。在其他實施例中，XTEN 序列可連接於 VWF 片段之 N 末端或 C 末端或緊靠 VWF 片段中之一或多個胺基酸之下游插入。

[0109] 在某些實施例中，本發明之嵌合蛋白包含含有以下之式：

- (a) V-X-FVIII，
- (b) FVIII-X-V，
- (c) V-X:FVIII，
- (d) X-V:FVIII，
- (e) FVIII:V-X，
- (f) FVIII:X-V，或
- (a5) X-V-FVIII，

其中 V 包含 VWF 片段，

X 包含一或多個 XTEN 序列，

FVIII 包含 FVIII 蛋白質；

(-)表示肽鍵或一或多個胺基酸；且

(:)爲化學締合或物理締合。在一個實施例中，(:)表示化學締合，例如至少一個非肽鍵。在另一實施例中，化學締合(亦即(:))爲共價鍵。在其他實施例中，化學締合(亦即(:))爲非共價相互作用，例如離子相互作用、疏水性相互作用、親水性相互作用、凡得瓦相互作用或氫鍵。在其他實

施例中，(:)爲非肽共價鍵。在其他實施例中，(:)爲肽鍵。在其他實施例中，(:)表示兩個序列之間的物理締合，其中第一序列之一部分緊密接近於第二序列以使該第一序列遮蔽或阻斷該第二序列之一部分與另一部分相互作用，且進一步使此物理締合得以維持而不允許該第二序列與其他部分相互作用。本文多肽式之定向係自 N 末端(左)至 C 末端(右)列出。舉例而言，式 V-X-FVIII 意謂式 NH₂-V-X-FVIII-COOH。在一個實施例中，本文所述之式可在兩個部分之間包含任何其他序列。舉例而言，除非另外規定，否則式 V-X-FVIII 可進一步在 V 之 N 末端、V 與 X 之間、X 與 FVIII 之間、或在 FVIII 之 C 末端包含任何序列。在另一實施例中，連字符(-)指示肽鍵。

[0110] 在其他實施例中，本發明之嵌合蛋白包含含有以下之式：

- (a) V(X1)-X2-FVIII，
- (b) FVIII-X2-V(X1)，
- (c) V(X1):FVIII，
- (d) FVIII:V(X1)，或
- (a5) X2-V(X1)-FVIII，

其中 V(X1)包含 VWF 片段及第一 XTEN 序列(X1)，其中該 XTEN 序列緊靠該 VWF 片段中之一或多個胺基酸之下游插入，

X2 包含一或多個視情況選用之 XTEN 序列，

FVIII 包含 FVIII 蛋白質；

(-)爲肽鍵或一或多個胺基酸；且

(:)爲化學締合或物理締合。

[0111] 在一些實施例中，嵌合蛋白包含(i)包含 VWF 之 D'域及 D3 域之 VWF 片段，(ii)XTEN 序列，(iii)FVIII 蛋白質，(iv)第一視情況選用之連接子，及(v)第二視情況選用之連接子，其中該 XTEN 序列藉由該連接子連接於該 VWF 片段及/或該 FVIII 蛋白質。在某些實施例中，嵌合蛋白包含含有以下之式：

(b1) V-L1-X-L2-FVIII，

(b2) FVIII-L2-X-L1-V，

(b3) V-L1-X:FVIII，

(b4) X-L1-V:FVIII，

(b5) FVIII:V-L1-X，

(b6) FVIII:X-L1-V，

(b7) X-L1-V-L2-FVIII，或

(b8) FVIII-L2-V-L1-X，

其中 V 包含 VWF 片段，

X 包含一或多個 XTEN 序列，

FVIII 包含 FVIII 蛋白質，

L1 包含第一視情況選用之連接子，例如第一可裂解連接子，

L2 包含第二視情況選用之連接子，例如第二可裂解連接子或視情況選用之可加工連接子；

(-)爲肽鍵或一或多個胺基酸；且

(:)爲化學締合或物理締合。在一個實施例中，(:)表示化學締合，例如至少一個非肽鍵。在另一實施例中，化學締合(亦即(:))爲共價鍵。在其他實施例中，化學締合(亦即(:))爲非共價相互作用，例如離子相互作用、疏水性相互作用、親水性相互作用、凡得瓦相互作用或氫鍵。在其他實施例中，(:)爲非肽共價鍵。在其他實施例中，(:)爲肽鍵。在其他實施例中，(:)表示兩個序列之間的物理締合，其中第一序列之一部分緊密接近於第二序列以使該第一序列遮蔽或阻斷該第二序列之一部分與另一部分相互作用，且進一步使此物理締合得以維持而不允許該第二序列與其他部分相互作用。本文多肽式之定向係自 N 末端(左)至 C 末端(右)列出。舉例而言，式(b1)V-L1-X-L2-FVIII 意謂式 NH₂-V-L1-X-L2-FVIII-COOH。在一個實施例中，本文所述之式可在兩個部分之間包含任何其他序列。在另一實施例中，連字符(-)指示肽鍵。

[0112] 本發明之另一態樣在於提供一種不與 FVIII 半衰期限限制因素(例如內源性 VWF)相互作用，且同時使用 XTEN 序列(第一半衰期延長劑)與第二半衰期延長劑或在 FVIII 蛋白質與 VWF 片段之間提供共價鍵之部分(例如 Ig 恆定區或其部分)的組合使 FVIII 蛋白質之半衰期達到最大的 FVIII 嵌合蛋白。在一個實施例中，本發明之嵌合蛋白包含(i)包含 VWF 之 D'域及 D3 域之 VWF 片段，(ii)XTEN 序列，(iii)FVIII 蛋白質，及(iv)Ig 恆定區或其部分(在本文中亦稱爲 F)，其中(1)該 VWF 片段藉由視情況選用之連

接子(例如可裂解連接子)連接於該 XTEN 序列，(2)該 VWF 片段藉由另一視情況選用之連接子(例如可裂解連接子)與該 FVIII 蛋白質締合或連接，且(3)該 Ig 恆定區或其部分連接於該 VWF 片段、該 XTEN 序列或該 FVIII 蛋白質。在另一實施例中，本發明之嵌合蛋白包含(i)包含 VWF 之 D'域及 D3 域之 VWF 片段，(ii)XTEN 序列，(iii)FVIII 蛋白質，(iv)Ig 恆定區或其部分(F1 或第一 Ig 恆定區或其部分)，及(v)另一 Ig 恆定區或其部分(F2 或第二 Ig 恆定區或其部分)，其中(1)該 VWF 片段藉由視情況選用之連接子(例如可裂解連接子)連接於該 XTEN 序列，(2)該 XTEN 序列或該 VWF 片段連接於該 Ig 恆定區或其部分，(3)該 FVIII 連接於該另一 Ig 恆定區或其部分，且(4)該 Ig 恆定區或其部分與該另一 Ig 恆定區或其部分締合或連接。在一個實施例中，兩個 Ig 恆定區或其部分之間的締合或鍵聯為共價鍵，例如二硫鍵。在另一實施例中，兩個 Ig 恆定區或其部分之間的締合或鍵聯為可加工連接子，其中該可加工連接子由蛋白酶在細胞內加工。舉例而言，嵌合蛋白包含含有以下之式：

(g) V-L2-X-L1-F1: FVIII-L3-F2；

(h) V-L2-X-L1-F1:F2-L3-FVIII；

(i) F-L1-X-L2-V: FVIII-L3-F2；

(j) F-L1-X-L2-V:F2-L3-FVIII；

(k) V-L2-X-L1-F1-L4-FVIII-L3-F2；

(l) F2-L3-FVIII-L4-F1-L1-X-L2-V；

(m) FVIII-L2-F2-L4-V-L2-X-L1-F1；或

(n) F1-L1-X-L2-V-L4-F2-L2-FVIII，

其中 V 包含 VWF 片段，

L1 及 L3 各自包含視情況選用之連接子，

L2 包含視情況選用之連接子，例如可裂解連接子，

L4 為視情況選用之連接子，例如可加工連接子，

FVIII 包含 FVIII 蛋白質，

X 包含一或多個 XTEN 序列，

F1 包含視情況選用之 Ig 恆定區或其部分，

F2 包含視情況選用之另一 Ig 恆定區或其部分；

(-)為肽鍵或一或多個胺基酸；且

(:)為化學締合或物理締合。

[0113] 在一些實施例中，本文揭露之任何構築體或式中之 FVIII 蛋白質可進一步包含至少一個、至少兩個、至少三個、至少四個、至少五個或至少六個 XTEN 序列，該等 XTEN 序列各自緊靠 FVIII 蛋白質中之一或多個胺基酸之下游插入或連接於 FVIII 蛋白質之 N 末端或 C 末端。XTEN 插入位點之非限制性實例在本文中其他地方加以揭露。

[0114] 在一個實施例中，(:)表示化學締合，例如至少一個非肽鍵。在另一實施例中，化學締合(亦即(:))為共價鍵。在其他實施例中，化學締合(亦即(:))為非共價相互作用，例如離子相互作用、疏水性相互作用、親水性相互作用、凡得瓦相互作用或氫鍵。在其他實施例中，(:)為非

肽共價鍵。在其他實施例中，(:)為肽鍵。在其他實施例中，(:)表示兩個序列之間的物理締合，其中第一序列之一部分緊密接近於第二序列以使該第一序列遮蔽或阻斷該第二序列之一部分與另一部分相互作用，且進一步使此物理締合得以維持而不允許該第二序列與其他部分相互作用。本文多肽式之定向係自 N 末端(左)至 C 末端(右)列出。舉例而言，式(n)F1-L1-X-L2-V-L4-F2-L2-FVIII 意謂式 NH₂-F1-L1-X-L2-V-L4-F2-L2-FVIII-COOH。在一個實施例中，本文所述之式可在兩個部分之間包含任何其他序列。在另一實施例中，連字符(-)指示肽鍵。

[0115] 在一個實施例中，連接於 VWF 片段或 FVIII 蛋白質之 Ig 恆定區或其部分(在本文中有時由「F」或「F1」指示)及另一 Ig 恆定區或其部分(在本文中有時由「F2」指示)中之任一者或兩者可延長 VWF 片段、FVIII 蛋白質或兩者之半衰期。在另一實施例中，一對各自連接於 VWF 片段及 FVIII 蛋白質之 Ig 恆定區或其部分(在本文中有時由「F」或「F1」指示)及另一 Ig 恆定區或其部分(在本文中有時由「F2」指示)在 FVIII 蛋白質與 VWF 片段之間提供強於非共價鍵之鍵，亦即共價鍵(例如二硫鍵)，藉此阻止內源性 VWF 活體內置換 VWF 片段。F1 或 F2 可包含 Fc 區或 FcRn 結合搭配物。在其他實施例中，連接於 VWF 片段及/或 FVIII 蛋白質之 F1 及 F2 中之任一者或兩者在 F1 與 F2 之間形成共價鍵(例如二硫鍵)，藉此緊密接近安置 VWF 片段及 FVIII 蛋白質以阻止 FVIII 蛋白質與

VWF 片段相互作用。在一些實施例中，F1 與 F2 相同或不同。F1 及 F2 之非限制性實例可選自由以下組成之群：CH1 域、CH2 域、CH3 域、CH4 域、鉸鏈域、其任何功能性片段、衍生物或類似物及其兩種或兩種以上組合。在一個實施例中，F1、F2 或兩者包含至少一個 CH1 域、至少一個 CH2 域、至少一個 CH3 域、至少一個 CH4 域或其功能性片段、衍生物或類似物。在另一實施例中，F1、F2 或兩者包含至少一個鉸鏈域或其部分及至少一個 CH2 域或其部分(例如以鉸鏈-CH2 定向)。在其他實施例中，F1、F2 或兩者包含至少一個 CH2 域或其部分及至少一個 CH3 域或其部分(例如以 CH2-CH3 定向)。組合之實例包括(但不限於)CH2 域、CH3 域及鉸鏈域，其亦稱為 Fc 區(或 Fc 域)，例如就 F1 而言之第一 Fc 區或第一 FcRn 結合搭配物及就 F2 而言之第二 Fc 區或第二 FcRn 結合搭配物。在其他實施例中，F1 藉由連接子連接於 VWF 片段，及/或 F2 藉由連接子連接於 FVIII 蛋白質。在一些實施例中，F1 及/或 F2 包含鉸鏈區、基本上由鉸鏈區組成或由鉸鏈區組成。Fc 區或 FcRn 結合搭配物之其他非限制性實例在本文中其他地方加以描述。

[0116] 在某些實施例中，本發明之嵌合蛋白包含兩條多肽鏈，第一多肽鏈包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：包含 D'域及 D3 域之 VWF 片段、XTEN 序列、第一 Ig 恆定區或其部分(例如第一 Fc 區)、及在該 VWF 片段與該 XTEN 序列或該 XTEN 序列或該第一 Ig 恆定區或

其部分之間的視情況選用之連接子，且第二多肽鏈包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：FVIII 蛋白質及第二 Ig 恆定區或其部分(例如第二 Fc 區)。VWF 片段與第一 Ig 恆定區或其部分之間的連接子可為可在凝血部位處裂解之可裂解連接子，例如凝血酶可裂解連接子。在一些實施例中，第一多肽鏈與第二多肽鏈彼此締合。第一鏈與第二鏈之間的締合阻止包含 VWF 片段之第一鏈在活體內經內源性 VWF 置換。在一個實施例中，第一鏈與第二鏈之間的締合可為共價鍵。在一特定實施例中，共價鍵為二硫鍵。在一些實施例中，第二鏈中之 FVIII 蛋白質進一步包含一或多個連接於 FVIII 蛋白質之 C 末端或 N 末端或緊靠 FVIII 蛋白質中之一或多個胺基酸(例如至少一個本文揭露之插入位點)之下游插入的 XTEN 序列。插入位點之非限制性實例在本文中其他地方加以描述。

[0117] 在其他實施例中，本發明之嵌合蛋白包含三條多肽鏈，其中第一多肽鏈包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：FVIII 蛋白質之重鏈，第二多肽鏈包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：融合於第一 Ig 恆定區或其部分(例如第一 Fc 區)之 FVIII 蛋白質輕鏈，且第三多肽鏈包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：包含 D'域及 D3 域之 VWF 片段、XTEN 序列、第二 Ig 恆定區或其部分(例如第二 Fc 區)、及在該 XTEN 序列與該第二 Ig 恆定區或其部分之間或在該 VWF 片段與該 XTEN 序列之間的視情況選用之連接子。第三鏈中之連接子可為在

凝血部位處裂解之可裂解連接子，例如凝血酶裂解位點。在一些實施例中，重鏈 FVIII 或輕鏈 FVIII 連接於一或多個可連接於 N 末端、C 末端或插入在 FVIII 序列內之一或多個插入位點內之 XTEN 序列。插入位點之非限制性實例在本文中其他地方加以揭露。

[0118] 在其他實施例中，本發明之嵌合蛋白包含兩條多肽鏈，第一多肽鏈包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：FVIII 蛋白質之重鏈，且第二多肽鏈包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：FVIII 蛋白質之輕鏈、第一 Ig 恆定區或其部分(例如第一 Fc 區)、第一連接子(例如含有一或多個包含一或多個細胞內加工位點之蛋白酶裂解位點之可加工連接子)、VWF 片段、第二連接子(例如凝血酶可裂解連接子)、XTEN 序列及第二 Ig 恆定區或其部分(例如第二 Fc 區)，其中該 FVIII 蛋白質之該輕鏈連接於藉由該第一連接子進一步連接於該 VWF 片段之該第一 Ig 恆定區或其部分(例如該第一 Fc 區)，且其中該 VWF 片段連接於藉由該第二連接子進一步連接於該第二 Ig 恆定區或其部分之該 XTEN 序列。在某些實施例中，第一連接子為可加工連接子，且第二連接子為可裂解連接子。在表現時，嵌合蛋白可由裂解可加工連接子之細胞內加工酶加工，且因此嵌合蛋白可包含三條多肽鏈、基本上由三條多肽鏈組成或由三條多肽鏈組成。此外，VWF 片段可由於可裂解連接子而在凝血部位處裂解去除。

[0119] 在某些實施例中，本發明之嵌合蛋白包含一

條多肽鏈，其包含單鏈 FVIII 蛋白質、第一 Ig 恆定區或其部分(例如第一 Fc 區)、第一連接子(例如可加工連接子)、VWF 片段、XTEN 序列、第二連接子(例如凝血酶可裂解連接子)及第二 Ig 恆定區或其部分(例如第二 Fc 區)，其中該單鏈 FVIII 蛋白質連接於亦藉由該第一連接子連接於 VWF 片段之該第一 Ig 恆定區或其部分，且該 VWF 片段連接於進一步連接於該第二 Ig 恆定區或其部分之該 XTEN 序列。在一個實施例中，VWF 片段與 XTEN 序列係藉由第二連接子連接。在另一實施例中，XTEN 序列與第二 Ig 恆定區或其部分藉由第二連接子連接。在其他實施例中，第二鏈進一步包含第三連接子。因此，單一多肽鏈可包含藉由第二連接子連接於 XTEN 序列之 VWF 片段及藉由第三連接子連接於第二 Ig 恆定區或其部分之 XTEN。第二連接子與第三連接子可相同或不同。在一個實施例中，第一連接子為可加工連接子。在另一實施例中，第二連接子或第三連接子為包含一或兩個可裂解位點之可裂解連接子。在一特定實施例中，第二連接子為凝血酶可裂解連接子。適用於本發明中之連接子在本文中其他地方加以描述。

(2)FVIII、XTEN 及 Fc

[0120] 本發明之嵌合蛋白亦包含(i)FVIII 蛋白質，(ii)XTEN 序列(第一半衰期延長劑)，及(iii)Ig 恆定區或其部分(第二半衰期延長劑)，其中該 XTEN 序列藉由視情況選用之連接子連接於該 FVIII 蛋白質且藉由另一視情況選

用之連接子連接於該 Ig 恆定區或其部分。XTEN 序列及 Ig 恆定區或其部分可共同用於延長 FVIII 蛋白質之半衰期。在一個實施例中，嵌合蛋白為單體。在另一實施例中，嵌合蛋白為二聚體(均二聚體或雜二聚體)。

[0121] 本發明亦係有關一種嵌合蛋白，其包含 (i)FVIII 蛋白質，(ii)XTEN 序列，(iii)Ig 恆定區或其部分(亦即第一 Ig 恆定區或其部分、「F」或「F1」)，及(iv)另一 Ig 恆定區或其部分(亦即第二 Ig 恆定區或其部分或「F2」)。在一個實施例中，XTEN 序列在 C 末端或 N 末端連接於 FVIII 蛋白質或緊靠 FVIII 蛋白質中之一或多個胺基酸(例如一或多個 XTEN 插入位點)之下游插入，FVIII 蛋白質連接於第一 Ig 恆定區或其部分，且第一 Ig 恆定區或其部分與第二 Ig 恆定區或其部分藉由視情況選用之連接子彼此締合或連接。在某些態樣中，嵌合蛋白為包含第一多肽鏈及第二多肽鏈之單體-二聚體雜交物，其中該第一多肽鏈包含 FVIII 蛋白質、XTEN 序列及第一 Ig 恆定區或其部分，且該第二多肽鏈包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：無 FVIII 蛋白質之第二 Ig 恆定區或其部分，且其中該第一鏈與該第二鏈彼此締合。Ig 恆定區或其部分(例如第一 Fc 區)與另一 Ig 恆定區或其部分(例如第二 Fc 區)之間的締合為化學締合或物理締合。在某些實施例中，化學締合為共價鍵。在其他實施例中，化學締合為非共價相互作用，例如離子相互作用、疏水性相互作用、親水性相互作用、凡得瓦相互作用或氫鍵。在其他實施例

中，締合為非肽共價鍵。在其他實施例中，締合為肽鍵。

[0122] 在其他態樣中，嵌合蛋白為包含 FVIII 蛋白質、XTEN 序列、第一 Ig 恆定區或其部分、連接子(例如可加工連接子)及第二 Ig 恆定區或其部分之單一多肽鏈，其中該單一多肽鏈在表現之後由細胞內酶加工且變成兩條多肽鏈。

[0123] 在一個實施例中，連接於 FVIII 蛋白質之 Ig 恆定區或其部分(在本文中有時由「F」或「F1」指示)可連同 XTEN 序列一起延長 FVIII 蛋白質之半衰期。在另一實施例中，Ig 恆定區或其部分(「F」或「F1」)為在本文中其他地方描述之 Fc 區或 FcRn 結合搭配物。

[0124] 在其他實施例中，與第一 Ig 恆定區或其部分締合或連接之另一 Ig 恆定區或其部分(在本文中有時由「F2」或第二 Ig 恆定區或其部分指示)亦可延長 FVIII 蛋白質之半衰期。在其他實施例中，第二 Ig 恆定區或其部分(「F2」)連同第一 Ig 恆定區或其部分及 XTEN 序列一起可延長 FVIII 蛋白質之半衰期。另一 Ig 恆定區或其部分可為在本文中其他地方描述之 Fc 區或 FcRn 結合搭配物。

[0125] 在某些實施例中，與第一 Ig 恆定區或其部分締合之第二 Ig 恆定區或其部分進一步連接於在本文中其他地方描述之 VWF 片段及視情況選用之 XTEN 序列。

[0126] 在一些實施例中，Ig 恆定區或其部分(「F」或「F1」或第一 Ig 恆定區或其部分)及另一 Ig 恆定區或其部分(亦即第二 Ig 恆定區或其部分或「F2」)中之任一者或

兩者(在此段落中指示為「Ig 恆定區或其部分」)可包括(但不限於)CH1 域、CH2 域、CH3 域、CH4 域、鉸鏈域、其任何功能性片段、衍生物或類似物或其兩種或兩種以上組合。在一個實施例中，Ig 恆定區或其部分包含至少一個 CH1 域、至少一個 CH2 域、至少一個 CH3 域、至少一個 CH4 域或其功能性片段、衍生物或類似物。在另一實施例中，Ig 恆定區或其部分包含至少一個鉸鏈域或其部分及至少一個 CH2 域或其部分(例如以鉸鏈-CH2 定向)。在其他實施例中，Ig 恆定域或其部分包含至少一個 CH2 域或其部分及至少一個 CH3 域或其部分(例如以 CH2-CH3 定向)。組合之實例包括(但不限於)CH2 域、CH3 域及鉸鏈域，其亦稱為 Fc 區(或 Fc 域)，例如第一 Fc 區。Ig 恆定區或其部分之其他實例在本文中其他地方加以描述。

[0127] 相較於野生型 FVIII，本發明之嵌合蛋白可具有延長之 FVIII 蛋白質半衰期。在一個實施例中，FVIII 蛋白質之半衰期延長至野生型 FVIII 之半衰期之至少約 1.5 倍、至少約 2 倍、至少約 2.5 倍、至少約 3 倍、至少約 4 倍、至少約 5 倍、至少約 6 倍、至少約 7 倍、至少約 8 倍、至少約 9 倍、至少約 10 倍、至少約 11 倍或至少約 12 倍長。在另一實施例中，FVIII 蛋白質之半衰期為至少約 10 小時、至少約 11 小時、至少約 12 小時、至少約 13 小時、至少約 14 小時、至少約 15 小時、至少約 16 小時、至少約 17 小時、至少約 18 小時、至少約 19 小時、至少約 20 小時、至少約 21 小時、至少約 22 小時、至少

約 23 小時、至少約 24 小時、至少約 36 小時、至少約 48 小時、至少約 60 小時、至少約 72 小時、至少約 84 小時、至少約 96 小時或至少約 108 小時。

(3)FVIII、XTEN 及 VWF

[0128] 在一個態樣中，本發明之嵌合蛋白包含 (i)FVIII 蛋白質，(ii)XTEN 序列，及(iii)包含 VWF 之 D' 域及 D3 域之 VWF 片段，其中該 FVIII 蛋白質連接於該 XTEN 序列且其中該 FVIII 蛋白質與該 VWF 片段締合或連接。在一個實施例中，本文所述之嵌合蛋白之 VWF 片段不能夠結合 VWF 清除受體。在另一實施例中，VWF 片段能夠保護 FVIII 蛋白質免遭一或多種蛋白酶裂解、保護 FVIII 蛋白質免遭活化、穩定化 FVIII 蛋白質之重鏈及/或輕鏈、或阻止 FVIII 蛋白質由一或多種清除受體清除。在其他實施例中，VWF 片段阻止或抑制內源性 VWF 結合 FVIII 蛋白質中之 VWF 結合位點。VWF 結合位點可位於 FVIII 蛋白質之 A3 域或 C2 域中或位於 A3 域與 C2 域兩者中。在一特定實施例中，VWF 結合位點包含對應於 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 1669 至 1689 及/或胺基酸 2303 至 2332 之胺基酸序列。

[0129] 在另一態樣中，嵌合蛋白包含 (i)FVIII 蛋白質，(ii)XTEN 序列，(iii)VWF 片段，其包含 VWF 之 D' 域及 D3 域，及(iv)Ig 恆定區或其部分，其中該 XTEN 序列在 C 末端或 N 末端連接於該 FVIII 蛋白質或緊靠 FVIII 蛋

白質中之一或多個胺基酸(例如一或多個本文揭露之 XTEN 插入位點)之下游插入，該 VWF 片段與該 FVIII 蛋白質或該 XTEN 序列連接或締合，且該 Ig 恆定區或其部分連接於該 FVIII 蛋白質、該 XTEN 序列、該 VWF 片段或其任何組合。適用於本發明之嵌合蛋白之 Ig 恆定區或其部分在本文中其他地方加以描述。在一個實施例中，Ig 恆定區或其部分能夠延長 FVIII 蛋白質之半衰期。在另一實施例中，Ig 恆定區或其部分包含第一 Fc 區或第一 FcRn 結合搭配物。在其他實施例中，Ig 恆定區或其部分藉由視情況選用之連接子連接於 FVIII 蛋白質。在其他實施例中，連接子包含可裂解連接子。嵌合蛋白可為含有(i)、(ii)、(iii)及(iv)之單一多肽鏈，亦即單體(亦即單鏈)；或可為含有包含(i)及(ii)之第一鏈及包含(iii)及(iv)之第二鏈的兩條鏈。在其他態樣中，嵌合蛋白為二聚體(例如均二聚體或雜二聚體)。在一個實施例中，嵌合蛋白包含各自包含(i)、(ii)、(iii)及(iv)之兩條鏈。

[0130] 在某些實施例中，嵌合蛋白包含(i)FVIII 蛋白質，(ii)XTEN 序列，(iii)VWF 片段，其包含 VWF 之 D'域及 D3 域，(iv)Ig 恆定區或其部分(有時亦指示為「F」、「第一 Ig 恆定區或其部分」或「F2」)，及(v)另一 Ig 恆定區或其部分(有時亦指示為「F2」或「第二 Ig 恆定區或其部分」)，其中(1)該 FVIII 蛋白質在該 FVIII 蛋白質之 C 末端或 N 末端連接於該 XTEN 序列或緊靠該 FVIII 蛋白質中之一或多個胺基酸(例如一或多個本文揭露之 XTEN 插

入位點)之下游插入，(2)該 XTEN 序列或該 FVIII 蛋白質連接於該 Ig 恆定區或其部分，(3)該 VWF 片段連接於該第二 Ig 恆定區或其部分，且(4)該 Ig 恆定區或其部分與該第二 Ig 恆定區或其部分締合。在一個實施例中，連接於 FVII 蛋白質或 XTEN 序列之 Ig 恆定區或其部分藉由連接子(例如可加工連接子)進一步連接於 VWF 片段。在另一實施例中，適用於本發明之嵌合蛋白之另一 Ig 恆定區或其部分可藉由視情況選用之連接子(例如可加工連接子)進一步連接於 FVIII 蛋白質或 Ig 恆定區或其部分。在一些實施例中，一對各自連接於 VWF 片段及 FVIII 蛋白質之 Ig 恆定區或其部分及另一 Ig 恆定區或其部分在 FVIII 蛋白質與 VWF 片段之間提供強於非共價鍵之鍵，亦即共價鍵(例如二硫鍵)，藉此阻止內源性 VWF 活體內置換 VWF 片段。在其他實施例中，Ig 恆定區或其部分及另一 Ig 恆定區或其部分中之任一者或兩者能夠延長 FVIII 蛋白質或 VWF 片段之半衰期。在其他實施例中，另一 Ig 恆定區或其部分包含第二 Fc 區或 FcRn 結合搭配物。在嵌合蛋白中，Ig 恆定區或其部分與另一 Ig 恆定區或其部分相同或不同。

[0131] 在某些實施例中，Ig 恆定區或其部分與另一 Ig 恆定區或其部分藉由化學締合或物理締合進行締合。在一個實施例中，化學締合(亦即(:))為至少一個非肽鍵。在某些實施例中，化學締合(亦即(:))為共價鍵。在其他實施例中，化學締合(亦即(:))為非共價相互作用，例如離子相

互作用、疏水性相互作用、親水性相互作用、凡得瓦相互作用或氫鍵。在其他實施例中，(:)爲非肽共價鍵。在其他實施例中，(:)爲肽鍵。在其他實施例中，(:)表示兩個序列之間的物理締合，其中第一序列之一部分緊密接近於第二序列以使該第一序列遮蔽或阻斷該第二序列之一部分與另一部分相互作用。在一些實施例中，Ig 恆定區或其部分與另一 Ig 恆定區或其部分之間的締合可爲阻止 VWF 片段或含有 VWF 片段之多肽經內源性 VWF 置換之共價鍵，例如二硫鍵。因此，阻止 FVIII 蛋白質與內源性 VWF 之間的相互作用會消除 FVIII 蛋白質之半衰期限制因素，且因此相較於無 VWF 蛋白質之 FVIII 蛋白質或野生型 FVIII，FVIII 蛋白質之半衰期得以延長。

[0132] 在其他態樣中，嵌合蛋白包含含有以下之式：

- (1) FVIII(X1)-L1-F1:V-L2-X2-L3-F2；
- (2) FVIII(X1)-L1-F1:F2-L3-X2-L2-V；
- (3) F1-L1-FVIII(X1): V-L2-X2-L3-F2；
- (4) F1-L1-FVIII(X1)；F2-L3-X2-L2-V；
- (5) FVIII(X1)-L1-F1-L4-V-L2-X2-L3-F2；
- (6) FVIII(X1)-L1-F1-L4-F2-L3-X2-L2-V；
- (7) F1-L1-FVIII(X1)-L4-V-L2-X2-L3-F2，或
- (8) F1-L1-FVIII(X1)-L4-F2-L3-X2-L2-V，

其中 FVIII(X1)包含 FVIII 蛋白質及一或多個 XTEN 序列，其中該一或多個 XTEN 序列連接於該 FVIII 蛋白質之

N 末端或 C 末端或緊靠該 FVIII 蛋白質中之一或多個胺基酸(例如一或多個本文揭露之 XTEN 插入位點)之下游插入；

L1、L2 或 L3 各自包含視情況選用之連接子，例如可裂解連接子；

L4 為連接子，例如可加工連接子；

X2 包含一或多個視情況選用之 XTEN 序列；

F1 包含 Ig 恆定區或其部分；

F2 包含視情況選用之另一 Ig 恆定區或其部分，且

V 包含 VWF 片段；

(-)為肽鍵或一或多個胺基酸；且

(:)包含化學締合或物理締合。在一個實施例中，(:)表示化學締合，例如至少一個非肽鍵。在另一實施例中，化學締合(亦即(:))為共價鍵。在其他實施例中，化學締合(亦即(:))為非共價相互作用，例如離子相互作用、疏水性相互作用、親水性相互作用、凡得瓦相互作用或氫鍵。在其他實施例中，(:)為非肽共價鍵。在其他實施例中，(:)為肽鍵。在其他實施例中，(:)表示兩個序列之間的物理締合，其中第一序列之一部分緊密接近於第二序列以使該第一序列遮蔽或阻斷該第二序列之一部分與另一部分相互作用，且進一步使此物理締合得以維持而不允許該第二序列與其他部分相互作用。本文多肽式之定向係自 N 末端(左)至 C 末端(右)列出。舉例而言，式 V-X-FVIII 意謂式

NH₂-V-X-FVIII-COOH。在一個實施例中，本文所述之式

可在兩個部分之間包含任何其他序列。舉例而言，除非另外規定，否則式 V-X-FVIII 可進一步在 V 之 N 末端、V 與 X 之間、X 與 FVIII 之間、或在 FVIII 之 C 末端包含任何序列。在另一實施例中，連字符(-)指示肽鍵。

[0133] 在一個態樣中，嵌合蛋白包含兩條多肽鏈，(A)第一鏈包含(i)單鏈 FVIII 蛋白質，(ii)XTEN 序列，及(iii)第一 Ig 恆定區或其部分，例如第一 Fc 區或 FcRn 結合搭配物，其中該 XTEN 序列在 N 末端或 C 末端連接於該 FVIII 蛋白質或緊靠該 FVIII 蛋白質之一或多個胺基酸(例如一或多個本文揭露之 XTEN 插入位點)之下游插入且該第一 Ig 恆定區或其部分連接於該 XTEN 序列(當該 XTEN 序列在 N 末端或 C 末端連接於該 FVIII 蛋白質時)或 FVIII 蛋白質(當該 XTEN 序列插入在該 FVIII 蛋白質內時)，且(B)第二鏈包含(iv)包含 D'域及 D3 域之 VWF 片段，(v)連接子，及(vi)第二 Ig 恆定區或其部分(例如第二 Fc 區或第二 FcRn 結合搭配物)，其中該 VWF 片段連接於進一步連接於該第二 Ig 恆定區或其部分之該連接子(例如可裂解連接子)，且其中該第一多肽鏈與該第二多肽鏈例如藉由共價鍵(例如二硫鍵)彼此締合。在一個實施例中，連接子為在本文中其他地方描述之可裂解連接子，例如凝血酶可裂解連接子。在一些實施例中，第二鏈在(iv)與(v)之間或在(v)與(vi)之間包含一或多個 XTEN 序列。

[0134] 在其他態樣中，嵌合蛋白包含一條多肽鏈，其包含(i)單鏈 FVIII 蛋白質，(ii)XTEN 序列，(iii)第一 Ig

恆定區或其部分，例如第一 Fc 區或第一 FcRn 結合搭配物，(iv)第一連接子，(v)包含 D'域及 D3 域之 VWF 片段，(vi)第二連接子，及(vii)第二 Ig 恆定區或其部分，例如第二 Fc 區或第二 FcRn 結合搭配物，其中(i)至(vii)按該順序或以任何順序連接。在一個實施例中，第一連接子為可在表現之後在細胞內經加工或裂解且使得單一多肽鏈成為兩條多肽鏈之可加工連接子。在另一實施例中，第二連接子為本文所述之可裂解連接子，例如凝血酶可裂解連接子。本文使用之 XTEN 序列可藉由視情況選用之連接子在 FVIII 蛋白質之 N 末端或 C 末端連接於 FVIII 蛋白質或緊靠 FVIII 蛋白質中之一或多個胺基酸(例如一或多個 XTEN 插入位點)之下游插入。

[0135] 在某些態樣中，嵌合蛋白包含三條多肽鏈，(A)第一多肽鏈包含彼此連接之(i)FVIII 蛋白質之重鏈及(ii)XTEN 序列且(B)第二多肽鏈包含彼此連接之(iii)該 FVIII 蛋白質之輕鏈及(iv)第一 Ig 恆定區或其部分，例如第一 Fc 區或第一 FcRn 結合搭配物，且(C)第三多肽鏈包含(v)包含 D'域及 D3 域之 VWF 片段，(vi)連接子，及(vii)第二 Ig 恆定區或其部分，例如第二 Fc 區或第二 FcRn 結合搭配物，其中該第二鏈與該第一鏈及該第三鏈締合。在一個實施例中，第一鏈與第二鏈之間的締合為化學締合或物理締合。舉例而言，第一鏈與第二鏈之間的締合可為金屬鍵。在另一實施例中，第二鏈與第三鏈之間的締合亦為化學締合或物理締合，例如共價鍵或非共價鍵。在某些實

施例中，第二鏈與第三鏈之間的締合係經由兩個 Ig 恆定區或其部分達成且為二硫鍵。第二鏈與第三鏈之間的鍵結阻止或抑制 FVIII 蛋白質與內源性 VWF 結合，由此阻止 FVIII 蛋白質藉由 VWF 清除路徑清除。在一些實施例中，連接子為在宿主細胞中表現之後在細胞內裂解之可加工連接子。本文使用之 XTEN 序列藉由視情況選用之連接子在 FVIII 蛋白質之 N 末端或 C 末端連接於 FVIII 蛋白質或緊靠 FVIII 蛋白質中之一或多個胺基酸(例如一或多個 XTEN 插入位點)之下游插入。

[0136] 在某些實施例中，VWF 片段藉由肽鍵或連接子直接連接於包含一或多個 XTEN 之 FVIII 蛋白質。作為一種經由直接連接(例如肽鍵)或連接子來連接 VWF 片段與其中插入或連接有一或多個 XTEN 之 FVIII 蛋白質的方法，可採用酶連接法(例如分選酶)。舉例而言，分選酶係指一組原核酶，其藉由識別及裂解羧基末端分選信號來修飾表面蛋白質。對於分選酶之大多數受質，識別信號由基元 LPXTG(Leu-Pro-任何胺基酸-Thr-Gly)(SEQ ID NO: 51)、接著高度疏水性跨膜序列、接著一串鹼性殘基(諸如精胺酸)組成。裂解發生在 Thr 與 Gly 之間，伴有經由 Thr 殘基短暫連接於連接搭配物之活性位點 Cys 殘基，隨後進行使蛋白質共價連接於細胞壁之轉肽過程。在一些實施例中，連接搭配物含有 Gly(n)。在其他實施例中，嵌合蛋白進一步包含分選酶識別基元。在一些實施例中，使用分選酶介導之活體外蛋白質連接法使 VWF 片段連接於包含在

內部具有一或多個 XTEN 插入或連接有一或多個 XTEN 的 FVIII。

[0137] 在一個實施例中，藉由視情況選用之連接子連接於分選酶識別基元之 VWF 片段可藉由分選酶融合於連接於 Gly(n)-之 FVIII 蛋白質，其中 n 可為任何整數且其中一或多個 XTEN 插入在該 FVIII 蛋白質內部或連接於該 FVIII 蛋白質。連接構築體包含 VWF 片段(構築體之 N 末端部分)及其中插入或連接有一或多個 XTEN 之 FVIII 蛋白質(構築體之 C 末端部分)，其中分選酶識別基元插入在兩者之間。另一連接構築體包含 VWF 片段(構築體之 N 末端部分)、連接子、分選酶識別基元及其中插入或連接有一或多個 XTEN 之 FVIII 蛋白質(構築體之 C 末端部分)。在另一實施例中，藉由視情況選用之連接子連接於分選酶識別基元之 FVIII 蛋白質可藉由分選酶融合於連接於 Gly(n)-之 VWF 片段，其中 n 為任何整數。所得連接構築體包含其中插入或連接有一或多個 XTEN 之 FVIII 蛋白質(構築體之 N 末端部分)、及 VWF 片段(構築體之 C 末端部分)，其中分選酶識別基元插入在兩者之間。另一所得連接構築體包含其中插入或連接有一或多個 XTEN 之 FVIII 蛋白質(構築體之 N 末端部分)、連接子、分選酶識別基元及 VWF 片段(構築體之 C 末端部分)。在其他實施例中，藉由第一視情況選用之連接子連接於分選酶識別基元之 VWF 片段可融合於藉由第二視情況選用之連接子連接於凝血酶裂解位點之異源部分，例如免疫球蛋白恆定區或其

部分，例如 Fc 區。所得構築體可包含 VWF 片段(N 末端部分)、第一連接子、分選酶識別基元、蛋白酶裂解位點、第二視情況選用之連接子及異源部分。

[0138] 在一些實施例中，VWF 片段與 FVIII 蛋白質締合。VWF 片段與 FVIII 蛋白質之間的締合可為化學締合或物理締合。化學締合可為非共價相互作用，例如離子相互作用、疏水性相互作用、親水性相互作用、凡得瓦相互作用或氫鍵。在其他實施例中，FVIII 蛋白質與 VWF 片段之間的締合為兩個序列之間的物理締合，例如歸因於具有 FVIII 蛋白質之序列與具有 VWF 片段之序列之間的另一締合，其中第一序列之一部分緊密接近於第二序列以使該第一序列遮蔽或阻斷該第二序列之一部分與另一部分相互作用。

[0139] 由於藉由 VWF 片段阻止或抑制內源性 VWF 與 FVIII 蛋白質相互作用，本文所述之嵌合蛋白相較於野生型 FVIII 或無 VWF 片段之相應嵌合蛋白具有延長之半衰期。在一個實施例中，FVIII 蛋白質之半衰期延長至無 VWF 片段之 FVIII 蛋白質之半衰期之至少約 1.5 倍、至少約 2 倍、至少約 2.5 倍、至少約 3 倍、至少約 4 倍、至少約 5 倍、至少約 6 倍、至少約 7 倍、至少約 8 倍、至少約 9 倍、至少約 10 倍、至少約 11 倍或至少約 12 倍長。在另一實施例中，FVIII 蛋白質之半衰期為至少約 10 小時、至少約 11 小時、至少約 12 小時、至少約 13 小時、至少約 14 小時、至少約 15 小時、至少約 16 小時、至少約 17

小時、至少約 18 小時、至少約 19 小時、至少約 20 小時、至少約 21 小時、至少約 22 小時、至少約 23 小時、至少約 24 小時、至少約 36 小時、至少約 48 小時、至少約 60 小時、至少約 72 小時、至少約 84 小時、至少約 96 小時或至少約 108 小時。在一特定實施例中，FVIII 蛋白質在 HemA 小鼠中之半衰期延長至少 10 小時、至少約 11 小時、至少約 12 小時、至少約 13 小時、至少約 14 小時、至少約 15 小時、至少約 16 小時、至少約 17 小時、至少約 18 小時、至少約 19 小時、至少約 20 小時、至少約 21 小時、至少約 22 小時、至少約 23 小時、至少約 24 小時、至少約 25 小時、至少約 26 小時或至少約 27 小時。

A) 范威爾邦德因子 (VWF) 片段

[0140] VWF(亦稱為 F8VWF)為一種存在於血漿中且在內皮(在懷布爾-帕拉德體(Weibel-Palade body)中)、巨核細胞(血小板之 α -顆粒)及內皮下結締組織中組成性產生之大型多聚醣蛋白。基本 VWF 單體為具有 2813 個胺基酸之蛋白質。每個單體含有多個具有特定功能之特定域，亦即 D'/D3 域(其結合因子 VIII)、A1 域(其結合血小板 GPIb 受體、肝素及/或可能膠原蛋白)、A3 域(其結合膠原蛋白)、C1 域(其中 RGD 域在此域活化時結合血小板整合素(integrin) α IIb β 3)、及在蛋白質之 C 末端之「半胱胺酸結(cysteine knot)」域(該 VWF 與血小板源性生長因子

(PDGF)、轉型生長因子- β (TGF β)及 β -人類絨毛膜促性腺素(β -human chorionic gonadotropin, β HCG)共有該域)。

[0141] 如本文所用之術語「VWF 片段」包括(但不限於)能夠抑制內源性 VWF 結合 FVIII 之包含 D'域及 D3 域之功能性 VWF 片段。在一個實施例中，VWF 片段結合 FVIII 蛋白質。在另一實施例中，VWF 片段阻斷 FVIII 蛋白質上之 VWF 結合位點，藉此抑制 FVIII 蛋白質與內源性之相互作用。VWF 片段包括保留 VWF 之此等活性之衍生物、變異體、突變體或類似物。

[0142] 人類 VWF 之 2813 單體胺基酸序列在 Genbank 中報導為寄存編號 _NP_000543.2_。編碼人類 VWF 之核苷酸序列在 Genbank 中報導為寄存編號 _NM_000552.3_。人類 VWF 之核苷酸序列指定為 SEQ ID NO: 1。SEQ ID NO: 2 為由 SEQ ID NO: 1 編碼之胺基酸序列。VWF 之各域列於表 1 中。

表 1. VWF序列

VWF 域	胺基酸序列		
VWF 信號肽 (SEQ ID NO: 2 之胺基酸1至22)	1	<u>MIPARFAGVL LALALILPGT LC</u>	22
VWF D1D2 區 (SEQ ID NO: 2 之胺基酸23至763)	23	<u>AEGTRGRS STARCSLFGS</u> DFVNTFDGSM 51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG 101 TVTQGDQRVS MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL 151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC 201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC 251 EKTLCCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDHSA CSPVCPAGME 301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTECPC 351 VHS GKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGEC LV TGQSHFKSFD 401 NRYPTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIE TV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG 451 LHNSLVKLKH GAGVAMDGDQD IQLPLLKGDL RIQHTVTASV RLSYGEDLQM 501 DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG 551 NAWKLHGDCQ DLQKQHSDFC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS 601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGV RV AWREPGRCEL 651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLT CR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD 701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD 751 AVLSSPLSHR SKR 763	
VWF D' 域	764	<u>SLSCRPP MVKLVC PADN LRAEGLECTK</u> TCQNYDLECM 801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HOGKEYAPGE TVKIGCNTCV 851 CRDRKWNCTD HVC DAT 866	
VWF D3 域	867	<u>CSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGE CQ</u> YVLVQDYCGS 901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTLVE GGEIELFDGE VNVKRPMKDE 951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD 1001 GIONNDLTSS NLOVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI 1051 MKQTMVDSSC RILTSDVFQD CNKLVDPEPY LDVCIYDTCS CESIGDCACF 1101 CDTIAAYAHV CAQH GKVV TW RTATLCPOSC EERNLRENGY ECEWRYNSCA 1151 PACQVTCQHP EPLACPVQCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC	

	1201	VDPEDCPVCE VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCACQEP	
	1240		
VWF A1 域	1241	GGLVVPPTDA	
	1251	PVSPTTLYVE DISEPPLHDF YCSRLDLVF LLDGSSRLSE AEFEVLKAFV	
	1301	VDMMERLRIS QKWVRVAVVE YHDGSHAYIG LKDRKRPSEL RRIASQVKYA	
	1351	GSQVASTSEV LKYTLFQIFS KIDRPEASRI ALLLMASQEP QRMSRNFVRY	
	1401	VQGLKKKKVI VIPVGIGPHA NLKQIRLIEK QAPENKAFVL SSVDELEQQR	
	1451	DEIVSYLCDL APEAPPPTLP PDMAQVTVG	1479
	1480		P GLLGVSTLGP KRNSMVLDDVA
	1501	FVLEGSDKIG EADFNRSKEF MEEVIQRMV GQDSIHVTVL QYSYMTVEY	
	1551	PFSEAQSKGD ILQVRREIRY QGGNRTNTGL ALRYLSDHSF LVSQGDREQA	1600
	1601	PNLVYMTGN PASDEIKRLP GDIQVVPIGV GPNANVQELE RIGWPNAPIL	
	1651	IQDFETLPRE APDLVLQRCC SGEGLQIPTL SPAPDCSQPL DVILLLDGSS	
	1701	SFPASYFDEM KSFAKAFISK ANIGPRLTQV SVLQYGSITT IDVPWNVVE	
	1751	KAHLLSLVDV MQREGGPSQI GDALGFAVRY LTSEMHGARP GASKAVVILV	
	1801	TDVSVDSVDA AADAARSNRV TVFPIGIGDR YDAAQLRILA GPAGDSNVVK	
	1851	LQRIEDLPTM VTLGNSFLHK LSCGFVRICM DEDGNEKRP DVWTLPDQCH	
	1901	TVTCQPDGQT LLKSHRVNCD RGLRPSCPNS QSPVKVEETC GCRWTCPCVC	
	1951	TGSSTRHIVT FDGQNFKLGT SCSYVLFQNK EQDLEVILHN GACSPGARQG	
	2001	CMKSIEVKHS ALSVEXHSDM EVTNGRLVS VPYVGGNMEV NVYGAIMHEV	
	2051	RFNHLGHIFT FTPQNNEFQL QLSPKTFASK TYGLCGICDE NGANDFMLRD	
	2101	GTVTTDWCTL VQEWTVQRPQ QTCQPILEEQ CLVPDSSHQ VLLLPLFAEC	
	2151	HKVLAPATFY AICQQDSCHQ EQVCEVIASY AHLCRTNGVC VDWRTPDFCA	
	2201	MSCPPSLVYN HCEHGCPRHC DGNVSSCGDH PSEGCFPCPD KVMLEGSCVP	
	2251	EEACTQCIGE DGVQHOFLEA WVPDHQPCQI CTCLSGRKVN CTTQPCPTAK	
	2301	APTCGLCEVA RLRQNADQCC PEYECVCDPV SCDLPPVPHC ERGLQPTLTN	
	2351	PGECPNFTC ACRKEECKRV SPPSCPPHRL PTLRKTQCCD EYECACNCVN	
	2401	STVSCPLGYL ASTATNDCGC TTTCLPDKV CVHRSTIYPV GQFWEEGCDV	
	2451	CTCTDMEDAV MGLRVAQCSQ KPCEDSCRSG FTYVLHEGEC CGRCLPSACE	
	2501	VVTGSPRGDS QSSWKSQSG WASPENPCLI NECVRVKEEV FIQQRNVSCP	
	2551	QLEVPVCPSP FQLSCKTSAC CPSCRCERME ACMLNGTVIG	

	PGKTVMIDVC
2601	TTCRCMVQVG VISGFKLECR KTTCNPCPLG YKEENNTGEC
	CGRCLPTACT
2651	IQLRGGQIMT LKRDETLQDG CDTHFCKVNE RGEYFWEKRV
	TGCPPFDEHK
2701	CLAEGGKIMK IPGTCCDTCE EPECNDITAR LQYVKVGSK
	SEVEVDIHYC
2751	QGKCASKAMY SIDINDVQDQ CSCCSPTRTE PMQVALHCTN
	GSVVYHEVLN
2801	AMECKCSPRK CSK
核苷酸序列 (SEQ ID NO: 1)	
全長 VWF	1 ATGATTCCTG CCAGATTTCG CGGGGTGCTG CTTGCTCTGG CCCTCATTTT 51 GCCAGGGACC CTTTGTGCAG AAGGAACTCG CGGCAGGTCA TCCACGGCCC 101 GATGCAGCCT TTTCGGAAGT GACTTCGTCA ACACCTTTGA TGGGAGCATG 151 TACAGCTTTG CGGGATACTG CAGTTACCTC CTGGCAGGGG GCTGCCAGAA 201 ACGCTCCTTC TCGATTATTG GGGACTTCCA GAATGGCAAG AGAGTGAGCC 251 TCTCCGTGTA TCTTGGGGAA TTTTTTGACA TCCATTTGTT TGTCAATGGT 301 ACCGTGACAC AGGGGGACCA AAGAGTCTCC ATGCCCTATG CCTCCAAAGG 351 GCTGTATCTA GAAACTGAGG CTGGGTACTA CAAGCTGTCC GGTGAGGCCT 401 ATGGCTTTGT GGCCAGGATC GATGGCAGCG GCAACTTTCA AGTCCTGCTG 451 TCAGACAGAT ACTTCAACAA GACCTGCGGG CTGTGTGGCA ACTTTAACAT 501 CTTTGCTGAA GATGACTTTA TGACCCAAGA AGGGACCTTG ACCTCGGACC 551 CTTATGACTT TGCCAACTCA TGGGCTCTGA GCAGTGGAGA ACAGTGGTGT 601 GAACGGGCAT CTCCTCCCAG CAGCTCATGC AACATCTCCT CTGGGGAAAT 651 GCAGAAGGGC CTGTGGGAGC AGTGCCAGCT TCTGAAGAGC ACCTCGGTGT 701 TTGCCCCTG CCACCCTCTG GTGGACCCCG AGCCTTTTGT GGCCCTGTGT 751 GAGAAGACTT TGTGTGAGTG TGCTGGGGGG CTGGAGTGCG CCTGCCCTGC 801 CCTCCTGGAG TACGCCCCTG CCTGTGCCCCA GGAGGGAATG GTGCTGTACG 851 GCTGGACCGA CCACAGCGCG TGCAGCCCAG TGTGCCCTGC TGGTATGGAG 901 TATAGGCAGT GTGTGTCCCC TTGCGCCAGG ACCTGCCAGA GCCTGCACAT 951 CAATGAAATG TGTGAGGAGC GATGCGTGGA TGGCTGCAGC TGCCCTGAGG 1001 GACAGCTCCT GGATGAAGGC CTCTGCGTGG AGAGACCCGA GTGTCCCTGC 1051 GTGCATTCCG GAAAGCGCTA CCCTCCCGGC ACCTCCCTCT CTCGAGACTG 1101 CAACACCTGC ATTTGCCGAA ACAGCCAGTG GATCTGCAGC AATGAAGAAT 1151 GTCCAGGGGA GTGCCTTGTC ACTGGTCAAT

	CCCACTTCAA GAGCTTTGAC
1201	AACAGATACT TCACCTTCAG TGGGATCTGC
	CAGTACCTGC TGGCCCGGGA
1251	TTGCCAGGAC CACTCCTTCT CCATTGTCAT
	TGAGACTGTC CAGTGTGCTG
1301	ATGACCGCGA CGCTGTGTGC ACCCGCTCCG
	TCACCGTCCG GCTGCCTGGC
1351	CTGCACAACA GCCTTGTGAA ACTGAAGCAT
	GGGGCAGGAG TTGCCATGGA
1401	TGGCCAGGAC ATCCAGCTCC CCCTCCTGAA
	AGGTGACCTC CGCATCCAGC
1451	ATACAGTGAC GGCCTCCGTG CGCCTCAGCT
	ACGGGGAGGA CCTGCAGATG
1501	GACTGGGATG GCCGCGGGAG GCTGCTGGTG
	AAGCTGTCCC CCGTCTATGC
1551	CGGGAAGACC TCGGCCTGT GTGGGAATTA
	CAATGGCAAC CAGGGCGACG
1601	ACTTCCTTAC CCCCTCTGGG CTGGCRGAGC
	CCCGGGTGGA GGACTTCGGG
1651	AACGCCTGGA AGCTGCACGG GGACTGCCAG
	GACCTGCAGA AGCAGCACAG
1701	CGATCCCTGC GCCCTCAACC CGCGCATGAC
	CAGGTTCTCC GAGGAGGCGT
1751	GCGCGGTCCT GACGTCCCCC ACATTCGAGG
	CCTGCCATCG TGCCGTCAGC
1801	CCGCTGCCCT ACCTGCGGAA CTGCCGCTAC
	GACGTGTGCT CCTGCTCGGA
1851	CGGCCGCGAG TGCCTGTGCG GCGCCCTGGC
	CAGCTATGCC GCGGCCTGCG
1901	CGGGGAGAGG CGTGCGCGTC GCGTGGCGCG
	AGCCAGGCCG CTGTGAGCTG
1951	AACTGCCCCA AAGGCCAGGT GTACCTGCAG
	TGCGGGACCC CCTGCAACCT
2001	GACCTGCCGC TCTCTCTTT ACCCGGATGA
	GGAATGCAAT GAGGCCTGCC
2051	TGGAGGGCTG CTTCTGCCCC CCAGGGCTCT
	ACATGGATGA GAGGGGGGAC
2101	TGCGTGCCCA AGGCCAGTG CCCCTGTTAC
	TATGACGGTG AGATCTTCCA
2151	GCCAGAAGAC ATCTTCTCAG ACCATCACAC
	CATGTGCTAC TGTGAGGATG
2201	GCTTCATGCA CTGTACCATG AGTGGAGTCC
	CCGGAAGCTT GCTGCCTGAC
2251	GCTGTCCTCA GCAGTCCCCT GTCTCATCGC
	AGCAAAAGGA GCCTATCCTG
2301	TCGGCCCCC ATGGTCAAGC TGGTGTGTCC
	CGCTGACAAC CTGCGGGCTG
2351	AAGGGCTCGA GTGTACCAA ACGTGCCAGA
	ACTATGACCT GGAGTGCATG
2401	AGCATGGGCT GTGTCTCTGG CTGCCTCTGC
	CCCCCGGGCA TGGTCCGGCA
2451	TGAGAACAGA TGTGTGGCCC TGGAAAGGTG
	TCCCTGCTTC CATCAGGGCA
2501	AGGAGTATGC CCCTGGAGAA ACAGTGAAGA
	TTGGCTGCAA CACTTGTGTC
2551	TGTCGGGACC GGAAGTGGA CTGCACAGAC
	CATGTGTGTG ATGCCACGTG
2601	CTCCACGATC GGCATGGCCC ACTACCTCAC
	CTTCGACGGG CTCAAATACC

2651	TGTTCCCCGG GGAGTGCCAG TACGTTCTGG TGCAGGATTA CTGCGGCAGT
2701	AACCCTGGGA CCTTTCGGAT CCTAGTGGGG AATAAGGGAT GCAGCCACCC
2751	CTCAGTGAAA TGCAAGAAAC GGGTCACCAT CCTGGTGGAG GGAGGAGAGA
2801	TTGAGCTGTT TGACGGGGAG GTGAATGTGA AGAGGCCCCAT GAAGGATGAG
2851	ACTCACTTG AGGTGGTGA GTCTGGCCCG TACATCATTG TGCTGCTGGG
2901	CAAAGCCCTC TCCGTGGTCT GGGACCGCCA CCTGAGCATC TCCGTGGTCC
2951	TGAAGCAGAC ATACCAGGAG AAAGTGTGTG GCCTGTGTGG GAATTTTGAT
3001	GGCATCCAGA ACAATGACCT CACCAGCAGC AACCTCCAAG TGGAGGAAGA
3051	CCCTGTGGAC TTTGGGAACT CCTGGAAAGT GAGCTCGCAG TGTGCTGACA
3101	CCAGAAAAGT GCCTCTGGAC TCATCCCCTG CCACCTGCCA TAACAACATC
3151	ATGAAGCAGA CGATGGTGA TTCCTCCTGT AGAATCCTTA CCAGTGACGT
3201	CTTCCAGGAC TGCAACAAGC TGGTGGACCC CGAGCCATAT CTGGATGTCT
3251	GCATTTACGA CACCTGCTCC TGTGAGTCCA TTGGGGACTG CGCCTGCTTC
3301	TGCGACACCA TTGCTGCCTA TGCCACGTG TGTGCCCAGC ATGGCAAGGT
3351	GGTGACCTGG AGGACGGCCA CATTGTGCCC CCAGAGCTGC GAGGAGAGGA
3401	ATCTCCGGGA GAACGGGTAT GAGTGTGAGT GGCGCTATAA CAGCTGTGCA
3451	CCTGCCTGTC AAGTCACGTG TCAGCACCCCT GAGCCACTGG CCTGCCCTGT
3501	GCAGTGTGTG GAGGGCTGCC ATGCCCACTG CCCTCCAGGG AAAATCCTGG
3551	ATGAGCTTTT GCAGACCTGC GTTGACCCTG AAGACTGTCC AGTGTGTGAG
3601	GTGGCTGGCC GGCCTTTTGC CTCAGGAAAG AAAGTCACCT TGAATCCAG
3651	TGACCCTGAG CACTGCCAGA TTTGCCACTG TGATGTTGTC AACCTCACCT
3701	GTGAAGCCTG CCAGGAGCCG GGAGGCCTGG TGGTGCCTCC CACAGATGCC
3751	CCGGTGAGCC CCACCACTCT GTATGTGGAG GACATCTCGG AACCGCCGTT
3801	GCACGATTTT TACTGCAGCA GGCTACTGGA CCTGGTCTTC CTGCTGGATG
3851	GCTCCTCCAG GCTGTCCGAG GCTGAGTTTG AAGTGCTGAA GGCCTTTGTG
3901	GTGGACATGA TGGAGCGGCT GCGCATCTCC CAGAAGTGGG TCCGCGTGGC
3951	CGTGGTGGAG TACCACGACG GCTCCCACGC CTACATCGGG CTCAAGGACC
4001	GGAAGCGACC GTCAGAGCTG CGGCGCATTG CCAGCCAGGT GAAGTATGCG
4051	GGCAGCCAGG TGGCCTCCAC CAGCGAGGTC TTGAAATACA CACTGTTCCA
4101	AATCTTCAGC AAGATCGACC GCCCTGAAGC

	CTCCCGCATC GCCCTGCTCC
4151	TGATGGCCAG CCAGGAGCCC CAACGGATGT
	CCCGGAACTT TGTCCGCTAC
4201	GTCCAGGGCC TGAAGAAGAA GAAGGTCATT
	GTGATCCCGG TGGGCATTGG
4251	GCCCCATGCC AACCTCAAGC AGATCCGCCT
	CATCGAGAAG CAGGCCCCTG
4301	AGAACAAGGC CTTCGTGCTG AGCAGTGTGG
	ATGAGCTGGA GCAGCAAAGG
4351	GACGAGATCG TTAGCTACCT CTGTGACCTT
	GCCCCCTGAAG CCCCTCCTCC
4401	TACTCTGCCC CCCGACATGG CACAAGTCAC
	TGTGGGCCCC GGGCTCTTGG
4451	GGGTTTCGAC CCTGGGGCCC AAGAGGAACT
	CCATGGTTCT GGATGTGGCG
4501	TTCGTCCTGG AAGGATCGGA CAAAATTGGT
	GAAGCCGACT TCAACAGGAG
4551	CAAGGAGTTC ATGGAGGAGG TGATTGAGCG
	GATGGATGTG GGCCAGGACA
4601	GCATCCACGT CACGGTGCTG CAGTACTCCT
	ACATGGTGAC CGTGGAGTAC
4651	CCCTTCAGCG AGGCACAGTC CAAAGGGGAC
	ATCCTGCAGC GGGTGCGAGA
4701	GATCCGCTAC CAGGGCGGCA ACAGGACCAA
	CACTGGGCTG GCCCTGCGGT
4751	ACCTCTCTGA CCACAGCTTC TTGGTCAGCC
	AGGGTGACCG GGAGCAGGCG
4801	CCCAACCTGG TCTACATGGT CACCGGAAAT
	CCTGCCTCTG ATGAGATCAA
4851	GAGGCTGCCT GGAGACATCC AGGTGGTGCC
	CATTGGAGTG GGCCCTAATG
4901	CCAACGTGCA GGAGCTGGAG AGGATTGGCT
	GGCCCAATGC CCCTATCCTC
4951	ATCCAGGACT TTGAGACGCT CCCCCGAGAG
	GCTCCTGACC TGGTGCTGCA
5001	GAGGTGCTGC TCCGGAGAGG GGCTGCAGAT
	CCCCACCCTC TCCCCTGCAC
5051	CTGACTGCAG CCAGCCCCTG GACGTGATCC
	TTCTCCTGGA TGGCTCCTCC
5101	AGTTTCCCAG CTTCTTATTT TGATGAAATG
	AAGAGTTTCG CCAAGGCTTT
5151	CATTTCAAAA GCCAATATAG GGCTCGTCT
	CACTCAGGTG TCAGTGCTGC
5201	AGTATGGAAG CATCACCACC ATTGACGTGC
	CATGGAACGT GGTCCCGGAG
5251	AAAGCCCAT TGTGAGCCT TGTGGACGTC
	ATGCAGCGGG AGGGAGGCCC
5301	CAGCCAAATC GGGGATGCCT TGGGCTTTGC
	TGTGCGATAC TTGACTTCAG
5351	AAATGCATGG TGCCAGGCCG GGAGCCTCAA
	AGGCGGTGGT CATCCTGGTC
5401	ACGGACGTCT CTGTGGATTC AGTGGATGCA
	GCAGCTGATG CCGCCAGGTC
5451	CAACAGAGTG ACAGTGTTCC CTATTGGAAT
	TGGAGATCGC TACGATGCAG
5501	CCCAGCTACG GATCTTGGCA GGCCCAGCAG
	GCGACTCCAA CGTGGTGAAG
5551	CTCCAGCGAA TCGAAGACCT CCCTACCATG
	GTCACCTTGG GCAATTCCTT

5601	CCTCCACAAA CTGTGCTCTG GATTTGTTAG GATTTGTCATG GATGAGGATG
5651	GGAATGAGAA GAGGCCCGGG GACGTCTGGA CCTTGCCAGA CCAAGTGCCAC
5701	ACCGTGACTT GCCAGCCAGA TGGCCAGACC TTGCTGAAGA GTCATCGGGT
5751	CAACTGTGAC CGGGGGCTGA GGCCTTCGTG CCCTAACAGC CAGTCCCCTG
5801	TTAAAGTGA AGAGACCTGT GGCTGCCGCT GGACCTGCCC CTGYGTGTGC
5851	ACAGGCAGCT CCACTCGGCA CATCGTGACC TTTGATGGGC AGAATTTCAA
5901	GCTGACTGGC AGCTGTTCTT ATGTCCTATT TCAAACAAG GAGCAGGACC
5951	TGGAGGTGAT TCTCCATAAT GGTGCCTGCA GCCCTGGAGC AAGGCAGGGC
6001	TGCATGAAAT CCATCGAGGT GAAGCACAGT GCCCTCTCCG TCGAGSTGCA
6051	CAGTGACATG GAGGTGACGG TGAATGGGAG ACTGGTCTCT GTTCCTTACG
6101	TGGGTGGGAA CATGGAAGTC AACGTTTATG GTGCCATCAT GCATGAGGTC
6151	AGATTCAATC ACCTTGGTCA CATCTTCACA TTCCTCCAC AAAACAATGA
6201	GTTCCAAGT CAGCTCAGCC CCAAGACTTT TGCTTCAAAG ACGTATGGTC
6251	TGTGTGGGAT CTGTGATGAG AACGGAGCCA ATGACTTCAT GCTGAGGGAT
6301	GGCACAGTCA CCACAGACTG GAAAACACTT GTTCAAGGAAT GGAATGTGCA
6351	GCGGCCAGGG CAGACGTGCC AGCCCATCCT GGAGGAGCAG TGTCTTGTC
6401	CCGACAGCTC CCACTGCCAG GTCCTCCTCT TACCACTGTT TGCTGAATGC
6451	CACAAGGTCC TGGCTCCAGC CACATTCTAT GCCATCTGCC AGCAGGACAG
6501	TTGCCACCAG GAGCAAGTGT GTGAGGTGAT CGCCTCTTAT GCCCACCTCT
6551	GTCGGACCAA CGGGGTCTGC GTTGACTGGA GGACACCTGA TTTCTGTGCT
6601	ATGTCATGCC CACCATCTCT GGTCTACAAC CACTGTGAGC ATGGCTGTCC
6651	CCGGCACTGT GATGGCAACG TGAGCTCCTG TGGGGACCAT CCTCCGAAG
6701	GCTGTTTCTG CCTCCAGAT AAAGTCATGT TGGAAGGCAG CTGTGTCCCT
6751	GAAGAGGCCT GCACTCAGTG CATTGGTGAG GATGGAGTCC AGCACCAGTT
6801	CCTGGAAGCC TGGGTCCCGG ACCACCAGCC CTGTCAGATC TGCACATGCC
6851	TCAGCGGGCG GAAGGTCAAC TGCACAACGC AGCCCTGCCC CACGGCCAAA
6901	GCTCCACGT GTGGCCTGTG TGAAGTAGCC CGCCTCCGCC AGAATGCAGA
6951	CCAGTGCTGC CCCGAGTATG AGTGTGTGTG TGACCCAGTG AGCTGTGACC
7001	TGCCCCAGT GCCTCACTGT GAACGTGGCC TCCAGCCAC ACTGACCAAC
7051	CCTGGCGAGT GCAGACCCAA CTTACCTGCT

	GCCTGCAGGA AGGAGGAGTG
7101	CAAAAGAGTG TCCCCACCCT CCTGCCCCCC
	GCACCGTTTG CCCACCCTTC
7151	GGAAGACCCA GTGCTGTGAT GAGTATGAGT
	GTGCCTGCAA CTGTGTCAAC
7201	TCCACAGTGA GCTGTCCCCT TGGGTACTTG
	GCCTCAACCG CCACCAATGA
7251	CTGTGGCTGT ACCACAACCA CCTGCCTTCC
	CGACAAGGTG TGTGTCCACC
7301	GAAGCACCAT CTACCCTGTG GGCCAGTTCT
	GGGAGGAGGG CTGCGATGTG
7351	TGCACCTGCA CCGACATGGA GGATGCCGTG
	ATGGGCCTCC GCGTGGCCCA
7401	GTGCTCCCAG AAGCCCTGTG AGGACAGCTG
	TCGGTCGGGC TCACTTACG
7451	TTCTGCATGA AGGCGAGTGC TGTGGAAGGT
	GCCTGCCATC TGCTGTGAG
7501	GTGGTGA CTGCTACCGCG GGGGGA CTCC
	CAGTCTTCCT GGAAGAGTGT
7551	CGGCTCCCAG TGGGCCTCCC CGGAGAACCC
	CTGCCTCATC AATGAGTGTG
7601	TCCGAGTGAA GGAGGAGGTC TTTATACAAC
	AAAGGAACGT CTCCTGCCCC
7651	CAGCTGGAGG TCCCTGTCTG CCCCTCGGGC
	TTTCAGCTGA GCTGTAAGAC
7701	CTCAGCGTGC TGCCCAAGCT GTCGCTGTGA
	GCGCATGGAG GCCTGCATGC
7751	TCAATGGCAC TGTGATTGGG CCCGGGAAGA
	CTGTGATGAT CGATGTGTGC
7801	ACGACCTGCC GCTGCATGGT GCAGGTGGGG
	GTCATCTCTG GATTCAAGCT
7851	GGAGTGCAGG AAGACCACCT GCAACCCCTG
	CCCCCTGGGT TACAAGGAAG
7901	AAAATAACAC AGGTGAATGT TGTGGGAGAT
	GTTTGCCTAC GGCTGCACC
7951	ATTGAGCTAA GAGGAGGACA GATCATGACA
	CTGAAGCGTG ATGAGACGCT
8001	CCAGGATGGC TGTGATACTC ACTTCTGCAA
	GGTCAATGAG AGAGGAGAGT
8051	ACTTCTGGGA GAAGAGGGTC ACAGGCTGCC
	CACCCTTTGA TGAACACAAG
8101	TGTCTTGCTG AGGGAGGTAA AATTATGAAA
	ATTCCAGGCA CTGCTGTGA
8151	CACATGTGAG GAGCCTGAGT GCAACGACAT
	CACTGCCAGG CTGCAGTATG
8201	TCAAGGTGGG AAGCTGTAAG TCTGAAGTAG
	AGGTGGATAT CCACTACTGC
8251	CAGGGCAAAT GTGCCAGCAA AGCCATGTAC
	TCCATTGACA TCAACGATGT
8301	GCAGGACCAG TGCTCCTGCT GCTCTCCGAC
	ACGGACGGAG CCCATGCAGG
8351	TGGCCCTGCA CTGCACCAAT GGCTCTGTTG
	TGTACCATGA GGTCTCAAT
8401	GCCATGGAGT GCAAATGCTC CCCAGGAAG TGCAGCAAGT
GA	

[0143] 如本文所用之 VWF 片段可為包含 VWF 之 D' 域及 D3 域之 VWF 片段，其中該 VWF 片段結合因子

VIII(FVIII)且抑制內源性 VWF(全長 VWF)結合 FVIII。包含 D'域及 D3 域之 VWF 片段可進一步包含選自由以下組成之群之 VWF 域：A1 域、A2 域、A3 域、D1 域、D2 域、D4 域、B1 域、B2 域、B3 域、C1 域、C2 域、CK 域、其一或多個片段及其任何組合。在一個實施例中，VWF 片段包含以下、基本上由以下組成、或由以下組成：(1)VWF 之 D'及 D3 域或其片段；(2)VWF 之 D1、D'及 D3 域或其片段；(3)VWF 之 D2、D'及 D3 域或其片段；(4)VWF 之 D1、D2、D'及 D3 域或其片段；或(5)VWF 之 D1、D2、D'、D3 及 A1 域或其片段。本文所述之 VWF 片段不含結合 VWF 清除受體之位點。在另一實施例中，本文所述之 VWF 片段不為 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 1274。本發明之 VWF 片段可包含連接於或融合於 VWF 片段之任何其他序列。舉例而言，本文所述之 VWF 片段可進一步包含信號肽。

[0144] 在一個實施例中，VWF 片段與 FVIII 蛋白質結合或締合。藉由與 FVIII 蛋白質結合或締合，本發明之 VWF 片段保護 FVIII 免遭蛋白酶裂解及 FVIII 活化，穩定化 FVIII 之重鏈及輕鏈，且阻止 FVIII 由清除受體清除。在另一實施例中，VWF 片段與 FVIII 蛋白質結合或締合且阻斷或阻止 FVIII 蛋白質結合磷脂及活化型蛋白質 C。藉由阻止或抑制 FVIII 蛋白質與內源性全長 VWF 結合，本發明之 VWF 片段減少 FVIII 由 VWF 清除受體之清除且因此延長 FVIII 蛋白質之半衰期。因此，FVIII 蛋白質之半

衰期延長係歸因於缺乏 VWF 清除受體結合位點之 VWF 片段與 FVIII 蛋白質之結合或締合及由 VWF 片段遮蔽或保護 FVIII 蛋白質以免與含有 VWF 清除受體結合位點之內源性 VWF 結合。結合於 VWF 片段或由 VWF 片段保護之 FVIII 蛋白質亦可允許 FVIII 蛋白質再循環。藉由消除全長 VWF 分子中所含之 VWF 清除路徑受體結合位點，本發明之 FVIII/VWF 雜二聚體被遮蔽免遭 VWF 清除路徑，從而進一步延長 FVIII 半衰期。

[0145] 在一個實施例中，本發明之 VWF 片段包含 VWF 之 D'域及 D3 域，其中該 D'域與 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 866 至少 60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致，其中該 VWF 片段阻止內源性 VWF 結合 FVIII。在另一實施例中，VWF 片段包含 VWF 之 D'域及 D3 域，其中該 D3 域與 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 867 至 1240 至少 60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致，其中該 VWF 片段阻止內源性 VWF 結合 FVIII。在一些實施例中，本文所述之 VWF 片段包含以下、基本上由以下組成、或由以下組成：VWF 之 D'域及 D3 域，該等域與 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 1240 至少 60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致，其中該 VWF 片段阻止內源性 VWF 結合 FVIII。在其他實施例中，VWF 片段包含以下、基本上由以下組成、或由以下組成：D1、D2、D'及 D3 域，該等域

與 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 23 至 1240 至少 60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 一致，其中該 VWF 片段阻止內源性 VWF 結合 FVIII。在其他實施例中，VWF 片段進一步包含與其可操作地連接之信號肽。

[0146] 在一些實施例中，本發明之 VWF 片段基本上由以下組成或由以下組成：(1) D'D3 域、D1D'D3 域、D2D'D3 域或 D1D2D'D3 域及 (2) 至多約 10 個胺基酸(例如 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 1240 至 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 1250 的任何序列)、至多約 15 個胺基酸(例如 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 1240 至 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 1255 的任何序列)、至多約 20 個胺基酸(例如 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 1240 至 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 1260 的任何序列)、至多約 25 個胺基酸(例如 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 1240 至 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 1265 的任何序列)、或至多約 30 個胺基酸(例如 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 1240 至 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 1260 的任何序列)之另一 VWF 序列。在一特定實施例中，包含 D'域及 D3 域或基本上由 D'域及 D3 域組成之 VWF 片段既不為 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 1274 亦不為全長成熟 VWF。在一些實施例中，D1D2 域以反式與 D'D3 域一起表現。在一些實施例中，D1D2 域以順式與 D'D3 域一起表現。

[0147] 在其他實施例中，包含連接於 D1D2 域之

D'D3 域之 VWF 片段進一步包含細胞內裂解位點(例如 PACE(弗林蛋白酶)或 PC5 之裂解位點)，從而允許在表現時，D1D2 域自 D'D3 域裂解。細胞內裂解位點之非限制性實例在本文中其他地方加以揭露。

[0148] 在其他實施例中，VWF 片段包含 D'域及 D3 域，但不包含選自由以下組成之群之胺基酸序列：(1)SEQ ID NO: 2 之胺基酸 1241 至 2813，(2)SEQ ID NO: 2 之胺基酸 1270 至胺基酸 2813，(3)SEQ ID NO: 2 之胺基酸 1271 至胺基酸 2813，(4)SEQ ID NO: 2 之胺基酸 1272 至胺基酸 2813，(5)SEQ ID NO: 2 之胺基酸 1273 至胺基酸 2813，(6)SEQ ID NO: 2 之胺基酸 1274 至胺基酸 2813，及其任何組合。

[0149] 在其他實施例中，本發明之 VWF 片段包含以下、基本上由以下組成、或由以下組成：對應於 D'域、D3 域及 A1 域之胺基酸序列，其中該胺基酸序列與 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 1479 至少 60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致，其中該 VWF 片段阻止內源性 VWF 結合 FVIII。在一特定實施例中，VWF 片段不為 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 1274。

[0150] 在一些實施例中，本發明之 VWF 片段包含 D'域及 D3 域，但不包含至少一個選自由以下組成之群之 VWF 域：(1)A1 域，(2)A2 域，(3)A3 域，(4)D4 域，(5)B1 域，(6)B2 域，(7)B3 域，(8)C1 域，(9)C2 域，

(10)CK 域，(11)CK 域及 C2 域，(12)CK 域、C2 域及 C1 域，(13)CK 域、C2 域、C1 域、B3 域，(14)CK 域、C2 域、C1 域、B3 域、B2 域，(15)CK 域、C2 域、C1 域、B3 域、B2 域及 B1 域，(16)CK 域、C2 域、C1 域、B3 域、B2 域、B1 域及 D4 域，(17)CK 域、C2 域、C1 域、B3 域、B2 域、B1 域、D4 域及 A3 域，(18)CK 域、C2 域、C1 域、B3 域、B2 域、B1 域、D4 域、A3 域及 A2 域，(19)CK 域、C2 域、C1 域、B3 域、B2 域、B1 域、D4 域、A3 域、A2 域及 A1 域，及(20)其任何組合。

[0151] 在其他實施例中，VWF 片段包含 D'D3 域及一或多個域或模組。此等域或模組之實例包括(但不限於)Zhour 等人，Blood 2012 年 4 月 6 日線上發表：DOI 10.1182/blood-2012-01-405134 中揭露之域及模組。舉例而言，VWF 片段可包含 D'D3 域及一或多個選自由以下組成之群之域或模組：A1 域、A2 域、A3 域、D4N 模組、VWD4 模組、C8-4 模組、TIL-4 模組、C1 模組、C2 模組、C3 模組、C4 模組、C5 模組、C5 模組、C6 模組及其任何組合。

[0152] 在其他實施例中，VWF 片段連接於異源部分，其中該異源部分連接於該 VWF 片段之 N 末端或 C 末端或緊靠 FVIII 蛋白質中之一或多個胺基酸(例如一或多個 XTEN 插入位點)之下游插入在 VWF 片段中。舉例而言，異源部分在 VWF 片段中之插入位點可在 D'域、D3 域或兩者中。異源部分可為半衰期延長劑。

[0153] 在某些實施例中，本發明之 VWF 片段形成多聚體，例如二聚體、三聚體、四聚體、五聚體、六聚體、七聚體或更高級多聚體。在其他實施例中，VWF 片段為僅具有一個 VWF 片段之單體。在一些實施例中，本發明之 VWF 片段可具有一或多個胺基酸取代、缺失、添加或修飾。在一個實施例中，VWF 片段可包括胺基酸取代、缺失、添加或修飾以使 VWF 片段不能形成二硫鍵或不能形成二聚體或多聚體。在另一實施例中，胺基酸取代在 D' 域及 D3 域內。在一特定實施例中，本發明之 VWF 片段在對應於 SEQ ID NO: 2 之殘基 1099、殘基 1142、或殘基 1099 與 1142 兩者之殘基處含有至少一個胺基酸取代。至少一個胺基酸取代可為不天然存在於野生型 VWF 中之任何胺基酸。舉例而言，胺基酸取代可為除半胱胺酸以外之任何胺基酸，例如異白胺酸、丙胺酸、白胺酸、天冬醯胺、離胺酸、天冬胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、麩胺酸、酥胺酸、麩醯胺酸、色胺酸、甘胺酸、纈胺酸、脯胺酸、絲胺酸、酪胺酸、精胺酸或組胺酸。在另一實例中，胺基酸取代具有一或多個阻止或抑制 VWF 片段形成多聚體之胺基酸。

[0154] 在某些實施例中，適用於本文之 VWF 片段可經進一步修飾以改良其與 FVIII 之相互作用，例如改良對 FVIII 之結合親和力。作為一非限制性實例，VWF 片段在對應於 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 之殘基處包含絲胺酸殘基及在對應於 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 773 之殘基處包

含離胺酸殘基。殘基 764 及/或 773 可有助於 VWF 片段對 FVIII 之結合親和力。在其他實施例中，適用於本發明之 VWF 片段可具有其他修飾，例如蛋白質可經聚乙二醇化、糖基化、羥乙基澱粉化或聚唾液酸化。

B)XTEN 序列

[0155] 如此處所用，「XTEN 序列」係指具有主要由小型親水性胺基酸構成之非天然存在之實質上非重複序列的延長長度多肽，其中該序列在生理條件下具有低度或不具有二級或三級結構。作為嵌合蛋白搭配物，XTEN 可充當載體，從而例如當連接於本發明之 VWF 片段或 FVIII 序列以產生嵌合蛋白時，賦予某些合乎需要之藥物動力學、物理化學及醫藥性質。此等合乎需要之性質包括(但不限於)增強之藥物動力學參數及溶解性特徵。如本文所用，「XTEN」明確排除抗體或抗體片段，諸如單鏈抗體或輕鏈或重鏈之 Fc 片段。

[0156] 在一些實施例中，本發明之 XTEN 序列為具有多於約 20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950、1000、1200、1400、1600、1800 或 2000 個胺基酸殘基之肽或多肽。在某些實施例中，XTEN 為具有多於約 20 至約 3000 個胺基酸殘基、多於 30 至約 2500 個殘基、多於 40 至約 2000 個殘基、多於 50 至約 1500 個殘基、多於 60 至約 1000 個殘

基、多於 70 至約 900 個殘基、多於 80 至約 800 個殘基、多於 90 至約 700 個殘基、多於 100 至約 600 個殘基、多於 110 至約 500 個殘基、或多於 120 至約 400 個殘基之肽或多肽。

[0157] 本發明之 XTEN 序列可包含一或多個具有 9 至 14 個胺基酸殘基之序列基元或與該序列基元至少 80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%一致之胺基酸序列，其中該基元包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：4 至 6 種類型之選自由以下組成之群之胺基酸：甘胺酸(G)、丙胺酸(A)、絲胺酸(S)、酰胺酸(T)、麩胺酸(E)及脯胺酸(P)。參見 US 2010-0239554 A1。

[0158] 在一些實施例中，XTEN 包含不重疊序列基元，其中序列之約 80%、或至少約 85%、或至少約 90%、或約 91%、或約 92%、或約 93%、或約 94%、或約 95%、或約 96%、或約 97%、或約 98%、或約 99%或約 100%由多個選自自表 2A 選擇之單一基元家族之不重疊序列之單元組成，從而產生家族序列。如本文所用，「家族」意謂 XTEN 具有僅選自來自表 2A 之單一基元類別的基元；亦即 AD、AE、AF、AG、AM、AQ、BC 或 BD XTEN，且選擇 XTEN 中之不來自家族基元之任何其他胺基酸以達成所需性質，諸如允許藉由編碼核苷酸來併入限制位點，併入裂解序列，或達成與 FVIII 或 VWF 之更佳連接。在 XTEN 家族之一些實施例中，XTEN 序列包含 AD 基元家族或 AE

基元家族或 AF 基元家族或 AG 基元家族或 AM 基元家族或 AQ 基元家族或 BC 家族或 BD 家族之多個不重疊序列基元單元，從而所得 XTEN 展現上述同源性範圍。在其他實施例中，XTEN 包含來自表 2A 之兩個或兩個以上基元家族之多個基元序列單元。可選擇此等序列以達成由以下更充分描述之胺基酸組成所賦予之所要物理/化學特徵，包括諸如淨電荷、親水性、缺乏二級結構或缺乏重複性之性質。在此段落中之上文所述實施例中，可使用本文所述之方法選擇及裝配併入 XTEN 中之基元以獲得具有約 36 至約 3000 個胺基酸殘基之 XTEN。

表2A. 具有12個胺基酸之XTEN序列基元及基元家族

基元家族	基元序列
AD	GESPGGSSGSES
AD	GSEGSSGPGEES
AD	GSSESGSSEGGP
AD	GSGGEPSESGSS
AE, AM	GSPAGSPTSTEE
AE, AM, AQ	GSEPATSGSETP
AE, AM, AQ	GTSESATPESGP
AE, AM, AQ	GTSTEPSEGSAP
AF, AM	GSTSESPSGTAP
AF, AM	GTSTPESGSASP
AF, AM	GTSPSGESSTAP
AF, AM	GSTSSTAESPGP
AG, AM	GTPGSGTASSSP
AG, AM	GSSTPSGATGSP
AG, AM	GSSPSASTGTGP
AG, AM	GASPGTSSTGSP
AQ	GEPAGSPTSTSE
AQ	GTGEPSTPASE
AQ	GSGPSTESAPTE
AQ	GSETPSGPSETA
AQ	GPSETSTSEPGA
AQ	GSPSEPTEGTSA
BC	GSGASEPTSTEP
BC	GSEPATSGTEPS
BC	GTSEPSTSEPGA
BC	GTSTEPSEPGSA
BD	GSTAGSETSTEA
BD	GSETATSGSETA
BD	GTSESATSESGA
BD	GTSTEASEGSAS

* 表示當以各種排列一起使用時產生「家族序列」之個別基元序列

[0159] XTEN 可具有不同長度以供插入 FVIII 或 VWF 中或與 FVIII 或 VWF 連接。在一個實施例中，基於欲在融合蛋白中達成之性質或功能選擇 XTEN 序列之長度。視預定性質或功能而定，XTEN 可為短或中等長度序列或可充當載體之較長序列。在某些實施例中，XTEN 包括具有

約 6 至約 99 個胺基酸殘基之短區段、具有約 100 至約 399 個胺基酸殘基之中等長度、及具有約 400 至約 1000 且至多約 3000 個胺基酸殘基之較長長度。因此，插入 FVIII 或 VWF 中或連接於 FVIII 或 VWF 之 XTEN 之長度可為約 6、約 12、約 36、約 40、約 42、約 72、約 96、約 144、約 288、約 400、約 500、約 576、約 600、約 700、約 800、約 864、約 900、約 1000、約 1500、約 2000、約 2500 或至多約 3000 個胺基酸殘基長。在其他實施例中，XTEN 序列之長度為約 6 至約 50、約 50 至約 100、約 100 至 150、約 150 至 250、約 250 至 400、約 400 至約 500、約 500 至約 900、約 900 至 1500、約 1500 至 2000、或約 2000 至約 3000 個胺基酸殘基。插入 FVIII 或 VWF 中或連接於 FVIII 或 VWF 之 XTEN 之精確長度可在不會不利地影響 FVIII 或 VWF 之活性下變化。在一個實施例中，本文使用之一或多個 XTEN 在長度方面具有 36 個胺基酸、42 個胺基酸、72 個胺基酸、144 個胺基酸、288 個胺基酸、576 個胺基酸或 864 個胺基酸且可選自一或多個 XTEN 家族序列；亦即 AD、AE、AF、AG、AM、AQ、BC 或 BD。

[0160] 在一些實施例中，本發明中使用之 XTEN 序列與選自由以下組成之群之序列至少 60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 一致：AE42、AG42、AE48、AM48、AE72、AG72、AE108、AG108、AE144、AF144、

AG144 、 AE180 、 AG180 、 AE216 、 AG216 、 AE252 、
 AG252 、 AE288 、 AG288 、 AE324 、 AG324 、 AE360 、
 AG360 、 AE396 、 AG396 、 AE432 、 AG432 、 AE468 、
 AG468 、 AE504 、 AG504 、 AF504 、 AE540 、 AG540 、
 AF540 、 AD576 、 AE576 、 AF576 、 AG576 、 AE612 、
 AG612 、 AE624 、 AE648 、 AG648 、 AG684 、 AE720 、
 AG720 、 AE756 、 AG756 、 AE792 、 AG792 、 AE828 、
 AG828 、 AD836 、 AE864 、 AF864 、 AG864 、 AM875 、
 AE912 、 AM923 、 AM1318 、 BC864 、 BD864 、 AE948 、
 AE1044 、 AE1140 、 AE1236 、 AE1332 、 AE1428 、
 AE1524 、 AE1620 、 AE1716 、 AE1812 、 AE1908 、
 AE2004A 、 AG948 、 AG1044 、 AG1140 、 AG1236 、
 AG1332 、 AG1428 、 AG1524 、 AG1620 、 AG1716 、
 AG1812 、 AG1908 及 AG2004 。 參見 US 2010-0239554
 A1 。

[0161] 在一個實施例中，XTEN 序列與選自由以下組成之群之胺基酸序列至少 60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致：AE42(SEQ ID NO: 36)、AE72(SEQ ID NO: 127)、AE144_2A(SEQ IDNO: 128)、AE144_3B(SEQ ID NO: 129)、AE144_4A(SEQ ID NO: 130)、AE144_5A(SEQ IDNO: 131)、AE144_6B(SEQ IDNO: 132)、AG144_A(SEQ ID NO: 133)、AG144_B(SEQ IDNO: 134)、AG144_C(SEQ ID NO: 135)、AG144_F(SEQ IDNO: 136)、AE864(SEQ ID NO: 43)、AE576(SEQ ID NO:

41)、AE288(SEQ ID NO: 39)、AE288_2(SEQ ID NO: 137)、AE144(SEQ ID NO: 37)、AG864(SEQ ID NO: 44)、AG576(SEQ ID NO: 42)、AG288(SEQ ID NO: 40)、AG144(SEQ ID NO: 38)及其任何組合。在另一實施例中，XTEN 序列係選自由以下組成之群：AE42(SEQ ID NO: 36)、AE72(SEQ ID NO: 127)、AE144_2A(SEQ ID NO: 128)、AE144_3B(SEQ ID NO: 129)、AE144_4A(SEQ ID NO: 130)、AE144_5A(SEQ ID NO: 131)、AE144_6B(SEQ ID NO: 132)、AG144_A(SEQ ID NO: 133)、AG144_B(SEQ ID NO: 134)、AG144_C(SEQ ID NO: 135)、AG144_F(SEQ ID NO: 136)、AE864(SEQ ID NO: 43)、AE576(SEQ ID NO: 41)、AE288(SEQ ID NO: 39)、AE288_2(SEQ ID NO: 137)、AE144(SEQ ID NO: 37)、AG864(SEQ ID NO: 44)、AG576(SEQ ID NO: 42)、AG288(SEQ ID NO: 40)、AG144(SEQ ID NO: 38)及其任何組合。在一特定實施例中，XTEN 序列為 AE288。本發明之某些 XTEN 序列之胺基酸序列展示於表 2B 中。

表2B. XTEN序列

XTEN	氨基酸序列
AE42 SEQ ID NO: 36	GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS
AE72 SEQ ID NO: 127	GAP TSESATPESG PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG TSTEPSEGSA PGASS
AE144 SEQ ID NO:37	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESA PESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
AE144_2A (SEQ ID NO: 128)	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPG
AE144_3B (SEQ ID NO: 129)	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPG
AE144_4A (SEQ ID NO: 130)	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AE144_5A (SEQ ID NO: 131)	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEG
AE144_6B (SEQ ID NO: 132)	TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSE PATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AG144 SEQ ID NO:38	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP
AG144_A	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASP

(SEQ ID NO: 133)	GTSSTGSPGASPGTSSTGSP
AG144_B (SEQ ID NO: 134)	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSP
AG144_C (SEQ ID NO: 135)	GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGT PGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGASPGTSSTGSP
AG144_F (SEQ ID NO: 136)	GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGASPGTSSTGSP
AE288 SEQ ID NO:39	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AE288_2 (SEQ ID NO: 137)	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG288 SEQ ID NO:40	PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS
AE576 SEQ ID NO:41	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG576 SEQ ID NO:42	PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS
AE864	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST

SEQ ID NO:43	EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG864 SEQ ID NO:44	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSSTPSGA TGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSSTPSGATGSPG SSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP

[0162] 在其他實施例中，本發明中使用之 XTEN 序列影響本發明之嵌合蛋白之物理或化學性質，例如藥物動力學。本發明中使用之 XTEN 序列可展現一或多種以下有利性質：構形可撓性、增強之水溶性、高度蛋白酶抗性、低免疫原性、與哺乳動物受體之低結合性或增加之流體動力學(或斯托克斯(Stokes))半徑。在一特定實施例中，連接於本發明中之 FVIII 蛋白質之 XTEN 序列增加藥物動力學性質，諸如較長終末半衰期或增加之曲線下面積(AUC)，以使本文所述之嵌合蛋白相較於野生型 FVIII 在活體內停留之時期增加。在其他實施例中，本發明中使用之 XTEN 序列增加藥物動力學性質，諸如較長終末半衰期或增加之曲線下面積(AUC)，以使 FVIII 蛋白質相較於野生型 FVIII 在活體內停留之時期增加。

[0163] 多種方法及分析可用於測定包含 XTEN 序列之蛋白質之物理/化學性質。此等方法包括(但不限於)分析性離心、EPR、HPLC-離子交換、HPLC-尺寸排阻、逆相 HPLC、光散射、毛細管電泳、圓二色性、示差掃描熱分析法、螢光、HPLC-離子交換、HPLC-尺寸排阻、IR、NMR、拉曼(Raman)光譜術、折射法及 UV/可見光譜術。其他方法揭露於 Amau 等人, *Prot Expr and Purif* 48, 1-13 (2006)中。

[0164] 可根據本發明使用之 XTEN 序列之其他實例揭露於美國專利公開案第 2010/0239554 A1 號、第 2010/0323956 A1 號、第 2011/0046060 A1 號、第 2011/0046061 A1 號、第 2011/0077199 A1 號或第 2011/0172146 A1 號、或國際專利公開案第 WO 2010091122 A1 號、第 WO 2010144502 A2 號、第 WO 2010144508 A1 號、第 WO 2011028228 A1 號、第 WO 2011028229 A1 號或第 WO 2011028344 A2 號中。

C)因子 VIII(FVIII)蛋白質

[0165] 除非另外規定，否則如本文所用之「FVIII 蛋白質」意謂在凝血中發揮正常作用之功能性 FVIII 多肽。術語 FVIII 蛋白質包括其保留全長野生型因子 VIII 在凝血路徑中之功能之功能性片段、變異體、類似物或衍生物。

「FVIII 蛋白質」可與 FVIII 多肽(或蛋白質)或 FVIII 互換使用。FVIII 功能之實例包括(但不限於)能夠活化凝血、

能夠充當因子 IX 之輔因子、或能夠在 Ca^{2+} 及磷脂存在下與因子 IX 形成因子 X 酶複合物，該因子 X 酶複合物接著將因子 X 轉化成活化形式 Xa 。FVIII 蛋白質可為人類、豬、犬、大鼠或鼠類 FVIII 蛋白質。此外，來自人類與其他物種之 FVIII 之間的比較已鑒別出可能為功能所需之保守殘基 (Cameron 等人, *Thromb. Haemost.* 79:317-22 (1998); US 6,251,632)。

[0166] 許多測試可用於評估凝血系統之功能：活化部分凝血酶原激酶時間(aPTT)測試、顯色分析、ROTEM 分析、凝血酶原時間(PT)測試(亦用於測定 INR)、纖維蛋白原測試(常藉由克勞斯(Clauss)方法)、血小板計數、血小板功能測試(常藉由 PFA-100)、TCT、流血時間、混合測試(若患者之血漿與正常血漿混合，則是否進行異常性校正)、凝血因子分析、抗磷脂抗體、D-二聚體、遺傳測試(例如因子 V Leiden、凝血酶原突變 G20210A)、稀釋魯塞爾蝰蛇毒時間(Russell's viper venom time, dRVVT)、混雜血小板功能測試、凝血彈性描記術(TEG 或 Sonoclot)、凝血彈性量測術(TEM[®]，例如 ROTEM[®])或優球蛋白(euglobulin)溶解時間(ELT)。

[0167] aPTT 測試為量度「內在」凝血路徑(亦稱為接觸活化路徑)與共同凝血路徑兩者之功效之效能指標。此測試通常用於量測市售重組凝結因子(例如 FVIII 或 FIX)之凝結活性。其係與量度外在路徑之凝血酶原時間(PT)結合使用。

[0168] ROTEM 分析提供關於以下完整止血動力學之資訊：凝結時間、凝塊形成、凝塊穩定性及溶解。凝血彈性量測術中之不同參數取決於血漿凝血系統之活性、血小板功能、纖維蛋白溶解或影響此等相互作用之許多因素。此分析可提供對次級止血之完全綜覽。

[0169] 已知 FVIII 多肽及聚核苷酸序列，亦已知許多功能性片段、突變體及修飾形式。以下展示人類 FVIII 序列(全長)之實例。

表4. 編碼全長FVIII之核苷酸序列(SEQ ID NO: 5)*

661				ATG	CAAATAGAGC	TCTCCACCTG
721	CTTCTTTCTG	TGCCTTTTGC	GATTCTGCTT	TAGTGCCACC	AGAAGATACT	ACCTGGGTGC
781	AGTGGAACCTG	TCATGGGACT	ATATGCAAAG	TGATCTCGGT	GAGCTGCCTG	TGGACGCAAG
841	ATTTCTCCT	AGAGTGCCAA	AATCTTTTCC	ATTCAACACC	TCAGTCGTGT	ACAAAAAGAC
901	TCTGTTTGT	GAATTCACGG	ATCACCTTTT	CAACATCGCT	AAGCCAAGGC	CACCCTGGAT
961	GGGTCTGCTA	GGTCTACCA	TCCAGGCTGA	GGTTTATGAT	ACAGTGGTCA	TTACTACTAA
1021	GAACATGGCT	TCCCATCCTG	TCAGTCTTCA	TGCTGTTGGT	GTATCCTACT	GGAAAGCTTC
1081	TGAGGGAGCT	GAATATGATG	ATCAGACCAG	TCAAAGGGAG	AAAGAAGATG	ATAAAGTCTT
1141	CCCTGGTGGA	AGCCATACAT	ATGTCTGGCA	GGTCTGAAA	GAGAATGGTC	CAATGGCCTC
1201	TGACCCACTG	TGCCTTACCT	ACTCATATCT	TTCTCATGTG	GACCTGGTAA	AAGACTTGAA
1261	TTCAGGCCTC	ATTGGAGCCC	TACTAGTATG	TAGAGAAGGG	AGTCTGGCCA	AGGAAAAGAC
1321	ATCAGAACTTG	CACAAATTTA	TACTACTTTT	TGCTGTATTT	GATGAAGGGA	AAAGTTGGCA
1381	CTCAGAAACA	AAGAACTCCT	TGATGCAGGA	TAGGGATGCT	GCATCTGCTC	GGGCTGGGCC
1441	TAAATGTCAC	ACAGTCAATG	GTTATGTAAA	CAGGTCTCTG	CCAGGTCTGA	TTGGATGCCA
1501	CAGGAAATCA	GTCTATTGGC	ATGTGATTGG	AATGGGCACC	ACTCCTGAAG	TGCACCTCAAT
1561	ATTCCTCGAA	GGTCACACAT	TTCTTGTGAG	GAACCATCGC	CAGGCGTCTC	TGGAAATCTC
1621	GCCAATAACT	TTCTTACTG	CTCAAACACT	CTTGATGGAC	CTTGGACAGT	TTCTACTGTT
1681	TTGTCATATC	TCTTCCCACC	AACATGATGG	CATGGAAGCT	TATGTCAAAG	TAGACAGCTG
1741	TCCAGAGGAA	CCCCAACTAC	GAATGAAAAA	TAATGAAGAA	GCGGAAGACT	ATGATGATGA
1801	TCTTACTGAT	TCTGAAATGG	ATGTGGTCAG	GTTTGATGAT	GACAACTCTC	CTTCTTTTAT
1861	CCAAATTCGC	TCAGTTGCCA	AGAAGCATCC	TAAAACTTGG	GTACATTACA	TTGCTGCTGA
1921	AGAGGAGGAC	TGGGACTATG	CTCCCTTAGT	CCTCGCCCCC	GATGACAGAA	GTTATAAAAG
1981	TCAATATTTG	AACAATGGCC	CTCAGCGGAT	TGGTAGGAAG	TACAAAAAAG	TCCGATTTAT
2041	GGCATAACAC	GATGAAACCT	TTAAGACTCG	TGAAGCTATT	CAGCATGAAT	CAGGAATCTT
2101	GGGACCTTTA	CTTTATGGGG	AAGTTGGAGA	CACACTGTTG	ATTATATTTA	AGAATCAAGC
2161	AAGCAGACCA	TATAACATCT	ACCCTCACGG	AATCACTGAT	GTCCGTCCTT	TGTATTCAAG
2221	GAGATTACCA	AAAGGTGTAA	AACATTTGAA	GGATTTTCCA	ATTCTGCCAC	GAGAAATATT
2281	CAAATATAAA	TGGACAGTGA	CTGTAGAAGA	TGGGCCAACT	AAATCAGATC	CTCGGTGCCT
2341	GACCCGCTAT	TACTCTAGTT	TCGTTAATAT	GGAGAGAGAT	CTAGCTTCAG	GACTCATTGG
2401	CCCTCTCCTC	ATCTGCTACA	AAGAATCTGT	AGATCAAAGA	GGAAACCAGA	TAATGTCAGA
2461	CAAGAGGAAT	GTCTCCTGT	TTTCTGTATT	TGATGAGAAC	CGAAGCTGGT	ACCTCACAGA
2521	GAATATACAA	CGCTTTCTCC	CCAATCCAGC	TGGAGTGCAG	CTTGAGGATC	CAGAGTTCCA
2581	AGCCTCCAAC	ATCATGCACA	GCATCAATGG	CTATGTTTTT	GATAGTTTGC	AGTTGTCAGT
2641	TTGTTTGCAT	GAGGTGGCAT	ACTGGTACAT	TCTAAGCATT	GGAGCACAGA	CTGACTTCCT
2701	TTCTGTCTTC	TTCTCTGGAT	ATACCTTCAA	ACACAAAATG	GTCTATGAAG	ACACACTCAC
2761	CCTATTCCCA	TTCTCAGGAG	AACTGTCTT	CATGTCGATG	GAAAACCCAG	GTCTATGGAT
2821	TCTGGGGTGC	CACAACTCAG	ACTTTCGGAA	CAGAGGCATG	ACCGCCTTAC	TGAAGGTTTC
2881	TAGTTGTGAC	AAGAACACTG	GTGATTATTA	CGAGGACAGT	TATGAAGATA	TTTCAGCATA
2941	CTTGCTGAGT	AAAAACAATG	CCATTGAACC	AAGAAGCTTC	TCCCAGAATT	CAAGACACCC
3001	TAGCACTAGG	CAAAAGCAAT	TTAATGCCAC	CACAATTCCA	GAAAATGACA	TAGAGAAGAC
3061	TGACCCTTGG	TTTGACACAC	GAACACCTAT	GCCTAAAATA	CAAAATGTCT	CCTCTAGTGA
3121	TTTGTTGATG	CTCTTGCGAC	AGAGTCCTAC	TCCACATGGG	CTATCCTTAT	CTGATCTCCA
3181	AGAAGCCAAA	TATGAGACTT	TTTCTGATGA	TCCATCACCT	GGAGCAATAG	ACAGTAATAA
3241	CAGCTGTCT	GAAATGACAC	ACTTCAGGCC	ACAGCTCCAT	CACAGTGGGG	ACATGGTATT
3301	TACCCCTGAG	TCAGGCCTCC	AATTAAGATT	AAATGAGAAA	CTGGGGACAA	CTGCAGCAAC
3361	AGAGTTGAAG	AAACTTGATT	TCAAAGTTTC	TAGTACATCA	AATAATCTGA	TTTCAACAAT
3421	TCCATCAGAC	AATTTGGCAG	CAGGTACTGA	TAATACAAGT	TCCTTAGGAC	CCCCAAGTAT
3481	GCCAGTTCAT	TATGATAGTC	AATTAGATAC	CACCTCTATT	GGCAAAAAGT	CATCTCCCTT
3541	TACTGAGTCT	GGTGGACCTC	TGAGCTTGAG	TGAAGAAAAT	AATGATTCAA	AGTTGTTAGA
3601	ATCAGGTTTA	ATGAATAGCC	AAGAAAGTTC	ATGGGGAAAA	AATGTATCGT	CAACAGAGAG
3661	TGGTAGGTTA	TTTAAAGGGA	AAAGAGCTCA	TGGACCTGCT	TTGTTGACTA	AAGATAATGC
3721	CTTATTCAAA	GTTAGCATCT	CTTTGTTAAA	GACAAACAAA	ACTTCCAATA	ATTCAGCAAC

3781	TAATAGAAAG	ACTCACATTG	ATGGCCCATC	ATTATTAATT	GAGAATAGTC	CATCAGTCTG
3841	GCAAAATATA	TTAGAAAGTG	ACACTGAGTT	TAAAAAAGTG	ACACCTTTGA	TTCATGACAG
3901	AATGCTTATG	GACAAAAATG	CTACAGCTTT	GAGGCTAAAT	CATATGTCAA	ATAAAACTAC
3961	TTCATCAAAA	AACATGGAAA	TGGTCCAACA	GAAAAAAGAG	GGCCCCATTC	CACCAGATGC
4021	ACAAAATCCA	GATATGTCGT	TCTTTAAGAT	GCTATTCTTG	CCAGAATCAG	CAAGGTGGAT
4081	ACAAAGGACT	CATGGAAAGA	ACTCTCTGAA	CTCTGGGCAA	GGCCCCAGTC	CAAAGCAATT
4141	AGTATCCTTA	GGACCAGAAA	AATCTGTGGA	AGGTCAGAAT	TTCTTGCTCTG	AGAAAAACAA
4201	AGTGGTAGTA	GGAAAGGGTG	AATTTACAAA	GGACGTAGGA	CTCAAAGAGA	TGGTTTTTCC
4261	AAGCAGCAGA	AACCTATTTT	TTACTAACTT	GGATAATTTA	CATGAAAATA	ATACACACAA
4321	TCAAGAAAAA	AAAATTCAGG	AAGAAATAGA	AAAGAAGGAA	ACATTAATCC	AAGAGAATGT
4381	AGTTTTGCCT	CAGATACATA	CAGTGACTGG	CACTAAGAAT	TTCATGAAGA	ACCTTTTCTT
4441	ACTGAGCACT	AGGCAAAATG	TAGAAGGTTT	ATATGACGGG	GCATATGCTC	CAGTACTTCA
4501	AGATTTTAGG	TCATTAAATG	ATTCAACAAA	TAGAACAAAG	AAACACACAG	CTCATTTCTC
4561	AAAAAAAGGG	GAGGAAGAAA	ACTTGGAAGG	CTTGGGAAAT	CAAACCAAGC	AAATTGTAGA
4621	GAAATATGCA	TGCACCACAA	GGATATCTCC	TAATACAAGC	CAGCAGAATT	TTGTCAACGA
4681	ACGTAGTAAG	AGAGCTTTGA	AACAATTGAG	ACTCCCCTTA	GAAGAAACAG	AACTTGAAAA
4741	AAGGATAATT	GTGGATGACA	CCTCAACCCA	GTGGTCCAAA	AACATGAAAC	ATTTGACCCC
4801	GAGCACCCCT	ACACAGATAG	ACTACAATGA	GAAGGAGAAA	GGGGCCATTA	CTCAGTCTCC
4861	CTTATCATAG	TGCCTTACGA	GGAGTCATAG	CATCCCTCAA	GCAAATAGAT	CTCCATTACC
4921	CATTGCAAAAG	GTATCATCAT	TTCCATCTAT	TAGACCTATA	TATCTGACCA	GGGTCTTATT
4981	CCAAGACAAC	TCTTCTCATC	TTCCAGCAGC	ATCTTATAGA	AAGAAAAGATT	CTGGGGTCCA
5041	AGAAAGCAGT	CATTTCTTAC	AAGGAGCCAA	AAAAAATAAC	CTTTCTTTAG	CCATTCTAAC
5101	CTTGAGAGATG	ACTGGTGATC	AAAGAGAGGT	TGGCTCCCTG	GGGACAAAGTG	CCACAAATTC
5161	AGTCACATAC	AAGAAAGTTG	AGAACACTGT	TCTCCCGAAA	CCAGACTTGC	CCAAAACATC
5221	TGGCAAAGTT	GAATTGCTTC	CAAAAGTTCA	CATTTATCAG	AAGGACCTAT	TCCCTACGGA
5281	AACTAGCAAT	GGGTCTCCTG	GCCATCTGGA	TCTCGTGGAA	GGGAGCCTTC	TTCAGGGAAC
5341	AGAGGGAGCG	ATTAAGTGGA	ATGAAGCAAA	CAGACCTGGA	AAAGTTCCCT	TTCTGAGAGT
5401	AGCAACAGAA	AGCTCTGCAA	AGACTCCCTC	CAAGCTATTG	GATCCTCTTG	CTTGGGATAA
5461	CCACTATGGT	ACTCAGATAC	CAAAAGAAGA	GTGGAAATCC	CAAGAGAAAGT	CACCAGAAAA
5521	AACAGCTTTT	AAGAAAAAGG	ATACCATTTT	GTCCCTGAAC	GCTTGTGAAA	GCAATCATGC
5581	AATAGCAGCA	ATAAATGAGG	GACAAAATAA	GCCCCGAAAT	GAAGTCACCT	GGGCAAAGCA
5641	AGGTAGGACT	GAAAGGCTGT	GCTCTCAAAA	CCCACCACTC	TTGAAACGCC	ATCAACGGGA
5701	AATAACTCGT	ACTACTCTTC	AGTCAGATCA	AGAGGAAATT	GACTATGATG	ATACCATATC
5761	AGTTGAAATG	AAGAAGGAAG	ATTTTGACAT	TTATGATGAG	GATGAAAATC	AGAGCCCCCG
5821	CAGCTTTCAA	AAGAAAACAC	GACACTATTT	TATTGCTGCA	GTGGAGAGGC	TCTGGGATTA
5881	TGGGATGAGT	AGCTCCCCAC	ATGTTCTAAG	AAACAGGGCT	CAGAGTGGCA	GTGTCCCTCA
5941	GTTCAAGAAA	GTTGTTTTCC	AGGAATTTAC	TGATGGCTCC	TTTACTCAGC	CCTTATACCG
6001	TGGAGAATA	AATGAACATT	TGGGACTCCT	GGGGCCATAT	ATAAGAGCAG	AAGTTGAAGA
6061	TAATATCATG	GTAACCTTCA	GAAATCAGGC	CTCTCGTCCC	TATTCCTTCT	ATTCTAGCCT
6121	TATTTCTTAT	GAGGAAGATC	AGAGGCAAGG	AGCAGAACCT	AGAAAAAACT	TTGTCAAGCC
6181	TAATGAAACC	AAAACCTACT	TTTGGAAGT	GCAACATCAT	ATGGCACCCA	CTAAAGATGA
6241	GTTTGACTGC	AAAGCCTGGG	CTTATTTCTC	TGATGTTGAC	CTGGAAAAAG	ATGTGCACTC
6301	AGGCCTGATT	GGACCCCTTC	TGGTCTGCCA	CACTAACACA	CTGAACCCTG	CTCATGGGAG
6361	ACAAGTGACA	GTACAGGAAT	TTGCTCTGTT	TTTCACCATC	TTTGATGAGA	CCAAAAGCTG
6421	GTAATTCATC	GAAAATATGG	AAAGAACTG	CAGGGCTCCC	TGCAATATCC	AGATGGAAGA
6481	TCCCACCTTT	AAAGAGAATT	ATCGCTTCCA	TGCAATCAAT	GGCTACATAA	TGGATACACT
6541	ACCTGGCTTA	GTAATGGCTC	AGGATCAAAG	GATTTCGATG	TATCTGCTCA	GCATGGGCAG
6601	CAATGAAAAC	ATCCATTCTA	TTGATTTTCA	TGGACATGTG	TTCACTGTAC	GAAAAAAGAA
6661	GGAGTATAAA	ATGGCACTGT	ACAATCTCTA	TCCAGGTGTT	TTTGAGACAG	TGGAAATGTT
6721	ACCATCCAAA	GCTGGAATTT	GGCGGGTGGA	ATGCCTTATT	GGCGAGCATC	TACATGCTGG
6781	GATGAGCACA	CTTTTTCTGG	TGTACAGCAA	TAAGTGTCAG	ACTCCCTTGG	GAATGGCTTC
6841	TGGACACATT	AGAGATTTTC	AGATTACAGC	TTCAGGACAA	TATGGACAGT	GGGCCCCAAA
6901	GCTGGCCAGA	CTTCATTATT	CCGGATCAAT	CAATGCCTGG	AGCACCAAGG	AGCCCTTTTC
6961	TTGGATCAAG	GTGGATCTGT	TGGCACCAAT	GATTATTAC	GGCATCAAGA	CCCAGGGTGC
7021	CCGTCAGAAG	TTCTCCAGCC	TCTACATCTC	TCAGTTTATC	ATCATGTATA	GTCTTGATGG
7081	GAAGAAGTGG	CAGACTTATC	GAGGAAATTC	CACTGGAACC	TTAATGGTCT	TCTTTGGCAA
7141	TGTGGATTCA	TCTGGGATAA	AACACAATAT	TTTTAACCTT	CCAATTATTG	CTCGATACAT
7201	CCGTTTGCAC	CCAACCTATT	ATAGCATTCG	CAGCACTCTT	CGCATGGAGT	TGATGGGCTG
7261	TGATTTAAAT	AGTTGCAGCA	TGCCATTGGG	AATGGAGAGT	AAAGCAATAT	CAGATGCACA

7321	GATTACTGCT	TCATCCTACT	TTACCAATAT	GTTTGCCACC	TGGTCTCCTT	CAAAAGCTCG
7381	ACTTCACCTC	CAAGGGAGGA	GTAATGCCTG	GAGACCTCAG	GTGAATAATC	CAAAAGAGTG
7441	GCTGCAAGTG	GACTTCCAGA	AGACAATGAA	AGTCACAGGA	GTAAC TACTC	AGGGAGTAAA
7501	ATCTCTGCTT	ACCAGCATGT	ATGTGAAGGA	GTTTCCTCATC	TCCAGCAGTC	AAGATGGCCA
7561	TCAGTGGACT	CTCTTTTTTC	AGAATGGCAA	AGTAAAGGTT	TTTCAGGGAA	ATCAAGACTC
7621	CTTCACACCT	GTGGTGAAC T	CTCTAGACCC	ACCGTTACTG	ACTCGCTACC	TTCGAATTCA
7681	CCCCCAGAGT	TGGGTGCACC	AGATTGCCCT	GAGGATGGAG	GTTCTGGGCT	GCGAGGCACA
7741	GGACCTCTAC					

* 加下劃線之核酸編碼信號肽。

[0170] FVIII 多肽包括全長 FVIII、全長 FVIII 減去 N 末端 Met、成熟 FVIII(減去信號序列)、在 N 末端具有另一 Met 之成熟 FVIII 及/或 B 域全部或部分缺失之 FVIII。在某些實施例中，FVIII 變異體包括 B 域缺失，無論部分或全部缺失。

[0171] 天然成熟人類 FVIII 之序列呈現為 SEQ ID NO: 4。天然 FVIII 蛋白質具有下式：A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2，其中 A1、A2 及 A3 為結構上相關之「A 域」，B 為「B 域」，C1 及 C2 為結構上相關之「C 域」，且 a1、a2 及 a3 為酸性間隔子區。關於 SEQ ID NO: 4 中之一級胺基酸序列位置，人類 FVIII 之 A1 域自 Ala1 延伸至約 Arg336，a1 間隔子區自約 Met337 延伸至約 Val374，A2 域自約 Ala375 延伸至約 Tyr719，a2 間隔子區自約 Glu720 延伸至約 Arg740，B 域自約 Ser741 延伸至約 Arg1648，a3 間隔子區自約 Glu1649 延伸至約 Arg1689，A3 域自約 Ser1690 延伸至約 Leu2025，C1 域自約 Gly2026 延伸至約 Asn2072，且 C2 域自約 Ser2073 延伸至 Tyr2332。除特定蛋白水解裂解位點以外，對 FVIII 之域及區之間的邊界之位置的指定在不同參考文獻中可有

所不同。因此，本文中指示之邊界藉由使用術語「約」來指定為大致邊界。

[0172] 分離人類 FVIII 基因且在哺乳動物細胞中表現 (Toole, J. J., 等人, *Nature* 312:342-347 (1984); Gitschier, J., 等人, *Nature* 312:326-330 (1984); Wood, W. I., 等人, *Nature* 312:330-337 (1984); Vehar, G. A., 等人, *Nature* 312:337-342 (1984); WO 87/04187; WO 88/08035; WO 88/03558; 及美國專利第 4,757,006 號)。自如美國專利第 4,965,199 號中所示之 cDNA 推斷出 FVIII 胺基酸序列。此外，B 域部分或全部缺失之 FVIII 展示於美國專利第 4,994,371 號及第 4,868,112 號中。在一些實施例中，人類 FVIII B 域經如美國專利第 5,004,803 號中所示之人類因子 V B 域置換。編碼人類因子 VIII 之 cDNA 序列及胺基酸序列分別展示於美國申請公開案第 2005/0100990 號中之 SEQ ID NO: 4 及 5 中。

[0173] 豬 FVIII 序列公開於 Toole, J. J. 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5939-5942 (1986) 中。此外，由自豬脾 cDNA 文庫對 FVIII 序列進行 PCR 擴增獲得之完全豬 cDNA 序列已報導於 Healey, J. F. 等人, *Blood* 88:4209-4214 (1996) 中。具有所有域、所有次單元及特定胺基酸序列之取代之雜交人類/豬 FVIII 揭露於 Lollar 及 Runge 之美國專利第 5,364,771 號中及 WO 93/20093 中。新近，豬 FVIII 之 A1 及 A2 域及用豬 A1 及/或 A2 域取代相應人類域之嵌合 FVIII 的核苷酸及相應胺基酸序列報導於 WO

94/11503 中。Lollar, J. S.之美國專利第 5,859,204 號亦揭露豬 cDNA 及推斷出之胺基酸序列。美國專利第 6,458,563 號揭露一種 B 域缺失之豬 FVIII。

[0174] Lollar, J. S.之美國專利第 5,859,204 號報導了具有降低的抗原性及降低的免疫反應性之 FVIII 功能性突變體。Lollar, J. S.之美國專利第 6,376,463 號亦報導具有降低的免疫反應性之 FVIII 突變體。Saenko 等人之美國申請公開案第 2005/0100990 號報導了 FVIII 之 A2 域中之功能性突變。

[0175] 在一個實施例中，FVIII(或嵌合蛋白之 FVIII 部分)可與具有 SEQ ID NO: 6 之胺基酸 1 至 1438 或 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1 至 2332 的 FVIII 胺基酸序列(無信號序列)或具有 SEQ ID NO: 3 之胺基酸 1 至 19 及 SEQ ID NO: 6 之胺基酸 1 至 1438 或 SEQ ID NO: 3 之胺基酸 1 至 19 及 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1 至 2332 的 FVIII 胺基酸序列(具有信號序列)至少 50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致，其中該 FVIII 具有凝結活性，例如作為輔因子活化因子 IX 以將因子 X 轉化成活化型因子 X。FVIII(或嵌合蛋白之 FVIII 部分)可與具有 SEQ ID NO: 6 之胺基酸 1 至 1438 或 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1 至 2332 的 FVIII 胺基酸序列(無信號序列)一致。FVIII 可進一步包含信號序列。

[0176] 如本文所用之 FVIII 之「B 域」與此項技術中已知之藉由內部胺基酸序列一致性及蛋白水解裂解位點界

定之 B 域相同，例如為全長人類 FVIII 之殘基 Ser741-Arg1648。其他人類 FVIII 域由以下胺基酸殘基界定：A1，殘基 Ala1-Arg372；A2，殘基 Ser373-Arg740；A3，殘基 Ser1690-Asn2019；C1，殘基 Lys2020-Asn2172；C2，殘基 Ser2173-Tyr2332。A3-C1-C2 序列包括殘基 Ser1690-Tyr2332。剩餘序列殘基 Glu1649-Arg1689 通常稱為 a3 酸性區。豬、小鼠及犬 FVIII 之包括 B 域在內之所有域的邊界位置在此項技術中亦為已知的。在一個實施例中，缺失 FVIII 之 B 域(「B 域缺失之因子 VIII」或「BDD FVIII」)。BDD FVIII 之一實例為 REFACTO[®](重組 BDD FVIII)，其具有與表 5 中之序列之因子 VIII 部分相同的序列。(BDD FVIII 重鏈加雙下劃線；B 域用斜體表示；且 BDD FVIII 輕鏈呈純文本形式)。編碼表 5 之核苷酸序列(SEQ ID NO: 7)展示於表 6 中。

表5. B域缺失之因子VIII(BDD FVIII)之胺基酸序列

BDD FVIII (SEQ ID NO: 6)

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFP	PRVPKSF	PNTSVVYK	KT	LFVE	FTDHL	FNI	AKPR	PPWM	GLL
GPTIQAEVYD	TVVITL	KNMASH	PVSL	HAVGV	SYWK	ASEG	AEYDD	QTSQ	REKEDDKV
FP	GG	SHTY	VW	QVL	KEN				
GPMASD	PLCL	TYSY	LSH	VDL	VKDL	NSGL	I	GALL	VCRE
GLA	KE	KTQ	TL	HK	FILL	FAV	FDE	GK	SWH
SET	KN	SL							
MODRDA	ASAR	AWPK	MHTV	NGYV	NRSL	PGL	I	GCH	RKSV
YV	WH	VIG	M	GT	TPE	VHS	I	FLE	GHT
FL	VR	NH	RO	AS	LEI				
SPIT	FL	TA	OT	LL	MD	L	G	Q	FL
LF	CHI	SSH	Q	H	D	G	M	E	A
YV	K	V	D	S	C	P	E	E	P
Q	L	R	M	K	N	N	E	E	A
E	D	Y	D	D	L	T	D	S	E
M	D	V	V	R	F				
DDDN	SP	S	F	I	Q	I	R	S	V
A	K	K	P	K	T	W	V	H	I
A	A	E	E	D	W	D	Y	A	P
L	V	L	A	P	D	D	R	S	Y
K	S	Y	K	S	O	Y	L	N	G
P	O	R	I	G	R	K	Y	K	V
R	F	M	A	Y	T				
DE	T	F	K	T	R	E	A	I	Q
H	E	S	G	I	L	G	P	L	L
Y	G	E	V	G	D	T	L	L	I
I	F	K	N	Q	A	S	R	P	N
I	Y	P	H	G	I	T	D	V	R
P	L	S	R	R	L	P	K	G	V
K	H	L	K	D	F	P	I	L	
P	G	E	I	F	K	Y	K	W	T
V	T	V	E	D	G	P	T	K	S
D	P	R	C	L	T	R	Y	S	S
F	V	N	M	E	R	D	L	A	S
G	L	I	G	P	L	L	I	C	Y
K	E	S	V	D	Q	R	G	N	Q
I	M	S	D	K	R	N	V	I	L
S	V	F	D	E	N	R	S	W	L
T	E	N	I	Q	R	F	L	P	N
P	A	G	V	O	L	E	D	P	E
F	Q	A	S	N	I	M	H	S	I
N	G	Y	V	F	D	S	L	Q	L
S	V	C	L	H	E	V	A	Y	W
I	L	S	I	G	A	Q	T	D	F
L	S	V	F	S	G	Y	T	F	K
H	K	M	V	E	D	T	L	T	L
F	P	F	S	G	E	T	V	F	M
S	M	E	N	P	G	L	W	I	L
G	C	H	N	S	D	F	R	N	R
G	M	T	A	L	L	K	V	S	S
C	D	K	N	T	G	D	Y	Y	E
D	S	Y	E	D	I	S	V	E	M
K	K	E	D	F	D	I	Y	D	E
D	E	N	Q						
S	P	R	S	F	Q	K	K	R	H
Y	F	I	A	A	V	E	R	L	W
D	Y	G	M	S	S	S	P	H	V
L	R	N	R	A	Q	S	G	S	V
P	Q	F	K	K	V	V	F	Q	E
F	T	D	G	S	F	T	Q	P	L
Y	R	G	E	L	N	E	H	L	G
L	G	P	Y	I	R	A	E	V	E
D	N	I	M	V	T	F	R	N	Q
A	S	R	P	Y	S	F	Y	S	S
L	I	S	Y	E	D	Q	R	Q	A
E	P	R	K	N	F	V	K	P	N
E	T	K	T	Y	F	W	K	V	Q
H	M	A	P	T	K	D	E	F	
D	C	K	A	W	A	Y	F	S	D
V	D	L	E	K	D	V	H	S	G
L	I	G	P	L	L	V	C	H	T
N	T	L	N	P	A	H	G	R	Q
V	T	V	Q	E	F	A	L	F	F
T	I	F	D	E	T	K	S	W	Y
F	T	E	N	M	E	R	N	C	R
A	P								
C	N	I	Q	M	E	D	P	T	F
K	E	N	R	F	H	A	I	N	G
Y	I	M	D	T	L	P	G	L	V
M	A	Q	D	R	I	R	W	L	L
S	M	G	S	N	E	N	I	H	S
I	H	F	S	G	H	V	F	T	V
R	K	E	E	Y	K	M	A		
L	Y	N	L	P	G	V	F	E	T
V	E	M	P	S	K	A	G	I	W
R	V	E	C	L	I	G	E	H	L
H	A	G	M	S	T	L	F	L	V
S	N	K	C	Q	T	P	L	G	M
A	S	G	H	I	R	D	F	Q	I
T	A	S	G	Q	Y	G	Q	W	
A	P	K	L	A	R	L	H	Y	S
G	S	I	N	A	W	S	T	K	E
P	F	S	W	I	K	V	D	L	L
A	P	M	I	I	H	G	I	K	T
Q	G	A	R	Q	K	F	S	S	L
I	S	Q	F	I	M	Y	S	L	D
G	K	K	W	Q	T	Y	R	G	N
S	T	G	T	L	M	V	F	G	N
D	S	S	G	I	K	H	N	I	F
N	P	P	I	A	R	Y	I	R	L
H	P	T	H	S	I	R	S	T	L
R	M	E	L	M	G	C	D	L	N
S	C	S	M	P	L	G	M	E	S
K	A	I	S	D	A	Q	I		
T	A	S	S	Y	F	T	N	M	F
A	T	W	S	P	S	K	A	R	L
H	L	Q	G	R	S	N	A	W	R
P	Q	V	N	N	P	K	E	W	L
Q	V	D	F	Q	K	T	M	K	V
T	G	V	T	T	Q	G	V	K	S
L	L	T	S	M	Y	V	K	E	F
L	I	S	S	Q	D	G	H	Q	W
T	L	F	F	Q	N	K	V	K	V
F	Q	N	Q	D	S	F	T	P	V
V	N	S	L	D	P	L	L	T	R
I	L	R	I	H	P	Q	S	W	V
H	Q	I	A	L	R	M	E	V	L
G	C	E	A	Q	D	L	Y		

表6. 編碼BDD FVIII之核苷酸序列(SEQ ID NO: 7)*

661				A	TGCAAATAGA	GCTCTCCACC	TGCTTCTTTC
721	TGTGCCTTTT	GCGATTCTGC	TTTAGTGCCA	CCAGAAAGATA	CTACCTGGGT	GCAGTGGAAC	
781	TGTCATGGGA	CTATATGCAA	AGTGATCTCG	GTGAGCTGCC	TGTGGACGCA	AGATTTCTCTC	
841	CTAGAGTGCC	AAAATCTTTT	CCATTCAACA	CCTCAGTCGT	GTACAAAAAG	ACTCTGTTTG	
901	TAGAATTCAC	GGATCACCTT	TTCAACATCG	CTAAGCCAAG	GCCACCCTGG	ATGGGTCTGC	
961	TAGGTCTTAC	CATCCAGGCT	GAGGTTTATG	ATACAGTGGT	CATTACACTT	AAGAACATGG	
1021	CTTCCCATCC	TGTCAGTCTT	CATGCTGTTG	GTGTATCCTA	CTGGAAAGCT	TCTGAGGGAG	
1081	CTGAATATGA	TGATCAGACC	AGTCAAAGGG	AGAAAGAAGA	TGATAAAAGT	TTCCCTGGTG	
1141	GAAGCCATAC	ATATGTCTGG	CAGGTCCTGA	AAGAGAATGG	TCCAATGGCC	TCTGACCCAC	
1201	TGTGCCTTAC	CTACTCATAT	CTTTCTCATG	TGGACCTGGT	AAAAGACTTG	AATTGAGGCC	
1261	TCATTGGAGC	CCTACTAGTA	TGTAGAGAAG	GGAGTCTGGC	CAAGGAAAAG	ACACAGACCT	
1321	TGCACAAATT	TATACTACTT	TTTGCTGTAT	TTGATGAAGG	GAAAAGTTGG	CACTCAGAAA	
1381	CAAAGAATC	CTTGATGCAG	GATAGGGATG	CTGCATCTGC	TCGGGCCTGG	CCTAAAATGC	
1441	ACACAGTCAA	TGGTTATGTA	AACAGGTCTC	TGCCAGGTCT	GATTGGATGC	CACAGGAAAT	
1501	CAGTCTATTG	GCATGTGATT	GGAATGGGCA	CCACTCCTGA	AGTGCACTCA	ATATTCCTCG	
1561	AAGGTACAC	ATTTCTTGTTG	AGGAACCATC	GCCAGGCGTC	CTTGGAAATC	TCGCCAATAA	
1621	CTTTCCTTAC	TGCTCAAACA	CTCTTGATGG	ACCTTGGA	GTTTCTACTG	TTTTGTGATA	
1681	TCTCTTCCCA	CCAACATGAT	GGCATGGAAG	CTTATGTCAA	AGTAGACAGC	TGTCCAGAGG	
1741	AACCCCAACT	ACGAATGAAA	AATAATGAAG	AAGCGGAAGA	CTATGATGAT	GATCTTACTG	
1801	ATTCTGAAAT	GGATGTGGTC	AGGTTTGATG	ATGACAACTC	TCCTTCCTTT	ATCCAAATTC	
1861	GCTCAGTTGC	CAAGAAGCAT	CCTAAAACCT	GGGTACATTA	CATTGCTGCT	GAAGAGGAGG	
1921	ACTGGGACTA	TGCTCCCTTA	GTCCTCGCCC	CCGATGACAG	AAGTTATAAA	AGTCAATATT	
1981	TGAACAATGG	CCCTCAGCGG	ATTGGTAGGA	AGTACAAAAA	AGTCCGATTT	ATGGCATA	CA

2041	CAGATGAAAC	CTTTAAGACT	CGTGAAGCTA	TTCAGCATGA	ATCAGGAATC	TTGGGACCTT
2101	TACTTTATGG	GGAAGTTGGA	GACACACTGT	TGATTATATT	TAAGAATCAA	GCAAGCAGAC
2161	CATATAACAT	CTACCCTCAC	GGAATCACTG	ATGTCCGTCC	TTTGTATTCA	AGGAGATTAC
2221	CAAAGGTGT	AAAACATTTG	AAGGATTTTC	CAATTCTGCC	AGGAGAAATA	TTCAAATATA
2281	AATGGACAGT	GACTGTAGAA	GATGGGCCAA	CTAAATCAGA	TCCTCGGTGC	CTGACCCGCT
2341	ATTACTCTAG	TTTCGTTAAT	ATGGAGAGAG	ATCTAGCTTC	AGGACTCATT	GGCCCTCTCC
2401	TCATCTGCTA	CAAAGAATCT	GTAGATCAAA	GAGGAAACCA	GATAATGTCA	GACAAGAGGA
2461	ATGTCATCCT	GTTTTCTGTA	TTTGATGAGA	ACCGAAGCTG	GTACCTCACA	GAGAATATAC
2521	AACGCTTTCT	CCCCAATCCA	GCTGGAGTGC	AGCTTGAGGA	TCCAGAGTTC	CAAGCCTCCA
2581	ACATCATGCA	CAGCATCAAT	GGCTATGTTT	TTGATAGTTT	GCAGTTGTCA	GTTTGTGTTG
2641	ATGAGGTGGC	ATACTGGTAC	ATTCTAAGCA	TTGGAGCACA	GACTGACTTC	CTTTCTGTCT
2701	TCTTCTCTGG	ATATACCTTC	AAACACAAAA	TGGTCTATGA	AGACACACTC	ACCCTATTCC
2761	CATTCTCAGG	AGAACTGTC	TTCATGTCTG	TGGAACCC	AGGTCTATGG	ATTCTGGGGT
2821	GCCACAATC	AGACTTTCGG	AACAGAGGCA	TGACCGCCTT	ACTGAAGGTT	TCTAGTTGTG
2881	ACAAGAACAC	TGGTGATTAT	TACGAGGACA	GTTATGAAGA	TATTTTCAGCA	TACTTGCTGA
2941	GTAAAAACAA	TGCCATTGAA	CCAAGAAGCT	TCTCTCAAAA	CCCACGATC	TTGAAACGCC
3001	ATCAACGGGA	AATAACTCGT	ACTACTCTTC	AGTCAGATCA	AGAGGAAATT	GACTATGATG
3061	ATACCATATC	AGTTGAAATG	AAGAAGGAAG	ATTTTGACAT	TTATGATGAG	GATGAAAATC
3121	AGAGCCCCCG	CAGCTTTCAA	AAGAAAACAC	GACACTATTT	TATTGCTGCA	GTGGAGAGGC
3181	TCTGGGATTA	TGGGATGAGT	AGCTCCCCAC	ATGTTCTAAG	AAACAGGGCT	CAGAGTGGCA
3241	GTGTCCCTCA	GTTCAAGAAA	GTTGTTTTCC	AGGAATTTAC	TGATGGCTCC	TTTACTCAGC
3301	CCTTATACCG	TGGAGAACTA	AATGAACATT	TGGGACTCCT	GGGGCCATAT	ATAAGAGCAG
3361	AAGTTGAAGA	TAATATCATG	GTAACCTTCA	GAAATCAGGC	CTCTCGTCCC	TATTCCTTCT
3421	ATTCTAGCCT	TATTTCTTAT	GAGGAAGATC	AGAGGCAAGG	AGCAGAACCT	AGAAAAAAGT
3481	TTGTCAAGCC	TAATGAAACC	AAAACCTTACT	TTTGGAAGT	GCAACATCAT	ATGGCACCCA
3541	CTAAAGATGA	GTTTGACTGC	AAAGCCTGGG	CTTATTTCTC	TGATGTTGAC	CTGGAAAAAG
3601	ATGTGCACTC	AGGCCTGATT	GGACCCCTTC	TGGTCTGCCA	CACTAACACA	CTGAACCCCTG
3661	CTCATGGGAG	ACAAGTGACA	GTACAGGAAT	TTGCTCTGTT	TTTCACCATC	TTTGATGAGA
3721	CCAAAAGCTG	GTAATTTCACT	GAAAAATATG	AAAGAACTG	CAGGGCTCCC	TGCAATATCC
3781	AGATGGAAGA	TCCCACTTTT	AAAGAGAATG	ATCGCTTCCA	TGCAATCAAT	TGCAATATCC
3841	TGGATACACT	ACCTGGCTTA	GTAATGGCTC	AGGATCAAAAG	GATTCTGATG	TATCTGCTCA
3901	GCATGGGCAG	CAATGAAAAAC	ATCCATTCTA	TTCATTTTCAG	TGGACATGTG	TTCCTGTAC
3961	GAAAAAAAGA	GGAGTATAAA	ATGGCACTGT	ACAATCTCTA	TCCAGGTGTT	TTTGAGACAG
4021	TGGAAATGTT	ACCATCCAAA	GCTGGAATTT	GGCGGGTGGA	ATGCCTTATT	GGCGAGCATC
4081	TACATGCTGG	GATGAGCACA	CTTTTTCTGG	TGTACAGCAA	TAAGTGTGAG	ACTCCCTG
4141	GAATGGCTTC	TGGACACATT	AGAGATTTTC	AGATTACAGC	TTCAGGACAA	TATGGACAGT
4201	GGGCCCCAAA	GCTGGCCAGA	CTTCATTATT	CCGGATCAAT	CAATGCCTGG	AGCACCAGG
4261	AGCCCTTTTC	TTGGATCAAG	GTGGATCTGT	TGGCACCAAT	GATTATTAC	GGCATCAAGA
4321	CCCAGGGTGC	CCGTCAGAAAG	TTCTCCAGCC	TCTACATCTC	TCAGTTTATC	ATCATGTATA
4381	GTCTTGATGG	GAAGAAGTGG	CAGACTTATC	GAGGAAATTC	CACTGGAACC	TTAATGGTCT
4441	TCTTTGGCAA	TGTGGATTCA	TCTGGGATAA	AACACAATAT	TTTAAACCCT	CCAATTATTG
4501	CTCGATACAT	CCGTTTGAC	CCAATCTATT	ATAGCATTCTG	CAGCACTCTT	CGCATGGAGT
4561	TGATGGGCTG	TGATTTAAAT	AGTTGCAGCA	TGCCATTGGG	AATGGAGAGT	AAAGCAATAT
4621	CAGATGCACA	GATTACTGCT	TCATCCTACT	TTACCAATAT	GTTTGCCACC	TGGTCTCCTT
4681	CAAAAGCTCG	ACTTACCTC	CAAGGAGGGA	GTAATGCCTG	GAGACCTCAG	GTGAATAATC
4741	CAAAAGAGTG	GCTGCAAGTG	GACTTCCAGA	AGACAATGAA	AGTCACAGGA	GTAACCTACTC
4801	AGGGAGTAAA	ATCTCTGCTT	ACCAGCATGT	ATGTGAAGGA	GTTCTCATC	TCCAGCAGTC
4861	AAGATGGCCA	TCAGTGGACT	CTCTTTTTTC	AGAATGGCAA	AGTAAAGGTT	TTTCAGGGAA
4921	ATCAAGACTC	CTTACACCT	GTGGTGAATC	CTCTAGACCC	ACCGTTACTG	ACTCGCTACC
4981	TTCGAATTCA	CCCCCAGAGT	TGGGTGCACC	AGATTGCCCT	GAGGATGGAG	GTTCTGGGCT
5041	GCGAGGCACA	GGACCTCTAC				

* 加下劃線之核酸編碼信號肽。

[0177] 「B 域缺失之 FVIII」可具有美國專利第 6,316,226 號、第 6,346,513 號、第 7,041,635 號、第

5,789,203 號、第 6,060,447 號、第 5,595,886 號、第 6,228,620 號、第 5,972,885 號、第 6,048,720 號、第 5,543,502 號、第 5,610,278 號、第 5,171,844 號、第 5,112,950 號、第 4,868,112 號及第 6,458,563 號中揭露之全部或部分缺失。在一些實施例中，本發明之 B 域缺失之 FVIII 序列包含在美國專利第 6,316,226 號(亦在 US 6,346,513 中)之第 4 欄第 4 行至第 5 欄第 28 行及實例 1-5 中揭露之任一缺失。在另一實施例中，B 域缺失之因子 VIII 為 S743/Q1638 B 域缺失之因子 VIII(SQ BDD FVIII)(例如因子 VIII 具有自胺基酸 744 至胺基酸 1637 之缺失，例如因子 VIII 具有 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1-743 及胺基酸 1638-2332，亦即 SEQ ID NO: 6)。在一些實施例中，本發明之 B 域缺失之 FVIII 具有在美國專利第 5,789,203 號(以及 US 6,060,447、US 5,595,886 及 US 6,228,620)之第 2 欄第 26-51 行及實例 5-8 中揭露之缺失。在一些實施例中，B 域缺失之因子 VIII 具有以下文獻中描述之缺失：美國專利第 5,972,885 號之第 1 欄第 25 行至第 2 欄第 40 行；美國專利第 6,048,720 號之第 6 欄第 1-22 行及實例 1；美國專利第 5,543,502 號之第 2 欄第 17-46 行；美國專利第 5,171,844 號之第 4 欄第 22 行至第 5 欄第 36 行；美國專利第 5,112,950 號之第 2 欄第 55-68 行，圖 2 及實例 1；美國專利第 4,868,112 號之第 2 欄第 2 行至第 19 欄第 21 行及表 2；美國專利第 7,041,635 號之第 2 欄第 1 行至第 3 欄第 19 行、第 3 欄第 40 行至第 4 欄

第 67 行、第 7 欄第 43 行至第 8 欄第 26 行、及第 11 欄第 5 行至第 13 欄第 39 行；或美國專利第 6,458,563 號之第 4 欄第 25-53 行。在一些實施例中，B 域缺失之 FVIII 缺失大部分 B 域，但仍然含有在活體內將初級轉譯產物蛋白水解加工成兩個多肽鏈所必需的 B 域胺基端序列，如 WO 91/09122 中所揭露。在一些實施例中，B 域缺失之 FVIII 構築成缺失胺基酸 747-1638，亦即實際上完全缺失 B 域。Hoeben R.C.等人 *J. Biol. Chem.* 265 (13): 7318-7323 (1990)。B 域缺失之因子 VIII 亦可含有 FVIII 之胺基酸 771-1666 或胺基酸 868-1562 之缺失。Meulien P.等人 *Protein Eng.* 2(4): 301-6 (1988)。作為本發明之一部分之其他 B 域缺失包括：缺失胺基酸 982 至 1562 或 760 至 1639(Toole 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1986) 83, 5939-5942))、797 至 1562(Eaton 等人 *Biochemistry* (1986) 25:8343-8347))、741 至 1646(Kaufman(PCT 公開申請案第 WO 87/04187 號))、747-1560(Sarver 等人, *DNA* (1987) 6:553-564))、741 至 1648(Pasek(PCT 申請案第 88/00831 號))、或 816 至 1598 或 741 至 1648(Lagner(Behring Inst. Mitt. (1988) No 82:16-25, EP 295597))。在其他實施例中，BDD`FVIII 包括含有 B 域之保留一或多個 N-連接型糖基化位點之片段的 FVIII 多肽，該等位點例如對應於全長 FVIII 序列之胺基酸序列之殘基 757、784、828、900、963 或視情況 943。B 域片段之實例包括如 Miao, H.Z.等人, *Blood* 103(a): 3412-3419 (2004)、Kasuda, A 等人, *J.*

Thromb. Haemost. 6: 1352-1359 (2008)及 Pipe, S.W.等人, *J. Thromb. Haemost.* 9: 2235-2242 (2011)中揭露的 B 域之 226 個胺基酸或 163 個胺基酸(亦即保留 B 域之前 226 個胺基酸或 163 個胺基酸)。在其他實施例中, BDD FVIII 進一步包含在殘基 309 處之點突變(自 Phe 至 Ser)以改良 BDD FVIII 蛋白質之表現。參見 Miao, H.Z.等人, *Blood* 103(a): 3412-3419 (2004)。在其他實施例中, BDD FVIII 包括含有一部分 B 域, 但不含一或多個弗林蛋白酶裂解位點(例如 Arg1313 及 Arg1648)之 FVIII 多肽。參見 Pipe, S.W.等人, *J. Thromb. Haemost.* 9: 2235-2242 (2011)。可在任何 FVIII 序列中進行各前述缺失。

[0178] 在一些實施例中, FVIII 具有部分 B 域。在一些實施例中, 具有部分 B 域之 FVIII 蛋白質為 FVIII198(SEQ ID NO: 89)。FVIII198 為含有部分 B 域之單鏈 FVIII_{Fc} 分子-226N6。226 表示 FVIII B 域之 N 端 226 個胺基酸, 且 N6 表示 B 域中之六個 N-糖基化位點。

[0179] 在一個實施例中, 就在胺基酸 1648(在全長因子 VIII 或 SEQ ID NO: 4 中)、胺基酸 754(在 S743/Q1638 B 域缺失之因子 VIII 或 SEQ ID NO: 6 中)處之精胺酸或相應精胺酸殘基(在其他變異體中)之後裂解 FVIII, 藉此產生重鏈及輕鏈。在另一實施例中, FVIII 包含重鏈及輕鏈, 該等鏈藉由金屬離子介導之非共價鍵連接或締合。

[0180] 在其他實施例中, FVIII 為單鏈 FVIII, 其尚未就在胺基酸 1648(在全長 FVIII 或 SEQ ID NO: 4 中)、

胺基酸 754(在 S743/Q1638 B 域缺失之 FVIII 或 SEQ ID NO: 6 中)處之精胺酸或相應精胺酸殘基(在其他變異體中)之後被裂解。單鏈 FVIII 可包含一或多個胺基酸取代。在一個實施例中，胺基酸取代位於對應於全長成熟因子 VIII 多肽(SEQ ID NO: 4)之殘基 1648、殘基 1645 或兩者或 SQ BDD 因子 VIII(SEQ ID NO: 6)之殘基 754、殘基 751 或兩者的殘基處。胺基酸取代可為除精胺酸以外之任何胺基酸，例如異白胺酸、白胺酸、離胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、酥胺酸、色胺酸、纈胺酸、丙胺酸、天冬醯胺、天冬胺酸、半胱胺酸、麩胺酸、麩醯胺酸、甘胺酸、脯胺酸、硒半胱胺酸、絲胺酸、酪胺酸、組胺酸、鳥胺酸、吡咯離胺酸或牛磺酸。

[0181] FVIII 可進一步由凝血酶裂解且接著活化成 FVIIIa，充當活化型因子 IX(FIXa)之輔因子。並且活化型 FIX 接著連同活化型 FVIII 一起形成 X 酶複合物且將因子 X 轉化成活化型因子 X(FXa)。對於活化，FVIII 由凝血酶在胺基酸 372、740 及 1689(對應於 B 域缺失之 FVIII 序列中之胺基酸 372、740 及 795)處之三個精胺酸殘基之後裂解，該裂解產生具有 50 kDa A1、43 kDa A2 及 73 kDa A3-C1-C2 鏈之 FVIIIa。在一個實施例中，適用於本發明之 FVIII 蛋白質為非活性 FVIII。在另一實施例中，FVIII 蛋白質為活化型 FVIII。

[0182] 具有與 VWF 片段連接或締合之 FVIII 多肽之蛋白質可包含與 SEQ ID NO: 4 或 6 至少 50%、60%、

70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致之序列，其中該序列具有 FVIII 凝結活性，例如作為輔因子活化因子 IX 以將因子 X 轉化成活化型因子 X(FXa)。

[0183] 如本文所用之「雜交」或「嵌合」多肽及蛋白質包括視情況融合於第一 Ig 恆定區或其部分之第一多肽鏈(例如 VWF 片段)與視情況融合於第二 Ig 恆定區或其部分之第二多肽鏈(例如連接於 XTEN 序列之 FVIII 蛋白質)之組合，藉此形成雜二聚體。在一個實施例中，雜交物中之第一多肽與第二多肽經由蛋白質-蛋白質相互作用(諸如電荷-電荷或疏水性相互作用)彼此締合。在另一實施例中，雜交物中之第一多肽與第二多肽經由二硫鍵或其他共價鍵彼此締合。雜交物例如描述於 US 2004/101740 及 US 2006/074199 中。第二多肽可為第一多肽之相同複本或不相同多肽。在一個實施例中，第一多肽為 FVIII 蛋白質(X)-Fc 融合蛋白，且第二多肽為包含 Fc 區、基本上由 Fc 區組成或由 Fc 區組成之多肽，其中該第一多肽與該第二多肽彼此締合。在另一實施例中，第一多肽包含 VWF 片段-XTEN-Fc 融合蛋白，且第二多肽包含 FVIII-Fc 融合蛋白，從而使得雜交物為雜二聚體。在其他實施例中，第一多肽包含 VWF 片段-Fc 融合蛋白，且第二多肽包含 FVIII(X)-Fc 融合蛋白，從而使得雜交物為雜二聚體。在其他實施例中，第一多肽包含 VWF 片段-XTEN-Fc 融合蛋白，且第二多肽包含 FVIII(X)-Fc 融合蛋白。第一多肽與

第二多肽可經由第一 Fc 區與第二 Fc 區之間的共價鍵(例如二硫鍵)締合。第一多肽與第二多肽可進一步藉由 VWF 片段與 FVIII 蛋白質之間的結合而彼此締合。

[0184] 適用於本發明中之 FVIII 蛋白質可包括具有一或多個不影響 FVIII 凝血活性之其他 XTEN 序列之 FVIII。此等 XTEN 序列可融合於 FVIII 蛋白質之 C 末端或 N 末端或插入在 FVIII 蛋白質中之兩個胺基酸殘基之一或多者之間，同時該等插入不影響 FVIII 凝血活性或 FVIII 功能。在一個實施例中，插入改良 FVIII 蛋白質之藥物動力學性質(例如半衰期)。在另一實施例中，插入可為多個插入，例如多於兩個、三個、四個、五個、六個、七個、八個、九個或十個插入。插入位點之實例包括(但不限於)表 7、8、9、10、11、12、13、14、15 中所列之位點或其任何組合。

[0185] 連接於一或多個 XTEN 序列之 FVIII 蛋白質可表示為 FVIII(X)、FVIII(X1)、FVIII_(a→b)-X-FVIII_(c→d)，其中 FVIII_(a→b) 包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：FVIII 蛋白質之自胺基酸殘基「a」至胺基酸殘基「b」之第一部分；X 或 X1 包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：一或多個 XTEN 序列，FVIII_(c→d) 包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：FVIII 蛋白質之自胺基酸殘基「c」至胺基酸殘基「d」之第二部分；

a 為 FVIII 蛋白質之第一部分之 N 末端胺基酸殘基，

b 為 FVIII 蛋白質之第一部分之 C 末端胺基酸殘基但亦為

其中插入 XTEN 序列之插入位點之兩個胺基酸的 N 末端胺基酸殘基，

c 為 FVIII 蛋白質之第二部分之 N 末端胺基酸殘基但亦為其中插入 XTEN 序列之插入位點之兩個胺基酸的 C 末端胺基酸殘基，且

d 為 FVIII 蛋白質之 C 末端胺基酸殘基，且

其中 FVIII 蛋白質之第一部分與 FVIII 蛋白質之第二部分彼此不一致且共同具有足以使 FVIII 蛋白質具有 FVIII 凝血活性之長度。

[0186] 在一個實施例中，FVIII 蛋白質之第一部分及 FVIII 蛋白質之第二部分為 SEQ ID NO: 4[全長成熟 FVIII 序列]或 SEQ ID NO: 6[B 域缺失之 FVIII]之片段，例如分別為 N 端部分及 C 端部分。在某些實施例中，FVIII 蛋白質之第一部分包含 FVIII 蛋白質之 A1 域及 A2 域。FVIII 蛋白質之第二部分包含 A3 域、C1 域及視情況 C2 域。在其他實施例中，FVIII 蛋白質之第一部分包含 A1 域及 A2 域，且 FVIII 蛋白質之第二部分包含一部分 B 域、A3 域、C1 域及視情況 C2 域。在其他實施例中，FVIII 蛋白質之第一部分包含 FVIII 蛋白質之 A1 域、A2 域及一部分 B 域，且 FVIII 蛋白質之第二部分包含 A3 域、C1 域及視情況 C2 域。在其他實施例中，FVIII 蛋白質之第一部分包含 FVIII 蛋白質之 A1 域、A2 域、及第一部分 B 域。FVIII 蛋白質之第二部分包含第二部分 B 域、A3 域、C1 域及視情況 C2 域。在一些實施例中，兩個胺基酸(「b」

及「c」)可為表 7、8、9、10、11、12、13、14 及 15 中所示之胺基酸殘基插入位點中之任一或多者。舉例而言，「b」可為緊靠其中插入或連接一或多個 XTEN 序列之位點之上游的胺基酸殘基，且「c」可為緊靠其中插入或連接一或多個 XTEN 序列之位點之下游的胺基酸殘基。在一些實施例中，「a」為 FVIII 蛋白質之第一成熟胺基酸序列，且「d」為 FVIII 蛋白質之末位胺基酸序列。舉例而言，FVIII_(a→b)可為與 SEQ ID NO: 6[B 域缺失之 FVIII 胺基酸序列]或 SEQ ID NO: 4[全長 FVIII]之胺基酸 1 至 745 至少 70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致的胺基酸序列且 FVIII_(c→d)可分別為 SEQ ID NO: 6 之胺基酸 746 至 1438 或 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1641 至 2332。

[0187] 在一些態樣中，FVIII 蛋白質中之插入位點位於 FVIII 蛋白質之一或多個域(其為 N 末端、A1 域、A2 域、A3 域、B 域、C1 域、C2 域、C 末端或其兩種或兩種以上組合)中或位於 FVIII 蛋白質之兩個域(其為 A1 域及 a1 酸性區、及 a1 酸性區及 A2 域、A2 域及 a2 酸性區、a2 酸性區及 B 域、B 域及 A3 域、及 A3 域及 C1 域、C1 域及 C2 域或其任何組合)之間。舉例而言，其中可插入 XTEN 序列之插入位點係選自由以下組成之群：N 末端及 A1 域、N 末端及 A2 域、N 末端及 A3 域、N 末端及 B 域、N 末端及 C1 域、N 末端及 C2 域、N 末端及 C 末端、A1 域及 A2 域、A1 域及 A3 域、A1 域及 B 域、A1 域及

C1 域、A1 域及 C2 域、A1 域及 C 末端、A2 域及 A3 域、A2 域及 B 域、A2 域及 C1 域、A2 域及 C2 域、A2 域及 C 末端、A3 域及 B 域、A3 域及 C1 域、A3 域及 C2 域、A3 域及 C 末端、B 域及 C1 域、B 域及 C2 域、B 域及 C 末端、C1 域及 C2 域、C1 域及 C 末端、C2 域及 C 末端及其兩種或兩種以上組合。插入位點之非限制性實例列於表 7、8、9、10、11、12、13、14 及 15 中。

[0188] 其中緊靠 FVIII 蛋白質中之一或多個胺基酸(例如一或多個 XTEN 插入位點)之下游插入或在 C 末端或 N 末端連接 XTEN 序列的 FVIII 蛋白質在連接於 XTEN 序列或由 XTEN 序列插入之後保留 FVIII 活性。XTEN 序列可在 FVIII 蛋白質中插入一次或多於一次、兩次、三次、四次、五次或六次，使得插入不影響 FVIII 活性(亦即 FVIII 蛋白質仍然保留凝血性質)。

[0189] 適用於本發明中之 FVIII 蛋白質可藉由視情況選用之連接子在 FVIII 蛋白質之 N 末端或 C 末端連接於一或多個 XTEN 多肽或藉由一或多個視情況選用之連接子緊靠 FVIII 蛋白質中之一或多個胺基酸(例如一或多個 XTEN 插入位點)之下游插入。在一個實施例中，其中插入 XTEN 序列之兩個胺基酸殘基或 XTEN 序列所連接之胺基酸殘基對應於 SEQ ID NO: 4[全長成熟 FVIII]之兩個或一個選自由表 7、表 8、表 9 及表 10 中之殘基及其任何組合組成之群的胺基酸殘基。

[0190] 在其他實施例中，至少一個 XTEN 序列插入

本文揭露之任一或多個 XTEN 插入位點或其任何組合中。
在一個態樣中，至少一個 XTEN 序列插入表 7 中揭露之一
或多個胺基酸中揭露的一或多個 XTEN 插入位點中。

表7：示範性XTEN插入位點

編號	XTEN插入點*	插入殘基	FVIII BDD 下游序列	FVIII 域
1	0	(N末端)	ATR	A1
2	3	R	RYY	A1
3	17	M	QSD	A1
4	18	Q	SDL	A1
5	22	G	ELP	A1
6	24	L	PVD	A1
7	26	V	DAR	A1
8	28	A	RFP	A1
9	32	P	RVP	A1
10	38	F	PFN	A1
11	40	F	NTS	A1
12	41	N	TSV	A1
13	60	N	IAK	A1
14	61	I	AKP	A1
15	65	R	PPW	A1
16	81	Y	DTV	A1
17	111	G	AEY	A1
18	116	D	QTS	A1
19	119	S	QRE	A1
20	120	Q	REK	A1
21	128	V	FPG	A1
22	129	F	PGG	A1
23	130	P	GGG	A1
24	182	G	SLA	A1
25	185	A	KEK	A1
26	188	K	TQT	A1
27	205	G	KSW	A1
28	210	S	ETK	A1
29	211	E	TKN	A1
30	216	L	MQD	A1
31	220	R	DAA	A1
32	222	A	ASA	A1
33	223	A	SAR	A1
34	224	S	ARA	A1
35	230	K	MHT	A1
36	243	P	GLI	A1
37	244	G	LIG	A1

編號	XTEN插入點*	插入殘基	FVIII BDD 下游序列	FVIII 域
38	250	R	KSV	A1
39	318	D	GME	A1
40	333	P	QLR	A1
42	334	Q	LRM	A1
43	336	R	MKN	a1
44	339	N	NEE	a1
45	345	D	YDD	a1
46	357	V	VRF	a1
47	367	S	FIQ	a1
48	370	S	RPY	a1
49	375	A	KKH	A2
50	376	K	KHP	A2
51	378	H	PKT	A2
52	399	V	LAP	A2
53	403	D	DRS	A2
54	405	R	SYK	A2
55	409	S	QYL	A2
56	416	P	QRI	A2
57	434	E	TFK	A2
58	438	T	REA	A2
59	441	A	IQH	A2
60	442	I	QHE	A2
61	463	I	IFK	A2
62	487	Y	SRR	A2
63	490	R	LPK	A2
64	492	P	KGV	A2
65	493	K	GVK	A2
66	494	G	VKH	A2
67	500	D	FPI	A2
68	506	G	EIF	A2
69	518	E	DGP	A2
70	556	K	ESV	A2
71	565	Q	IMS	A2
72	566	I	MSD	A2
73	598	P	AGV	A2
74	599	A	GVQ	A2
75	603	L	EDP	A2
76	616	S	ING	A2
77	686	G	LWI	A2
78	713	K	NTG	A2
79	719	Y	EDS	A2
80	730	L	LSK	A2
81	733	K	NNA	A2
82	745	N	PPV**	B
83	1640	P	PVL	B
84	1652	R	TTL	B
85	1656	Q	SDQ	A3
86	1685	N	QSP	A3
87	1711	M	SSS	A3
88	1713	S	SPH	A3
89	1720	N	RAQ	A3
90	1724	S	GSV	A3
91	1725	G	SVP	A3

編號	XTEN插入點*	插入殘基	FVIII BDD 下游序列	FVIII 域
92	1726	S	VPQ	A3
93	1741	G	SFT	A3
94	1744	T	QPL	A3
95	1749	R	GEL	A3
96	1773	V	TFR	A3
97	1792	Y	EED	A3
98	1793	E	EDQ	A3
99	1796	Q	RQG	A3
100	1798	Q	GAE	A3
101	1799	G	AEP	A3
102	1802	P	RKN	A3
103	1803	R	KNF	A3
104	1807	V	KPN	A3
105	1808	K	PNE	A3
106	1827	K	DEF	A3
107	1844	E	KDV	A3
108	1861	N	TLN	A3
109	1863	L	NPA	A3
110	1896	E	RNC	A3
111	1900	R	APC	A3
112	1904	N	IQM	A3
113	1905	I	QME	A3
114	1910	P	TFK	A3
115	1920	A	ING	A3
116	1937	D	QRI	A3
117	1981	G	VFE	A3
118	2019	N	KCQ	A3
119	2020	K	CQT	C1
120	2044	G	QWA	C1
121	2068	F	SWI	C1
122	2073	V	DLL	C1
123	2090	R	QKF	C1
124	2092	K	FSS	C1
125	2093	F	SSL	C1
126	2111	K	WQT	C1
127	2115	Y	RGN	C1
128	2120	T	GTL	C1
129	2125	V	FFG	C1
130	2171	L	NSC	C1
131	2173	S	CSM	C2
132	2188	A	QIT	C2
133	2223	V	NNP	C2
134	2224	N	NPK	C2
135	2227	K	EWL	C2
136	2268	G	HQW	C2
137	2277	N	GKV	C2
138	2278	G	KVK	C2
139	2290	F	TPV	C2
140	2332	Y	FVIII之C末端	CT

*指示XTEN之基於成熟全長人類FVIII之胺基酸編號的插入點，其中插入可在所示胺基酸之N端或C端側上。

[0191] 在一些實施例中，一或多個 XTEN 序列插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 32、220、224、336、339、399、416、603、1656、1711、1725、1905 或 1910 或其任何組合之上游或下游的約六個胺基酸內。

表8. 示範性XTEN插入範圍

編號	XTEN 插入點	插入殘基	FVIII BDD 下游序列	FVIII 域	離插入殘基 之距離*
9	32	P	RVP	A1	-3, +6
31	220	R	DAA	A1	-
34	224	S	ARA	A1	+5
43	336	R	MKN	a1	-1, +6
44	339	N	NEE	a1	-4, +5
52	399	V	LAP	A2	-6, +3
56	416	P	QRI	A2	+6
75	603	L	EDP	A2	-6, +6
85	1656	Q	SDQ	B	-3, +6
87	1711	M	SSS	A3	-6, +1
91	1725	G	SVP	A3	+6
113	1905	I	QME	A3	+6
114	1910	P	TFK	A3	-5, +6

*離插入殘基之距離係指相距可進行插入所處之指定插入殘基(殘基「0」)之N末端(負數)或C末端(正數)的相對胺基酸數目。符號「-X」係指插入位點相距指定插入殘基之N末端側X個胺基酸。類似地，符號「+X」係指插入位點相距指定插入殘基之C末端側X個胺基酸。

舉例而言，「-1, +2」指示在表示為-1、0、+1 或+2 之胺基酸殘基之 N 末端或 C 末端進行插入。

[0192] 在其他實施例中，一或多個 XTEN 序列緊靠對應於全長成熟人類 FVIII 之一或多個選自由表 9 中之一或多個插入位點組成之群之胺基酸的下游插入。

表9. 示範性XTEN插入位點或範圍

編號	XTEN插入點範圍*	第一插入殘基	FVIII域
3	18-32	Q	A1
8	40	F	A1
18	211-224	E	A1
27	336-403	R	A1, A2
43	599	A	A2
47	745-1640	N	B
50	1656-1728	Q	B, a3, A3
57	1796-1804	R	A3
65	1900-1912	R	A3
81	2171-2332	L	C1, C2

* 指示相對於成熟人類FVIII之胺基酸編號加以編號之插入位點的範圍

[0193] 在其他實施例中，一或多個 XTEN 插入 FVIII 之 B 域中。在一個實例中，XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 740 與 1640 之間，其中胺基酸 740 與 1640 之間的 FVIII 序列視情況不存在。在另一實例中，XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 741 與 1690 之間，其中胺基酸 740 與 1690 之間的 FVIII 序列視情況不存在。在其他實例中，XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 741 與 1648 之間，其中胺基酸 741 與 1648 之間的 FVIII 序列視情況不存在。在其他實例中，XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 743 與 1638 之間，其中胺基酸 743 與 1638 之間的 FVIII 序列視情況不存在。在其他實例中，XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 745 與 1656 之間，其中胺基酸 745 與 1656 之間的 FVIII 序列視情況不存在。在一些實例中，XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 745 與 1657 之間，其中胺基酸 745 與 1657 之間的 FVIII 序列視情況不存在。在某

些實例中，XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 745 與 1667 之間，其中胺基酸 745 與 1667 之間的 FVIII 序列視情況不存在。在其他實例中，XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 745 與 1686 之間，其中胺基酸 745 與 1686 之間的 FVIII 序列視情況不存在。在一些其他實例中，XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 747 與 1642 之間，其中胺基酸 747 與 1642 之間的 FVIII 序列視情況不存在。在其他實例中，XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 751 與 1667 之間，其中胺基酸 751 與 1667 之間的 FVIII 序列視情況不存在。

[0194] 在一些實施例中，一或多個 XTEN 插入緊靠選自由表 10 中之胺基酸殘基組成之群的插入位點之胺基酸之下游的一或多個胺基酸中。

表10: FVIII XTEN插入位點及構築體名稱

構築體編號	域	上游殘基 編號*	下游殘基 編號*	上游序列	下游序列
F8X-1	A1	3	4	ATR	RYY
F8X-2	A1	18	19	YMQ	SDL
F8X-3	A1	22	23	DLG	ELP
F8X-4	A1	26	27	LPV	DAR
F8X-5	A1	40	41	FPF	NTS
F8X-6	A1	60	61	LFN	IAK
F8X-7	A1	116	117	YDD	QTS
F8X-8	A1	130	131	VFP	GGG
F8X-9	A1	188	189	KEK	TQT
F8X-10	A1	216	217	NSL	MQD
F8X-11	A1	230	231	WPK	MHT
F8X-12	A1	333	334	EEP	QLR
F8X-13	A2	375	376	SVA	KKH
F8X-14	A2	403	404	APD	DRS
F8X-15	A2	442	443	EAI	QHE
F8X-16	A2	490	491	RRL	PKG
F8X-17	A2	518	519	TVE	DGP
F8X-18	A2	599	600	NPA	GVQ
F8X-19	A2	713	714	CDK	NTG
F8X-20	BD	745	746	SQN	PPV
F8X-21	BD	745	746	SQN	PPV
F8X-22	BD**	745	746	SQN	PPV
F8X-23	A3	1720	1721	APT	KDE
F8X-24	A3	1796	1797	EDQ	RQG
F8X-25	A3	1802	1803	AEP	RKN
F8X-26	A3	1827	1828	PTK	DEF
F8X-27	A3	1861	1862	HTN	TLN
F8X-28	A3	1896	1897	NME	RNC
F8X-29	A3	1900	1901	NCR	APC
F8X-30	A3	1904	1905	PCN	IQM
F8X-31	A3	1937	1938	AQD	QRI
F8X-32	C1	2019	2020	YSN	KCQ
F8X-33	C1	2068	2069	EPF	SWI
F8X-34	C1	2111	2112	GKK	WQT
F8X-35	C1	2120	2121	NST	GTL
F8X-36	C2	2171	2172	CDL	NSC
F8X-37	C2	2188	2189	SDA	QIT
F8X-38	C2	2227	2228	NPK	EWL
F8X-39	C2	2277	2278	FQN	GKV
F8X-40	CT	2332	NA	DLY	NA
F8X-41	CT	2332	NA	DLY	NA
F8X-42	A1	3	4	ATR	ATR
pSD0001	A2	403	404		
pSD0002	A2	599	600		
pSD0021	N末端	0	1		
pSD0022	A1	32	33		

pSD0023	A1	65	66		
pSD0024	A1	81	82		
pSD0025	A1	119	120		
pSD0026	A1	211	212		
pSD0027	A1	220	221		
pSD0028	A1	224	225		
pSD0029	A1	336	337		
pSD0030	A1	339	340		
pSD0031	A2	378	379		
pSD0032	A2	399	400		
pSD0033	A2	409	410		
pSD0034	A2	416	417		
pSD0035	A2	487	488		
pSD0036	A2	494	495		
pSD0037	A2	500	501		
pSD0038	A2	603	604		
pSD0039	A3	1656	1657		
pSD0040	A3	1711	1712		
pSD0041	A3	1725	1726		
pSD0042	A3	1749	1750		
pSD0043	A3	1905	1906		
pSD0044	A3	1910	1911		
pDS0062	A3	1900	1901		

*指示成熟FVIII蛋白質之胺基酸編號

[0195] 在一個實施例中，一或多個 XTEN 插入位點位於 FVIII 蛋白質之一或多個表面暴露之可撓性環結構(例如容許環)內。舉例而言，至少一個 XTEN 序列可插入包含其中可插入至少一個 XTEN 多肽而不消除重組蛋白質之促凝血活性或重組蛋白質在活體內或在活體外於宿主細胞中表現之能力之至少兩個「容許環」的各 FVIII「A」域中。容許環為允許插入至少一個 XTEN 序列且具有高表面或溶劑暴露及高構形可撓性以及其他屬性之區域。A1 域包含容許環-1(A1-1)區及容許環-2(A1-2)區，A2 域包含容許環-1 (A2-1)區及容許環-2(A2-2)區，A3 域包含容許環-1(A3-1)區及容許環-2(A3-2)區。

[0196] 在一個態樣中，FVIII A1 域中之第一容許環

(A1-1)位於 β 股 1 與 β 股 2 之間，且 FVIII A2 域中之第二容許環(A1-2)位於 β 股 11 與 β 股 12 之間。FVIII A2 域中之第一容許環(A2-1)位於 β 股 22 與 β 股 23 之間，且 FVIII A2 域中之第二容許環(A2-2)位於 β 股 32 與 β 股 33 之間。FVIII A3 域中之第一容許環(A3-1)位於 β 股 38 與 β 股 39 之間，且 FVIII A3 中之第二容許環(A3-2)位於 β 股 45 與 β 股 46 之間。在某些態樣中，包含 A1-1 之表面暴露可撓性環結構對應於天然成熟人類 FVIII 中自 SEQ ID NO: 4 之約胺基酸 15 至約胺基酸 45，例如自 SEQ ID NO: 4 之約胺基酸 18 至約胺基酸 41 的區域。在其他態樣中，包含 A1-2 之表面暴露可撓性環結構對應於天然成熟人類 FVIII 中自 SEQ ID NO: 4 之約胺基酸 201 至約胺基酸 232，例如自 SEQ ID NO: 4 之約胺基酸 218 至約胺基酸 229 的區域。在其他態樣中，包含 A2-1 之表面暴露可撓性環結構對應於天然成熟人類 FVIII 中自 SEQ ID NO: 4 之約胺基酸 395 至約胺基酸 421，例如自 SEQ ID NO: 4 之約胺基酸 397 至約胺基酸 418 的區域。在其他實施例中，包含 A2-2 之表面暴露可撓性環結構對應於天然成熟人類 FVIII 中自 SEQ ID NO: 4 之約胺基酸 577 至約胺基酸 635，例如自 SEQ ID NO: 4 之約胺基酸 595 至約胺基酸 607 的區域。在某些態樣中，包含 A3-1 之表面暴露可撓性環結構對應於天然成熟人類 FVIII 中自 SEQ ID NO: 4 之約胺基酸 1705 至約胺基酸 1732，例如自 SEQ ID NO: 4 之約胺基酸 1711 至約胺基酸 1725 的區域。在其他態樣

中，包含 A3-2 之表面暴露可撓性環結構對應於天然成熟人類 FVIII 中自 SEQ ID NO: 4 之約胺基酸 1884 至約胺基酸 1917，例如自 SEQ ID NO: 4 之約胺基酸 1899 至約胺基酸 1911 的區域。

[0197] 在另一實施例中，其中插入至少一個 XTEN 序列之一或多個胺基酸位於 a3 域，例如對應於全長成熟 FVIII 多肽之胺基酸 1649 至 1689 內。在一特定實施例中，XTEN 序列插入在 SEQ ID NO: 4(全長成熟 FVIII)之胺基酸 1656 與 1657 之間。在一特定實施例中，包含緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1656 之下游插入之 XTEN 序列的 FVIII 蛋白質進一步包含自對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 745 至胺基酸 1656 的缺失。

[0198] 在一些實施例中，用於一或多個 XTEN 插入之一或多個插入位點緊靠一或多個選自由以下組成之群之胺基酸的下游：

(1)胺基酸 3，	(2)胺基酸 18，	(3)胺基酸 22，
(4)胺基酸 26，	(5)胺基酸 32，	(6)胺基酸 40，
(7)胺基酸 60，	(8)胺基酸 65，	(9)胺基酸 81，
(10)胺基酸 116，	(11)胺基酸 119，	(12)胺基酸 130，
(13)胺基酸 188，	(14)胺基酸 211，	(15)胺基酸 216，
(16)胺基酸 220，	(17)胺基酸 224，	(18)胺基酸 230，
(19)胺基酸 333，	(20)胺基酸 336，	(21)胺基酸 339，
(22)胺基酸 375，	(23)胺基酸 399，	(24)胺基酸 403，
(25)胺基酸 409，	(26)胺基酸 416，	(26)胺基酸 442，

(28)胺基酸 487，	(29)胺基酸 490，	(30)胺基酸 494，
(31)胺基酸 500，	(32)胺基酸 518，	(33)胺基酸 599，
(34)胺基酸 603，	(35)胺基酸 713，	(36)胺基酸 745，
(37)胺基酸 1656，	(38)胺基酸 1711，	(39)胺基酸 1720，
(40)胺基酸 1725，	(41)胺基酸 1749，	(42)胺基酸 1796，
(43)胺基酸 1802，	(44)胺基酸 1827，	(45)胺基酸 1861，
(46)胺基酸 1896，	(47)胺基酸 1900，	(48)胺基酸 1904，
(49)胺基酸 1905，	(50)胺基酸 1910，	(51)胺基酸 1937，
(52)胺基酸 2019，	(53)胺基酸 2068，	(54)胺基酸 2111，
(55)胺基酸 2120，	(56)胺基酸 2171，	(57)胺基酸 2188，
(58)胺基酸 2227，	(59)胺基酸 2277，及	
(60)其兩種或兩種以上組合。		

[0199] 在一個實施例中，適用於本發明之 FVIII 蛋白質包含兩個 XTEN 序列，第一 XTEN 序列插入第一 XTEN 插入位點中且第二 XTEN 插入第二 XTEN 插入位點中。第一 XTEN 插入位點及第二 XTEN 插入位點之非限制性實例列於表 11 中。

表11. 兩個XTEN之示範性插入位點

插入1		插入2	
插入位點	域	插入位點	域
745	B	2332	CT
26	A1	403	A2
40	A1	403	A2
18	A1	403	A2
26	A1	599	A2
40	A1	599	A2
18	A1	599	A2
1720	A3	1900	A3
1725	A3	1900	A3
1711	A3	1905	A3
1720	A3	1905	A3
1725	A3	1905	A3
1656	A3	26	A1
1656	A3	18	A1
1656	A3	40	A1
1656	A3	399	A2
1656	A3	403	A2
1656	A3	1725	A3
1656	A3	1720	A3
1900	A3	18	A1

插入1		插入2	
插入位點	域	插入位點	域
1900	A3	26	A1
1900	A3	40	A1
1905	A3	18	A1
1905	A3	40	A1
1905	A3	26	A1
1910	A3	26	A1
18	A1	399	A2
26	A1	399	A2
40	A1	399	A2
18	A1	403	A2
1656	A3	1900	A3
1656	A3	1905	A3
1711	A3	40	A1
1711	A3	26	A1
1720	A3	26	A1
1720	A3	40	A1
1720	A3	18	A1
1725	A3	26	A1
1725	A3	40	A1
1725	A3	18	A1
1720	A3	403	A2
1720	A3	399	A2
1711	A3	403	A2
1720	A3	403	A2
1725	A3	403	A2
1725	A3	399	A2
1711	A3	403	A2
1900	A3	399	A2
1900	A3	403	A2
1905	A3	403	A2
1905	A3	399	A2
1910	A3	403	A2

[0200] 插入或連接於 FVIII 蛋白質之兩個 XTEN 可相同或不同。在一些實施例中，適用於本發明之 FVIII 蛋白質包含兩個插入 FVIII 蛋白質中之 XTEN 序列，第一 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 745 之下游插入，且第二 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 2332(C 末端)之下游插入。在其他實施例中，第一 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 18、26、

40、1656 或 1720 之下游插入，且第二 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 403 之下游插入。在其他實施例中，第一 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 18、26 或 40 之下游插入，且第二 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 599 之下游插入。在其他實施例中，第一 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1656 之下游插入，且第二 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 18、26、40、399、403、1725、1720、1900、1905 或 2332 之下游插入。在某些實施例中，第一 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1900 之下游插入，且第二 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 18、26 或 40 之下游插入。在一些實施例中，第一 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 18、26 或 40 之下游插入，且第二 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 399 之下游插入。在其他實施例中，第一 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1720 之下游插入，且第二 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 18、26 或 40 之下游插入。在其他實施例中，第一 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1720 之下游插入，且第二 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 18 之下游插入。在一特定實施例中，FVIII 蛋白質包含兩個 XTEN 序列，第一 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 745 之下游插入且第二 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 2332 之下

游插入，其中該 FVIII 蛋白質進一步具有自對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 745 至對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1685 的缺失、在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1680 處具有突變或取代(例如 Y1680F)、在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1648 處具有突變或取代(例如 R1648A)、或在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1648(例如 R1648A)及對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1680(例如 Y1680F)處具有至少兩個突變或取代。在一特定實施例中，FVIII 蛋白質包含兩個 XTEN 序列，第一 XTEN 緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1656 之下游插入且第二 XTEN 序列緊靠 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 2332 之下游插入，其中該 FVIII 蛋白質進一步具有自對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 745 至胺基酸 1656 的缺失。

[0201] 在某些實施例中，FVIII 蛋白質包含三個 XTEN 序列，第一 XTEN 序列插入第一 XTEN 插入位點中，第二 XTEN 序列插入第二 XTEN 序列中，且第三 XTEN 序列插入第三 XTEN 插入位點中。第一、第二或第三 XTEN 序列可相同或不同。第一、第二及第三插入位點可選自本文揭露之任一插入位點之群。在一些實施例中，包含三個 XTEN 序列之 FVIII 蛋白質可進一步包含突變或取代，例如對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1648，例如 R1648A。舉例而言，第一、第二及第三 XTEN 插入位點之非限制性實例列於表 12 中。

表12. 三個XTEN之示範性插入位點

插入1		插入2		插入3	
插入位點	域	插入位點	域	插入位點	域
26	A1	403	A2	1656	A3
26	A1	403	A2	1720	A3
26	A1	403	A2	1900	A3
26	A1	1656	A3	1720	A3
26	A1	1656	A3	1900	A3
26	A1	1720	A3	1900	A3
403	A2	1656	A3	1720	A3
403	A2	1656	A3	1900	A3
403	A2	1720	A3	1900	A3
1656	A3	1720	A3	1900	A3
745	B	1900		2332	
18	A1	745	B	2332	CT
26	A1	745	B	2332	CT
40	A1	745	B	2332	CT
18	A1	745	B	2332	CT
40	A1	745	B	2332	CT
403	A2	745	B	2332	CT
399	A2	745	B	2332	CT
1725	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	745	B	2332	CT
1711	A3	745	B	2332	CT
1900	A3	745	B	2332	CT
1905	A3	745	B	2332	CT
1910	A3	745	B	2332	CT

[0202] 在一些實施例中，FVIII 蛋白質包含三個 XTEN 序列，第一 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 26 之下游插入，第二 XTEN 序列插入對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 403 之下游，且第三 XTEN 序列插入對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1656、1720 或 1900 之下游。在其他實施例中，第一 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 26 之下游插入，第二 XTEN 序列插入對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1656 之下游，且第三 XTEN 序列插入對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1720 或 1900 之下游。在其他實施例中，第一 XTEN 序列緊靠對

應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 26 之下游插入，第二 XTEN 序列插入對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1720 之下游，且第三 XTEN 序列插入對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1900 之下游。在其他實施例中，第一 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 403 之下游插入，第二 XTEN 序列插入對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1656 之下游，且第三 XTEN 序列插入對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1720 或 1900 之下游。在其他實施例中，第一 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 403 或 1656 之下游插入，第二 XTEN 序列插入對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1720 之下游，且第三 XTEN 序列插入對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1900 之下游。在其他實施例中，第一 XTEN 序列緊靠對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 18、26、40、399、403、1711、1720、1725、1900、1905 或 1910 之下游插入，第二 XTEN 序列插入對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 745 之下游，且第三 XTEN 序列插入對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 2332 之下游。

[0203] 在其他實施例中，本發明中之 FVIII 蛋白質包含四個 XTEN 序列，第一 XTEN 序列插入第一插入位點中，第二 XTEN 序列插入第二插入位點中，第三 XTEN 序列插入第三插入位點中，且第四 XTEN 序列插入第四插入位點中。第一、第二、第三及第四 XTEN 序列可相同、不同或為其組合。在一些實施例中，包含四個 XTEN 序列之 FVIII 蛋白質可進一步包含突變或取代，例如對應於 SEQ

ID NO: 4 之胺基酸 1648，例如 R1648A。第一、第二、第三及第四 XTEN 插入位點之非限制性實例列於表 13 中。

表13. 四個XTEN之示範性插入位點

插入1		插入2		插入3		插入4	
插入位點	域	插入位點	域	插入位點	域	插入位點	域
26	A1	403	A2	1656	a3	1720	A3
26	A1	403	A2	1656	a3	1900	A3
26	A1	403	A2	1720	A3	1900	A3
26	A1	1656	a3	1720	A3	1900	A3
403	A2	1656	a3	1720	A3	1900	A3
0040	A1	0403	A2	745	B	2332	CT
0040	A1	0403	A2	745	B	2332	CT
0018	A1	0409	A2	745	B	2332	CT
0040	A1	0409	A2	745	B	2332	CT
0040	A1	0409	A2	745	B	2332	CT
0018	A1	0409	A2	745	B	2332	CT
0040	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1900	A3	745	B	2332	CT

0018	A1	1900	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1900	A3	745	B	2332	CT
0040	A1	1900	A3	745	B	2332	CT
0040	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0040	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0040	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0040	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1720	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1720	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1720	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1720	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1720	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	1900	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	1905	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	1910	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1656	a3	1720	A3	2332	CT
0403	A2	1656	a3	1900	A3	2332	CT
0403	A2	1720	A3	1900	A3	2332	CT
1656	a3	1720	A3	1900	A3	2332	CT
0018	A1	0403	A2	1656	a3	2332	CT
0018	A1	0403	A2	1720	A3	2332	CT
0018	A1	0403	A2	1900	A3	2332	CT

0018	A1	1656	a3	1720	A3	2332	CT
0018	A1	1656	a3	1900	A3	2332	CT
0018	A1	1720	A3	1900	A3	2332	CT
0018	A1	0403	A2	0745	B	2332	CT
0018	A1	0745	B	1720	A3	2332	CT
0018	A1	0745	B	1900	A3	2332	CT
0403	A2	0745	B	1720	A3	2332	CT
0403	A2	0745	B	1900	A3	2332	CT
0745	B	1720	A3	1900	A3	2332	CT
0188	A1	1900	A3	0745	B	2332	CT
0599		1900	A3	0745	B	2332	CT
2068		1900	A3	0745	B	2332	CT
2171		1900	A3	0745	B	2332	CT
2227		1900	A3	0745	B	2332	CT
2277		1900	A3	0745	B	2332	CT

[0204] 在一些實施例中，FVIII 蛋白質包含五個 XTEN 序列，第一 XTEN 序列插入第一插入位點中，第二 XTEN 序列插入第二插入位點中，第三 XTEN 序列插入第三 XTEN 插入位點中，第四 XTEN 序列插入第四 XTEN 插入位點中，且第五 XTEN 序列插入第五 XTEN 插入位點中。第一、第二、第三、第四或第五 XTEN 序列可相同、不同或為其組合。第一、第二、第三、第四及第五插入位點之非限制性實例列於表 14 中。

表14. 五個XTEN之示範性插入位點

XTEN 插入1	XTEN 插入2	XTEN 插入3	XTEN 插入4	XTEN 插入5
0403	1656	1720	1900	2332
0018	0403	1656	1720	2332
0018	0403	1656	1900	2332
0018	0403	1720	1900	2332
0018	1656	1720	1900	2332
0018	0403	0745	1720	2332
0018	0403	0745	1900	2332
0018	0745	1720	1900	2332
0403	0745	1720	1900	2332

[0205] 在某些實施例中，FVIII 蛋白質包含六個 XTEN 序列，第一 XTEN 序列插入第一 XTEN 插入位點中，第二 XTEN 序列插入第二 XTEN 插入位點中，第三 XTEN 序列插入第三 XTEN 插入位點中，第四 XTEN 序列插入第四 XTEN 插入位點中，第五 XTEN 序列插入第五 XTEN 插入位點中，且第六 XTEN 序列插入第六 XTEN 插入位點中。第一、第二、第三、第四、第五或第六 XTEN 序列可相同、不同或為其組合。六個 XTEN 插入位點之實例包括(但不限於)表 15 中所列之插入位點。

表15. 六個XTEN之示範性XTEN插入位點

XTEN 插入1	XTEN 插入2	XTEN 插入3	XTEN 插入4	XTEN 插入5	XTEN 插入5
0018	0403	1656	1720	1900	2332
0018	0403	0745	1720	1900	2332

[0206] 在一特定實例中，第一 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 26 與 27 之間，且第二 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4(全長成熟 FVIII)之胺基酸 1720 與 1721 之間。在另一實例中，第一 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 403 與 404 之間，且第二 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1720 與 1721 之間。在一些實例中，第一 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1656 與 1657 之間，且第二 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1720 與 1721 之間。在其他實例中，第一 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺

基酸 26 與 27 之間，第二 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1656 與 1657 之間，且第三 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1720 與 1721 之間。在其他實施例中，第一 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 403 與 404 之間，第二 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1656 與 1657 之間，且第三 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1720 與 1721 之間。在其他實施例中，第一 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 403 與 404 之間，第二 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1656 與 1657 之間，且第三 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1720 與 1721 之間。在某些實施例中，第一 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 26 與 27 之間，第二 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1720 與 1721 之間，且第三 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1900 與 1901 之間。在一些實施例中，第一 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 26 與 27 之間，第二 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1656 與 1657 之間，第三 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之胺基酸 1720 與 1721 之間，且第四 XTEN 插入在對應於 SEQ ID NO: 4 之 1900 與 1901 之間。

[0207] 在一特定實施例中，XTEN 序列插入在全長因子 VIII 之胺基酸 745 與 746 之間或插入 B 域缺失之因子 VIII 之相應插入位點。

[0208] 在一些實施例中，本發明之嵌合蛋白包含兩個多肽序列，第一多肽序列包含與選自 FVIII-161(SEQ ID NO: 101)、FVIII-169(SEQ ID NO: 103)、FVIII-170(SEQ ID NO: 102)、FVIII-173(SEQ ID NO: 104)、FVIII-195(SEQ ID NO: 105)、FVIII-196(SEQ ID NO: 106)、FVIII-199(SEQ ID NO: 107)、FVIII-201(SEQ ID NO: 108)、FVIII-203(SEQ ID NO: 109)、FVIII-204(SEQ ID NO: 110)、FVIII-205(SEQ ID NO: 111)、FVIII-266(SEQ ID NO: 112)、FVIII-267(SEQ ID NO: 113)、FVIII-268(SEQ ID NO: 114)、FVIII-269(SEQ ID NO: 115)、FVIII-271(SEQ ID NO: 116)或 FVIII-272(SEQ ID NO: 117)之序列至少約 80%、90%、95%或 100%一致之胺基酸序列，且第二多肽序列包含與選自 VWF031(SEQ ID NO: 118)、VWF034(SEQ ID NO: 119)或 VWF-036(SEQ ID NO: 120)之序列至少約 80%、90%、95%或 100%一致之胺基酸序列。

D)Ig 恆定區或其部分

[0209] 本發明中連接於 XTEN 序列之 VWF 片段或 FVIII 蛋白質可進一步包含 Ig 恆定區或其部分。Ig 恆定區或其部分可改良與 XTEN 序列組合之 VWF 片段或 FVIII 蛋白質之藥物動力學或藥效學性質。在某些實施例中，Ig 恆定區或其部分延長融合於 Ig 恆定區或其部分之分子的半衰期。

[0210] Ig 恆定區包含表示為 CH(恆定重)域(CH1、

CH2 等)之域。視同型(亦即 IgG、IgM、IgA、IgD 或 IgE)而定，恆定區可包含三個或四個 CH 域。一些同型(例如 IgG)恆定區亦含有鉸鏈區。參見 Janeway 等人 2001, *Immunobiology*, Garland Publishing, N.Y., N.Y.。

[0211] 用於產生本發明之嵌合蛋白之 Ig 恆定區或其部分可自許多不同來源獲得。在一些實施例中，Ig 恆定區或其部分源於人類 Ig。然而，應瞭解 Ig 恆定區或其部分可源於另一哺乳動物物種之 Ig，物種包括例如齧齒動物(例如小鼠、大鼠、兔、天竺鼠(guinea pig))或非人類靈長類動物(例如黑猩猩、獼猴)物種。此外，Ig 恆定區或其部分可源於任何 Ig 類別(包括 IgM、IgG、IgD、IgA 及 IgE)及任何 Ig 同型(包括 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4)。在一個實施例中，使用人類同型 IgG1。

[0212] 多種 Ig 恆定區基因序列(例如人類恆定區基因序列)可以公開可得之寄存物形式獲得。可選擇具有特定效應功能(或缺乏特定效應功能)或具有用以降低免疫原性之特定修飾之恆定區域序列。許多抗體及抗體編碼基因序列已經公開且可使用業內公認之技術自此等序列獲得適合 Ig 恆定區序列(例如鉸鏈、CH2 及/或 CH3 序列或其部分)。使用任何上述方法獲得之遺傳物質可接著加以改變或合成以獲得本發明之多肽。應進一步瞭解本發明之範疇涵蓋恆定區 DNA 序列之對偶基因、變異體及突變。

[0213] Ig 恆定區或其部分之序列可例如使用選用於擴增相關域之聚合酶鏈反應及引子來選殖。為自抗體選殖 Ig

恆定區或其部分之序列，可自融合瘤、脾或淋巴細胞分離 mRNA，逆轉錄成 DNA，且藉由 PCR 擴增抗體基因。PCR 擴增方法詳述於美國專利第 4,683,195 號；第 4,683,202 號；第 4,800,159 號；第 4,965,188 號中；及例如「PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications」Innis 等人編，Academic Press, San Diego, CA (1990)；Ho 等人 1989. *Gene* 77:51；Horton 等人 1993. *Methods Enzymol.* 217:270)中。PCR 可藉由共同恆定區引子或藉由基於公開之重鏈及輕鏈 DNA 及胺基酸序列之更特異性引子來啓始。如上所論述，PCR 亦可用於分離編碼抗體輕鏈及重鏈之 DNA 純系。在此情況下，可藉由共同引子或較大同源性探針(諸如小鼠恆定區探針)來篩檢文庫。適於擴增抗體基因之眾多引子組在此項技術中為已知的(例如基於經純化抗體之 N 端序列之 5'引子(Benhar 及 Pastan. 1994. *Protein Engineering* 7:1509)；cDNA 末端之快速擴增(Ruberti, F.等人 1994. *J. Immunol. Methods* 173:33)；抗體前導序列(Larrick 等人 1989 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160:1250)。抗體序列之選殖進一步描述於 Newman 等人，1995 年 1 月 25 日申請之美國專利第 5,658,570 號中，該專利以引用的方式併入本文中。

[0214] 本文中使用之 Ig 恆定區可包括所有域及鉸鏈區或其部分。在一個實施例中，Ig 恆定區或其部分包含 CH2 域、CH3 域及鉸鏈區，亦即 Fc 區或 FcRn 結合搭配物。

[0215] 如本文所用，術語「Fc 區」定義為多肽中對應於天然 Ig 之 Fc 區的部分，亦即如藉由其兩個重鏈之各別 Fc 域之二聚締合所形成。天然 Fc 區與另一 Fc 區形成均二聚體。相反，如本文所用之術語「遺傳融合 Fc 區」或「單鏈 Fc 區」(scFc 區)係指合成二聚 Fc 區，其包含在單一多肽鏈內遺傳連接之 Fc 域(亦即在單一連續遺傳序列中編碼)。

[0216] 在一個實施例中，「Fc 區」係指單一 Ig 重鏈之一部分，其在恰好在木瓜蛋白酶(papain)裂解位點(亦即 IgG 中之殘基 216，將重鏈恆定區之第一殘基看作 114)上游之鉸鏈區中開始且在抗體之 C 末端結束。因此，完整 Fc 域至少包含鉸鏈域、CH2 域及 CH3 域。

[0217] 視 Ig 同型而定，Ig 恆定區之 Fc 區可包括 CH2、CH3 及 CH4 域以及鉸鏈區。包含 Ig 之 Fc 區之嵌合蛋白對嵌合蛋白賦予若干合乎需要之性質，包括增強之穩定性、增加之血清半衰期(參見 Capon 等人，1989, *Nature* 337:525)以及結合 Fc 受體，諸如新生兒 Fc 受體(FcRn)(美國專利第 6,086,875 號、第 6,485,726 號、第 6,030,613 號；WO 03/077834；US2003-0235536A1)，該等文獻及專利以全文引用的方式併入本文中。

[0218] Ig 恆定區或其部分可為 FcRn 結合搭配物。FcRn 在成人上皮組織中具有活性且表現在腸腔、肺氣道、鼻表面、陰道表面、結腸及直腸表面中(美國專利第 6,485,726 號)。FcRn 結合搭配物為 Ig 中結合 FcRn 之部

分。

[0219] 已自包括人類在內之若干哺乳動物物種分離出 FcRn 受體。已知人類 FcRn、猴 FcRn、大鼠 FcRn 及小鼠 FcRn 之序列 (Story 等人 1994, J. Exp. Med. 180:2377)。FcRn 受體在相對較低之 pH 值下結合 IgG(但不結合其他 Ig 類別，諸如 IgA、IgM、IgD 及 IgE)，以內腔至漿膜方向跨細胞主動轉運 IgG，且接著在間隙液中存在之相對較高 pH 值下釋放 IgG。其表現在成人上皮組織 (美國專利第 6,485,726 號、第 6,030,613 號、第 6,086,875 號；WO 03/077834；US2003-0235536A1)，包括肺及腸上皮 (Israel 等人 1997, Immunology 92:69)、腎近端小管上皮 (Kobayashi 等人 2002, Am. J. Physiol. Renal Physiol. 282:F358) 以及鼻上皮；陰道表面；及膽系表面中。

[0220] 適用於本發明中之 FcRn 結合搭配物涵蓋可由 FcRn 受體特異性結合之分子，包括完整 IgG、IgG 之 Fc 片段、及包括 FcRn 受體之完整結合區之其他片段。已基於 X 射線結晶學描述了 IgG 之 Fc 部分中結合 FcRn 受體的區域 (Burmeister 等人 1994, Nature 372:379)。Fc 與 FcRn 之主要接觸區域接近 CH2 域與 CH3 域之接合點。Fc-FcRn 接觸皆在單一 Ig 重鏈內。FcRn 結合搭配物包括完整 IgG、IgG 之 Fc 片段及 IgG 中包括 FcRn 之完整結合區域的其他片段。主要接觸位點包括 CH2 域之胺基酸殘基 248、250-257、272、285、288、290-291、308-311 及 314 以及 CH3 域之胺基酸殘基 385-387、428 及 433-436。

對 Ig 或 Ig 片段之胺基酸編號的提及皆基於 Kabat 等人 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md。

[0221] 結合於 FcRn 之 Fc 區或 FcRn 結合搭配物可藉由 FcRn 有效地跨越上皮障壁穿梭，由此提供一種全身性投與所要治療分子之非侵襲性手段。另外，包含 Fc 區或 FcRn 結合搭配物之融合蛋白由表現 FcRn 之細胞胞飲。但並未顯著降解，而使此等融合蛋白再次再循環至循環中，由此增加此等蛋白質之活體內半衰期。在某些實施例中，Ig 恆定區之部分為 Fc 區或 FcRn 結合搭配物，其通常經由二硫鍵及其他非特異性相互作用與另一 Fc 區或另一 FcRn 結合搭配物締合以形成二聚體及更高級多聚體。

[0222] 兩個 FcRn 受體可結合單一 Fc 分子。結晶學資料表明各 FcRn 分子結合 Fc 均二聚體之單一多肽。在一個實施例中，將 FcRn 結合搭配物(例如 IgG 之 Fc 片段)連接於生物活性分子會提供一種經口、經頰、舌下、經直腸、經陰道、以經鼻或經由肺途徑投與之氣霧劑形式、或經由眼途徑傳遞該生物活性分子之手段。在另一實施例中，可侵襲性地投與嵌合蛋白，例如皮下、靜脈內。

[0223] FcRn 結合搭配物區為可由 FcRn 受體特異性結合，隨後由 FcRn 受體主動轉運 Fc 區之分子或其部分。特異性結合係指兩個分子在生理條件下形成相對穩定之複合物。特異性結合之特徵在於親和力高且能力較低至中等，如與通常親和力低且能力中等至較高之非特異性結合相區

分。通常，當親和力常數 K_A 高於 10^6 M^{-1} 或高於 10^8 M^{-1} 時，結合被視為特異性結合。必要時，可藉由改變結合條件來減少非特異性結合而不實質上影響特異性結合。諸如分子濃度、溶液之離子強度、溫度、允許結合時間、阻斷劑(例如血清白蛋白、乳酪蛋白)濃度等之適當結合條件可由熟練技術人員使用常規技術進行最佳化。

[0224] 在某些實施例中，本發明之嵌合蛋白包含一或多個截短型 Fc 區，儘管如此，該等 Fc 區仍然足以對 Fc 區賦予 Fc 受體(FcR)結合性質。舉例而言，Fc 區中結合 FcRn 之部分(亦即 FcRn 結合部分)包含 IgG1 之約胺基酸 282-438(EU 編號)，(其中主要接觸位點為 CH2 域之胺基酸 248、250-257、272、285、288、290-291、308-311 及 314 以及 CH3 域之胺基酸殘基 385-387、428 及 433-436。因此，本發明之 Fc 區可包含 FcRn 結合部分或由 FcRn 結合部分組成。FcRn 結合部分可源於包括 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4 在內之任何同型之重鏈。在一個實施例中，使用來自人類同型 IgG1 之抗體之 FcRn 結合部分。在另一實施例中，使用來自人類同型 IgG4 之抗體之 FcRn 結合部分。

[0225] 在另一實施例中，「Fc 區」包括 Fc 域或源於 Fc 域之胺基酸序列。在某些實施例中，Fc 區包含以下至少一者：鉸鏈(例如上、中及/或下鉸鏈區)域(抗體 Fc 區之約胺基酸 216-230，根據 EU 編號)、CH2 域(抗體 Fc 區之約胺基酸 231-340，根據 EU 編號)、CH3 域(抗體 Fc 區之

約胺基酸 341-438，根據 EU 編號)、CH₄ 域、或其變異體、部分或片段。在其他實施例中，Fc 區包含完整 Fc 域(亦即鉸鏈域、CH₂ 域及 CH₃ 域)。在一些實施例中，Fc 區包含以下、基本上由以下組成、或由以下組成：融合於 CH₃ 域(或其部分)之鉸鏈域(或其部分)、融合於 CH₂ 域(或其部分)之鉸鏈域(或其部分)、融合於 CH₃ 域(或其部分)之 CH₂ 域(或其部分)、融合於鉸鏈域(或其部分)與 CH₃ 域(或其部分)兩者之 CH₂ 域(或其部分)。在其他實施例中，Fc 區缺乏 CH₂ 域之至少一部分(例如 CH₂ 域之全部或一部分)。在一特定實施例中，Fc 區包含以下或由以下組成：對應於 EU 編號 221 至 447 之胺基酸。

[0226] 在本文中表示為 F、F1 或 F2 之 Fc 區可自許多不同來源獲得。在一個實施例中，多肽之 Fc 區源於人類 Ig。然而，應瞭解 Fc 區可源於另一哺乳動物物種之 Ig，物種包括例如齧齒動物(例如小鼠、大鼠、兔或天竺鼠)或非人類靈長類動物(例如黑猩猩、獼猴)物種。此外，Fc 域或其部分之多肽可源於任何 Ig 類別(包括 IgM、IgG、IgD、IgA 及 IgE)及任何 Ig 同型(包括 IgG1、IgG2、IgG3 及 IgG4)。在另一實施例中，使用人類同型 IgG1。

[0227] 在某些實施例中，Fc 變異體賦予由包含該野生型 Fc 域之 Fc 區所賦予之至少一種效應功能的變化(例如 Fc 區結合 Fc 受體(例如 FcγRI、FcγRII 或 FcγRIII)或補體蛋白質(例如 C1q)、或觸發抗體依賴性細胞毒性(ADCC)、吞噬作用或補體依賴性細胞毒性(CDCC)之能力

提高或降低)。在其他實施例中，Fc 變異體提供工程改造之半胱胺酸殘基。

[0228] 本發明之 Fc 區可採用業內公認之已知會賦予效應功能及/或 FcR 或 FcRn 結合之變化(例如增強或降低)之 Fc 變異體。詳言之，本發明之結合分子可包括例如在以下中揭露之一或多個胺基酸位置處之變化(例如取代)：國際 PCT 公開案 WO88/07089A1、WO96/14339A1、WO98/05787A1、WO98/23289A1、WO99/51642A1、WO99/58572A1、WO00/09560A2、WO00/32767A1、WO00/42072A2、WO02/44215A2、WO02/060919A2、WO03/074569A2、WO04/016750A2、WO04/029207A2、WO04/035752A2、WO04/063351A2、WO04/074455A2、WO04/099249A2、WO05/040217A2、WO04/044859、WO05/070963A1、WO05/077981A2、WO05/092925A2、WO05/123780A2、WO06/019447A1、WO06/047350A2 及 WO06/085967A2；美國專利公開案第 US2007/0231329 號、第 US2007/0231329 號、第 US2007/0237765 號、第 US2007/0237766 號、第 US2007/0237767 號、第 US2007/0243188 號、第 US20070248603 號、第 US20070286859 號、第 US20080057056 號；或美國專利 5,648,260；5,739,277；5,834,250；5,869,046；6,096,871；6,121,022；6,194,551；6,242,195；6,277,375；6,528,624；6,538,124；6,737,056；6,821,505；6,998,253；7,083,784；7,404,956 及

7,317,091，該等專利各自以引用的方式併入本文中。在一個實施例中，可在一或多個所揭露之胺基酸位置處進行特定變化(例如此項技術中所揭露之一或多個胺基酸的特定取代)。在另一實施例中，可在一或多個所揭露之胺基酸位置處進行不同變化(例如此項技術中所揭露之一或多個胺基酸位置的不同取代)。

[0229] IgG 之 Fc 區或 FcRn 結合搭配物可根據充分認可之程序(諸如定點突變誘發及其類似程序)加以修飾以產生將由 FcRn 結合之經修飾 IgG 或其 Fc 片段或部分。此等修飾包括保持或甚至增強與 FcRn 之結合的遠離 FcRn 接觸位點之修飾以及在接觸位點內之修飾。舉例而言，可取代人類 IgG1 Fc(Fc γ 1)中之以下單一胺基酸殘基而不顯著降低 Fc 對 FcRn 之結合親和力：P238A、S239A、K246A、K248A、D249A、M252A、T256A、E258A、T260A、D265A、S267A、H268A、E269A、D270A、E272A、L274A、N276A、Y278A、D280A、V282A、E283A、H285A、N286A、T289A、K290A、R292A、E293A、E294A、Q295A、Y296F、N297A、S298A、Y300F、R301A、V303A、V305A、T307A、L309A、Q311A、D312A、N315A、K317A、E318A、K320A、K322A、S324A、K326A、A327Q、P329A、A330Q、P331A、E333A、K334A、T335A、S337A、K338A、K340A、Q342A、R344A、E345A、Q347A、R355A、E356A、M358A、T359A、K360A、N361A、Q362A、

Y373A、S375A、D376A、A378Q、E380A、E382A、S383A、N384A、Q386A、E388A、N389A、N390A、Y391F、K392A、L398A、S400A、D401A、D413A、K414A、R416A、Q418A、Q419A、N421A、V422A、S424A、E430A、N434A、T437A、Q438A、K439A、S440A、S444A 及 K447A，其中例如 P238A 表示在位置編號 238 處野生型脯胺酸經丙胺酸取代。舉例而言，一特定實施例併有 N297A 突變，從而移除高度保守之 N-糖基化位點。除丙胺酸之外，其他胺基酸亦可取代以上指定位置處之野生型胺基酸。突變可逐一引入 Fc 中，從而產生一百個以上不同於天然 Fc 之 Fc 區。另外，兩個、三個或三個以上此等個別突變之組合可一起引入，從而產生數百個以上 Fc 區。此外，可使本發明構築體之一個 Fc 區突變且該構築體之另一 Fc 區完全不突變，或其兩者均可突變，但突變不同。

[0230] 某些以上突變可對 Fc 區或 FcRn 結合搭配物賦予新功能性。舉例而言，一個實施例併有 N297A，從而移除高度保守之 N-糖基化位點。此突變之作用在於降低免疫原性，藉此增強 Fc 區之循環半衰期，及在不損害對 FcRn 之親和力下致使 Fc 區不能結合 FcγRI、FcγRIIA、FcγRIIB 及 FcγRIIIA(Routledge 等人 1995, Transplantation 60:847；Friend 等人 1999, Transplantation 68:1632；Shields 等人 1995, J. Biol. Chem. 276:6591)。作為由於上述突變而產生之新功能性之

另一實例，對 FcRn 之親和力在一些情況下可增加超過野生型對 FcRn 之親和力。此親和力增加可反映「締合」速率增加、「解離」速率降低、或「締合」速率增加與「解離」速率降低兩者。咸信會使對 FcRn 之親和力增加之突變的實例包括(但不限於)T256A、T307A、E380A 及 N434A(Shields 等人 2001, J. Biol. Chem. 276:6591)。

[0231] 另外，至少三種人類 Fc γ 受體似乎識別 IgG 上在下鉸鏈區內之結合位點，通常為胺基酸 234-237。因此，新功能性及潛在的降低之免疫原性之另一實例可由於此區域之突變而產生，如例如藉由將人類 IgG1 之胺基酸 233-236「ELLG」置換成來自 IgG2 之相應序列「PVA」(其中有一個胺基酸缺失)。已顯示當已引入此等突變時，介導各種效應功能之 Fc γ RI、Fc γ RII 及 Fc γ RIII 將不結合 IgG1。Ward 及 Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77 及 Armour 等人 1999, Eur. J. Immunol. 29:2613。

[0232] 在一個實施例中，Ig 恆定區或其部分(例如 Fc 區)為包括序列 PKNSSMISNTP(SEQ ID NO: 52)且視情況進一步包括選自 HQSLGTQ(SEQ ID NO: 53)、HQNLS DGK(SEQ ID NO: 54)、HQNIS DGK(SEQ ID NO: 55)或 VISSHLGQ(SEQ ID NO: 56)之序列的多肽(美國專利第 5,739,277 號)。

[0233] 在另一實施例中，免疫球蛋白恆定區或其部分包含鉸鏈區或其部分中與另一免疫球蛋白恆定區或其部分形成一或多個二硫鍵的胺基酸序列。由免疫球蛋白恆定

區或其部分形成之二硫鍵使包含 FVIII 之第一多肽及包含 VWF 片段之第二多肽處於一起以使內源性 VWF 不置換 VWF 片段且不結合 FVIII。因此，第一免疫球蛋白恆定區或其部分與第二免疫球蛋白恆定區或其部分之間之二硫鍵會阻止內源性 VWF 與 FVIII 蛋白質之間的相互作用。對 VWF 與 FVIII 蛋白質之間的相互作用之此抑制允許 FVIII 蛋白質之半衰期超過兩倍限制。鉸鏈區或其部分可進一步連接於 CH1、CH2、CH3 中之一或多個域、其片段及其任何組合。在一特定實施例中，免疫球蛋白恆定區或其部分為鉸鏈區及 CH2。

[0234] 在某些實施例中，Ig 恆定區或其部分經半糖基化。舉例而言，包含兩個 Fc 區或 FcRn 結合搭配物之嵌合蛋白可含有第一糖基化 Fc 區(例如糖基化 CH2 區)或 FcRn 結合搭配物及第二無糖基化 Fc 區(例如無糖基化 CH2 區)或 FcRn 結合搭配物。在一個實施例中，連接子可插入在糖基化 Fc 區與無糖基化 Fc 區之間。在另一實施例中，Fc 區或 FcRn 結合搭配物經完全糖基化，亦即所有 Fc 區皆經糖基化。在其他實施例中，Fc 區可為無糖基化的，亦即無 Fc 部分經糖基化。

[0235] 在某些實施例中，本發明之嵌合蛋白包含對 Ig 恆定區或其部分之胺基酸取代(例如 Fc 變異體)，其改變 Ig 恆定區之抗原非依賴性效應功能，特定言之改變蛋白質之循環半衰期。

[0236] 當與缺乏此等取代之蛋白質比較時，此等蛋

白質展現與 FcRn 之結合增加或降低，且因此在血清中之半衰期分別增加或降低。預期對 FcRn 之親和力提高之 Fc 變異體會具有較長血清半衰期，且此等分子適合應用於治療哺乳動物之方法(其中需要投與之多肽之半衰期較長例如以治療慢性疾病或病症)中(參見例如美國專利 7,348,004、7,404,956 及 7,862,820)。相反，預期 FcRn 結合親和力降低之 Fc 變異體會具有較短半衰期，且在縮短循環時間可為有利的情況下，例如適用於活體內診斷成像或在起始多肽當持續延長時期存在於循環中時具有毒性副作用之情形下，此等分子亦例如適用於向哺乳動物投與。FcRn 結合親和力降低之 Fc 變異體亦較不太可能穿過胎盤，且因此亦適用於治療懷孕婦女之疾病或病症。此外，可能需要 FcRn 結合親和力降低之其他應用包括需要定位於腦、腎及/或肝之彼等應用。在一個示範性實施例中，本發明之嵌合蛋白展現自血管結構穿過腎小球之上皮之轉運降低。在另一實施例中，本發明之嵌合蛋白展現自腦穿過血腦障壁(BBB)進入血管間隙中之轉運降低。在一個實施例中，FcRn 結合改變之蛋白質包含至少一個在 Ig 恆定區之「FcRn 結合環」內具有一或多個胺基酸取代之 Fc 區或 FcRn 結合搭配物(例如一或兩個 Fc 區或 FcRn 結合搭配物)。FcRn 結合環包含野生型全長 Fc 區之胺基酸殘基 280-299(根據 EU 編號)。在其他實施例中，本發明嵌合蛋白中 FcRn 結合親和力改變的 Ig 恆定區或其部分包含至少一個在 15 Å FcRn「接觸區」內具有一或多個胺基酸取代

之 Fc 區或 FcRn 結合搭配物。如本文所用，術語 15 Å FcRn「接觸區」包括野生型全長 Fc 部分之以下位置處之殘基：243-261、275-280、282-293、302-319、336-348、367、369、372-389、391、393、408、424、425-440(EU 編號)。在其他實施例中，本發明之 FcRn 結合親和力改變之 Ig 恆定區或其部分包含至少一個在對應於任一以下 EU 位置之胺基酸位置處具有一或多個胺基酸取代之 Fc 區或 FcRn 結合搭配物：256、277-281、283-288、303-309、313、338、342、376、381、384、385、387、434(例如 N434A 或 N434K)及 438。改變 FcRn 結合活性之示範性胺基酸取代揭露於國際 PCT 公開案第 WO05/047327 號中，該公開案以引用的方式併入本文中。

[0237] 本發明中使用之 Fc 區或 FcRn 結合搭配物亦可包含業內公認之改變嵌合蛋白之糖基化之胺基酸取代。舉例而言，嵌合蛋白中連接於 VWF 片段或 FVIII 蛋白質之 Fc 區或 FcRn 結合搭配物可包含具有導致糖基化(例如 N-連接型或 O-連接型糖基化)減少之突變之 Fc 區，或可包含野生型 Fc 部分之改變的糖型(例如低海藻糖(fucose)或無海藻糖聚醣)。

[0238] 在一個實施例中，本發明之未加工嵌合蛋白可包含遺傳融合之 Fc 區(亦即 scFc 區)，該 Fc 區具有獨立地選自本文所述之 Ig 恆定區或其部分之兩個或兩個以上其組成性 Ig 恆定區或其部分。在一個實施例中，二聚 Fc 區之 Fc 區為相同的。在另一實施例中，至少兩個 Fc 區為

不同的。舉例而言，本發明蛋白質之 Fc 區或 FcRn 結合搭配物包含相同數目之胺基酸殘基，或其可在長度方面相差一或多個胺基酸殘基(例如約 5 個胺基酸殘基(例如 1、2、3、4 或 5 個胺基酸殘基)、約 10 個殘基、約 15 個殘基、約 20 個殘基、約 30 個殘基、約 40 個殘基或約 50 個殘基)。在其他實施例中，本發明蛋白質之 Fc 區或 FcRn 結合搭配物可在序列方面在一或多個胺基酸位置上不同。舉例而言，至少兩個 Fc 區或 FcRn 結合搭配物可在約 5 個胺基酸位置(例如 1、2、3、4 或 5 個胺基酸位置)、約 10 個位置、約 15 個位置、約 20 個位置、約 30 個位置、約 40 個位置、或約 50 個位置上不同)。

E) 連接子

[0239] 本發明之嵌合蛋白進一步包含一或多個連接子。一種類型之連接子為可裂解連接子，其在活體內向個體投與，例如在凝血部位處投與時可由各種蛋白酶裂解。在一個實施例中，可裂解連接子允許在凝血級聯部位處自嵌合蛋白裂解部分(例如 VWF 片段)，由此使活化型 FVIII(FVIIIa)具有其 FVIIIa 活性。另一類型之連接子為可加工連接子，其含有細胞內裂解位點且因此可由宿主細胞中之細胞內加工酶裂解，從而允許便利地表現多肽及形成嵌合蛋白。

[0240] 一或多個連接子可存在於嵌合蛋白中之任何兩個蛋白質之間。在一個實施例中，嵌合蛋白包含(i)VWF

片段，(ii)XTEN 序列，及(iii)FVIII 蛋白質，其中該 VWF 片段藉由連接子(例如可裂解連接子)連接於該 XTEN 序列，且該 XTEN 序列進一步連接於該 FVIII 蛋白質(亦即 V-L-X-FVIII)。在另一實施例中，嵌合蛋白包含(i)VWF 片段，(ii)XTEN 序列，及(iii)FVIII 蛋白質，其中該 VWF 片段連接於該 XTEN 序列，且該 XTEN 序列藉由連接子(例如可裂解連接子)連接於該 FVIII 蛋白質(亦即 V-X-L-FVIII)。

[0241] 在某些實施例中，嵌合蛋白包含(i)VWF 片段，(ii)XTEN 序列，(iii)第一 Ig 恆定區或其部分(例如第一 Fc 區)，(iv)FVIII 蛋白質，及(v)第二 Ig 恆定區或其部分(例如第二 Fc 區)，其中該 VWF 片段藉由視情況選用之連接子(例如可裂解連接子)連接於該 XTEN 序列。XTEN 序列可藉由連接子(例如可裂解連接子)進一步連接於第一 Ig 恆定區或其部分。FVIII 蛋白質(有或無 XTEN 序列)亦可藉由視情況選用之連接子(例如可裂解連接子)連接於第二 Ig 恆定區或其部分。在某些實施例中，嵌合蛋白進一步在第一 Ig 恆定區或其部分(例如第一 Fc 區)與第二 Ig 恆定區或其部分(例如第二 Fc 區)之間、在 VWF 片段與第二 Ig 恆定區或其部分之間、或在 FVIII 蛋白質與第一 Ig 恆定區或其部分(例如第一 Fc 區)之間包含一或多個連接子，例如可加工連接子。

[0242] 在一些實施例中，本發明包括一種嵌合蛋白，其包含(i)FVIII 蛋白質，(ii)XTEN 序列，(iii)第一 Ig

恆定區或其部分，及(iv)第二 Ig 恆定區或其部分，其中該第一 Ig 恆定區或其部分與該第二 Ig 恆定區或其部分係藉由可加工連接子加以連接。

[0243] 適用於本發明中之連接子可包含任何有機分子。在一個實施例中，連接子包含聚合物，例如聚乙二醇(PEG)或羥乙基澱粉(HES)。在另一實施例中，連接子包含胺基酸序列。連接子可包含至少約 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900 或 2000 個胺基酸。連接子可包含 1-5 個胺基酸、1-10 個胺基酸、1-20 個胺基酸、10-50 個胺基酸、50-100 個胺基酸、100-200 個胺基酸、200-300 個胺基酸、300-400 個胺基酸、400-500 個胺基酸、500-600 個胺基酸、600-700 個胺基酸、700-800 個胺基酸、800-900 個胺基酸、或 900-1000 個胺基酸。在一個實施例中，連接子包含 XTEN 序列。可根據本發明使用之 XTEN 之其他實例揭露於美國專利公開案第 2010/0239554 A1 號、第 2010/0323956 A1 號、第 2011/0046060 A1 號、第 2011/0046061 A1 號、第 2011/0077199 A1 號或第 2011/0172146 A1 號、或國際專利公開案第 WO 2010091122 A1 號、第 WO 2010144502 A2 號、第 WO 2010144508 A1 號、第 WO 2011028228 A1 號、第 WO 2011028229 A1 號或第 WO 2011028344 A2 號中。在另一實施例中，連接子為 PAS 序列。

[0244] 適用於本發明中之連接子可包含任何有機分子。在一個實施例中，連接子為聚合物，例如聚乙二醇(PEG)或羥乙基澱粉(HES)。在另一實施例中，連接子為胺基酸序列。連接子可包含至少約 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900 或 2000 個胺基酸。連接子可包含 1-5 個胺基酸、1-10 個胺基酸、1-20 個胺基酸、10-50 個胺基酸、50-100 個胺基酸、100-200 個胺基酸、200-300 個胺基酸、300-400 個胺基酸、400-500 個胺基酸、500-600 個胺基酸、600-700 個胺基酸、700-800 個胺基酸、800-900 個胺基酸、或 900-1000 個胺基酸。

[0245] 連接子之實例在此項技術中為熟知的。在一個實施例中，連接子包含序列 G_n 。連接子可包含序列 $(GA)_n$ 。連接子可包含序列 $(GGS)_n$ 。在其他實施例中，連接子包含 $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 57)。在其他實施例中，連接子包含序列 $(GGS)_n(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 58)。在此等情況下， n 可為整數 1-100。在其他情況下， n 可為整數 1-20，亦即 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20。連接子之實例包括(但不限於)GGG(SEQ ID NO: ??)、SGGSGGS(SEQ ID NO: 59)、GGSGGSGGSGGSGGG(SEQ ID NO: 60)、GGSGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO: 61)、GGSGGSGGSGGSGGSGGS(SEQ ID NO: 62) 或

GGGGSGGGGSGGGGS(SEQ ID NO: 63)。連接子不消除或削弱 VWF 片段活性或因子 VIII 之凝結活性。視情況，連接子會增強 VWF 片段活性或因子 VIII 蛋白質之凝結活性，例如藉由進一步削弱空間位阻作用且使 VWF 片段或因子 VIII 部分更易接近其目標結合位點。

[0246] 在一個實施例中，適用於嵌合蛋白之連接子之長度為 15-25 個胺基酸。在另一實施例中，適用於嵌合蛋白之連接子之長度為 15-20 個胺基酸。在一些實施例中，用於嵌合蛋白之連接子之長度為 10-25 個胺基酸。在其他實施例中，用於嵌合蛋白之連接子之長度為 15 個胺基酸。在其他實施例中，用於嵌合蛋白之連接子為 (GGGGS)_n(SEQ ID NO: 64)，其中 G 表示甘胺酸，S 表示絲胺酸且 n 為整數 1-20。

F)裂解位點

[0247] 連接子亦可併有能夠以化學方式(例如水解酯鍵)、以酶促方式(亦即併有蛋白酶裂解序列)或以光解方式(例如發色團，諸如 3-胺基-3-(2-硝基苯基)丙酸(ANP))裂解之部分以使一個分子自另一分子釋放。

[0248] 在一個實施例中，連接子為可裂解連接子。可裂解連接子可在 N 末端或 C 末端或兩者處包含一或多個裂解位點。在另一實施例中，可裂解連接子基本上由以下組成或由以下組成：一或多個可裂解位點。在其他實施例中，可裂解連接子包含本文所述之異源胺基酸連接子序

列或聚合物及一或多個可裂解位點。

[0249] 在某些實施例中，可裂解連接子包含一或多個可在宿主細胞中裂解之裂解位點(亦即細胞內加工位點)。裂解位點之非限制性實例包括 RRRR(SEQ ID NO: 9)、RKRRKR(SEQ ID NO: 10)及 RRRRS(SEQ ID NO: 11)。

[0250] 在其他實施例中，可裂解連接子包含一或多個裂解位點，該等位點在向個體投與包含該可裂解連接子之嵌合蛋白之後由蛋白酶裂解。在一個實施例中，裂解位點由選自由以下組成之群之蛋白酶裂解：因子 XIa、因子 XIIa、胰舒血管素、因子 VIIa、因子 IXa、因子 Xa、因子 IIa(凝血酶)、彈性蛋白酶-2、MMP-12、MMP-13、MMP-17 及 MMP-20。在另一實施例中，裂解位點係選自由以下組成之群：FXIa 裂解位點(例如 KLTR↓AET(SEQ ID NO: 65))、FXIa 裂解位點(例如 DFTR↓VVG(SEQ ID NO: 66))、FXIIa 裂解位點(例如 TMTR↓IVGG(SEQ ID NO: 67))、胰舒血管素裂解位點(例如 SPFR↓STGG(SEQ ID NO: 68))、FVIIa 裂解位點(例如 LQVR↓IVGG(SEQ ID NO: 69))、FIXa 裂解位點(例如 PLGR↓IVGG(SEQ ID NO: 70))、FXa 裂解位點(例如 IEGR↓TVGG(SEQ ID NO: 71))、FIIa(凝血酶)裂解位點(例如 LTPR↓SLLV(SEQ ID NO: 72))、彈性蛋白酶-2 裂解位點(例如 LGPV↓SGVP(SEQ ID NO: 73))、粒酶-B 裂解(例如 VAGD↓SLEE(SEQ ID NO: 74))、MMP-12 裂解位點(例如 GPAG↓LGGA(SEQ ID NO: 75))、MMP-13

裂解位點(例如 GPAG↓LRGA(SEQ ID NO: 76))、MMP-17 裂解位點(例如 APLG↓LRLR(SEQ ID NO: 77))、MMP-20 裂解位點(例如 PALP↓LVAQ(SEQ ID NO: 78))、TEV 裂解位點(例如 ENLYFQ↓G(SEQ ID NO: 79))、腸激酶裂解位點(例如 DDDK↓IVGG(SEQ ID NO: 80))、蛋白酶 3C(PRESCISSON™)裂解位點(例如 LEVLFQ↓GP(SEQ ID NO: 81))及分選酶 A 裂解位點(例如 LPKT↓GSES)(SEQ ID NO: 82)。在某些實施例中，FXIa 裂解位點包括(但不限於)例如 TQSFNDFTR(SEQ ID NO: 83) 及 SVSQTSKLTR(SEQ ID NO: 84)。非限制性示範性凝血酶裂解位點包括例如 DFLAEGGGVR(SEQ ID NO: 85)、TTKIKPR(SEQ ID NO: 86)或 LVPRG(SEQ ID NO: 87)，及包含以下、基本上由以下組成或由以下組成之序列：ALRPR(SEQ ID NO: 17)(例如 ALRPRVVGGA(SEQ ID NO: 88))。

[0251] 在一特定實施例中，裂解位點為 TLDPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEEK (SEQ ID NO: 8)。

聚核苷酸、載體及宿主細胞

[0252] 本發明中亦提供一種聚核苷酸，其編碼本文所述之(a)連接於 XTEN 序列及 FVIII 蛋白質之 VWF 片段，(b)連接於 XTEN 序列及 Fc 之 FVIII 蛋白質，或(c)連接於 XTEN 序列及 VWF 片段之 FVIII 蛋白質。當嵌合蛋白為單一多肽鏈(例如 F2-L2-X-V-L1-F1-FVIII，其中 FVIII 包含

FVIII 蛋白質，F1 包含第一 Ig 恆定區或其部分(例如第一 Fc 區)，L1 包含第一連接子，V 包含 VWF 片段，X 包含 XTEN 序列，L2 包含第二連接子，且 F2 包含第二 Ig 恆定區或其部分(例如第二 Fc 區))時，本發明係有關一種編碼該單一多肽鏈之單一聚核苷酸鏈。當嵌合蛋白包含第一及第二多肽鏈(F2-L2-X-V:FVIII-F1)，該第一多肽鏈包含連接於藉由可裂解連接子進一步連接於第一 Ig 恆定區或其部分(例如第一 Fc 區)之 XTEN 序列之 VWF 片段(例如 F2-L2-X-V)，且該第二多肽鏈包含 FVIII 蛋白質及第二 Ig 恆定區或其部分(例如第二 Fc 區)(例如 FVIII-F1)，其中該第一多肽鏈與該第二多肽鏈彼此締合時，聚核苷酸可包含第一核苷酸序列及第二核苷酸序列。在一個實施例中，第一多肽鏈及第二多肽鏈可由單一聚核苷酸鏈編碼。在另一實施例中，第一多肽鏈及第二多肽鏈由兩個不同聚核苷酸，亦即第一核苷酸序列及第二核苷酸序列編碼。在另一實施例中，第一核苷酸序列及第二核苷酸序列在兩個不同聚核苷酸(例如不同載體)上。在某些實施例中，本發明係有關一組包含第一核苷酸鏈及第二核苷酸鏈之聚核苷酸，其中該第一核苷酸鏈編碼嵌合蛋白之 VWF 片段且該第二核苷酸鏈編碼 FVIII 蛋白質。在一些實施例中，包含兩條多肽鏈或三條多肽鏈之嵌合蛋白可由單一聚核苷酸鏈編碼，且接著加工成兩條或三條(或三條以上)多肽鏈。在其他實施例中，包含此等多肽鏈之嵌合蛋白可由兩條或三條聚核苷酸鏈編碼。

[0253] 在其他實施例中，該組聚核苷酸進一步包含編碼蛋白質轉化酶之另一核苷酸鏈(例如當嵌合多肽由單一聚核苷酸鏈編碼時之第二核苷酸鏈或當嵌合蛋白由兩個聚核苷酸鏈編碼時之第三核苷酸鏈)。蛋白質轉化酶可選自由以下組成之群：前蛋白轉化酶枯草桿菌蛋白酶/kexin 5 型(PCSK5 或 PC5)、前蛋白轉化酶枯草桿菌蛋白酶/kexin 7 型(PCSK7 或 PC5)、酵母 Kex 2、前蛋白轉化酶枯草桿菌蛋白酶/kexin 3 型(PACE 或 PCSK3)及其兩種或兩種以上組合。在一些實施例中，蛋白質轉化酶為 PACE、PC5 或 PC7。在一特定實施例中，蛋白質轉化酶為 PC5 或 PC7。參見國際申請案第 PCT/US2011/043568 號。

[0254] 如本文所用，表現載體係指含有在引入適當宿主細胞中時，為所插入編碼序列之轉錄及轉譯所必需之元件，或在 RNA 病毒載體之情況下，為複製及轉譯所必需之元件的任何核酸構築體。表現載體可包括質體、噬菌粒、病毒及其衍生物。

[0255] 本發明之表現載體將包括編碼本文所述之嵌合蛋白之聚核苷酸。在一個實施例中，VWF 片段及 XTEN、FVIII 蛋白質及 XTEN、或兩者之編碼序列中之一或多者可操作地連接於表現控制序列。如本文所用，當兩個核酸序列以允許各組成核酸序列保留其功能性之方式共價連接時，其係可操作地連接。當編碼序列及基因表現控制序列以使得編碼序列之表現或轉錄及/或轉譯處於基因表現控制序列之影響或控制下之方式共價連接時，其稱為

可操作地連接。若誘導 5'基因表現序列中之啓動子導致編碼序列轉錄且若兩個 DNA 序列之間的鍵聯之性質不(1)導致引入框移突變，(2)干擾啓動子區域引導編碼序列轉錄之能力，或(3)干擾相應 RNA 轉錄物被轉譯成蛋白質之能力，則兩個 DNA 序列稱爲可操作地連接。因此，若基因表現序列能夠實現編碼核酸序列之轉錄以使所得轉錄物轉譯成所要蛋白質或多肽，則該基因表現序列將可操作地連接於彼編碼核酸序列。

[0256] 如本文所用之基因表現控制序列爲有助於可操作地連接之編碼核酸之高效轉錄及轉譯的任何調控核苷酸序列，諸如啓動子序列或啓動子-增強子組合。基因表現控制序列可例如爲哺乳動物或病毒啓動子，諸如組成性或誘導性啓動子。組成性哺乳動物啓動子包括(但不限於)以下基因之啓動子：次黃嘌呤磷酸核糖基轉移酶(HPRT)、腺苷去胺酶、丙酮酸激酶、 β -肌動蛋白啓動子及其他組成性啓動子。在真核細胞中組成性起作用之示範性病毒啓動子包括例如來自巨細胞病毒(CMV)、猿猴病毒(例如SV40)、乳頭狀瘤病毒(papilloma virus)、腺病毒、人類免疫缺陷病毒(HIV)、勞斯肉瘤病毒、巨細胞病毒、莫洛尼白血病病毒(Moloney leukemia virus)之長末端重複序列(LTR)及其他逆轉錄病毒之啓動子、及單純疱疹病毒之胸苷激酶啓動子。其他組成性啓動子爲一般技藝人士所知。適用作本發明之基因表現序列之啓動子亦包括誘導性啓動子。誘導性啓動子在誘導劑存在下表現。舉例而言，誘導

金屬硫蛋白啓動子以促進在某些金屬離子存在下之轉錄及轉譯。其他誘導性啓動子爲一般技藝人士所知。

[0257] 一般而言，基因表現控制序列在必要時將包括分別涉及轉錄及轉譯啓始之 5'非轉錄及 5'非轉譯序列，諸如 TATA 盒、加帽序列、CAAT 序列及其類似序列。特定而言，此等 5'非轉錄序列將包括啓動子區，該啓動子區包括用於對可操作地接合之編碼核酸進行轉錄控制之啓動子序列。必要時，基因表現序列視情況包括增強子序列或上游活化序列。

[0258] 病毒載體包括(但不限於)來自以下病毒之核酸序列：逆轉錄病毒，諸如莫洛尼鼠類白血病毒、哈維(Harvey)鼠類肉瘤病毒、鼠類乳腺腫瘤病毒及勞斯肉瘤病毒；腺病毒、腺相關病毒；SV40 型病毒；多型瘤病毒；艾伯斯坦-巴爾病毒(Epstein-Barr virus)；乳頭狀瘤病毒；疱疹病毒；牛痘病毒；小兒麻痺病毒；及 RNA 病毒，諸如逆轉錄病毒。可容易地採用此項技術中熟知之其他載體。某些病毒載體係基於非必需基因已經相關基因置換之非細胞病變真核病毒。非細胞病變病毒包括逆轉錄病毒，其壽命週期涉及基因組病毒 RNA 逆轉錄成 DNA，隨後前病毒整合至宿主細胞 DNA 中。逆轉錄病毒已核准用於人類基因療法試驗。最適用的是複製缺陷型(亦即能夠直接合成所要蛋白質，但不能製造感染性粒子)之彼等逆轉錄病毒。此等遺傳學改造之逆轉錄病毒表現載體具有用於在活體內高效轉導基因之一般性效用。用於產生複製缺乏型

逆轉錄病毒之標準方案(包括以下步驟：將外源性遺傳物質併入質體中，用質體對包裝細胞株進行轉染，由包裝細胞株產生重組逆轉錄病毒，自組織培養基收集病毒粒子，及用病毒粒子感染目標細胞)提供於 Kriegler, M., Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, W.H. Freeman 公司, New York (1990)及 Murry, E. J., Methods in Molecular Biology, 第 7 卷, Humana Press 公司, Clifton, N.J. (1991)中。

[0259] 在一個實施例中，病毒為腺相關病毒，其為一種雙股 DNA 病毒。腺相關病毒可經工程改造成複製缺陷型且能夠感染廣泛範圍之細胞類型及物種。其進一步具有以下優勢：諸如熱及脂質溶劑穩定性；在不同譜系之細胞(包括造血細胞)中具有高轉導頻率；及缺乏重複感染抑制，因此允許進行多級轉導。據報導，腺相關病毒可以位點特異性方式整合至人類細胞 DNA 中，藉此使逆轉錄病毒感染所特有之插入突變誘發可能性及插入基因表現之可變性達到最小。此外，野生型腺相關病毒感染已在不存在選擇壓力下在組織培養物中沿襲 100 次繼代以上，從而暗示腺相關病毒基因組整合為相對穩定之事件。腺相關病毒亦可以染色體外方式起作用。

[0260] 其他載體包括質體載體。質體載體已在此項技術中廣泛描述且為熟習此項技術者所熟知。參見例如 Sambrook 等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989。在過

去數年中，已發現質體載體由於不能在宿主基因組內複製及整合至宿主基因組中而特別有利於在活體內將基因傳遞至細胞。然而，具有與宿主細胞相容之啟動子之此等質體可自質體內可操作地編碼之基因表現肽。一些可自商業供應商獲得之常用質體包括 pBR322、pUC18、pUC19、各種 pcDNA 質體、pRC/CMV、各種 pCMV 質體、pSV40 及 pBlueScript。特定質體之其他實例包括 pcDNA3.1，目錄編號 V79020；pcDNA3.1/hygro，目錄編號 V87020；pcDNA4/myc-His，目錄編號 V86320；及 pBudCE4.1，目錄編號 V53220，全部來自 Invitrogen(Carlsbad, CA.)。其他質體為一般技藝人士所熟知。另外，可使用標準分子生物學技術對質體進行定製設計以移除及/或添加特定 DNA 片段。

[0261] 在一種可用於產生本發明蛋白質之昆蟲表現系統中，使用苜蓿銀紋夜蛾核多角體病病毒(*Autographa californica* nuclear polyhidrosis virus, AcNPV)作為載體來表現外來基因。該病毒生長在草地貪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)細胞中。編碼序列可選殖至病毒之非必需區域(例如多角體基因)中且置於 ACNPV 啟動子(例如多角體啟動子)之控制下。成功插入編碼序列將導致多角體基因不活化且產生非封閉重組病毒(亦即缺乏由多角體基因編碼之蛋白質衣殼之病毒)。此等重組病毒接著用於感染草地貪夜蛾細胞，在該細胞中表現插入基因。(參見例如 Smith 等人 (1983) *J Virol* 46:584；美國專利第 4,215,051 號)。

此表現系統之其他實例可見於 Ausubel 等人編 (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, 第 2 卷, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience 中。

[0262] 可用於表現本發明蛋白質之另一系統為麩醯胺酸合成酶基因表現系統，亦稱為「GS 表現系統」(Lonza Biologics PLC, Berkshire UK)。此表現系統詳述於美國專利第 5,981,216 號中。

[0263] 在哺乳動物宿主細胞中，可利用許多病毒基表現系統。在腺病毒用作表現載體之情況下，編碼序列可連接於腺病毒轉錄/轉譯控制複合物，例如晚期啟動子及三重前導序列。此嵌合基因可接著藉由活體外或活體內重組插入腺病毒基因組中。插入在病毒基因組之非必需區域(例如區域 E1 或 E3)中將產生在受感染宿主中具有活力且能夠表現肽之重組病毒。參見例如 Logan 及 Shenk (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3655)。或者，可使用牛痘 7.5 K 啟動子。參見例如 Mackett 等人 (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7415；Mackett 等人 (1984) *J Virol* 49:857；Panicali 等人 (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* 79:4927。

[0264] 為增加製造效率，聚核苷酸可設計成編碼由酶促裂解位點分開之本發明蛋白質的多個單元。所得多肽可經裂解(例如藉由用適當酶處理)以回收多肽單元。此舉可增加由單一啟動子驅動之多肽之產量。當用於適當病毒表現系統中時，在轉錄物內部引導由 mRNA 編碼之各多肽之轉譯；例如由內部核糖體進入位點 IRES 引導。因此，

多順反子構築體引導單一大型多順反子 mRNA 之轉錄，該 mRNA 又引導多個個別多肽之轉譯。此方法消除多聚蛋白質之製造及酶促加工且可顯著增加由單一啓動子驅動之多肽之產量。

[0265] 轉型中使用之載體將通常含有用於鑒別轉型體之可選擇標記。在細菌系統中，此可選擇標記可包括抗生素抗性基因，諸如胺苄青黴素或康黴素。用於培養哺乳動物細胞中之可選擇標記包括賦予對諸如新黴素(neomycin)、潮黴素及甲胺蝶呤(methotrexate)之藥物之抗性的基因。可選擇標記可爲可擴增可選擇標記。一種可擴增可選擇標記爲二氫葉酸還原酶(dihydrofolate reductase, DHFR)基因。Simonsen C C 等人 (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2495-9。可選擇標記由 Thilly (1986) *Mammalian Cell Technology*, Butterworth Publishers, Stoneham, Mass.評述，且對可選擇標記之選擇完全在此項技術中之一般技能範圍內。

[0266] 可選擇標記可與相關基因同時於各別質體上引入細胞中，或其可於同一質體上引入。若位於同一質體上，則可選擇標記及相關基因可處於不同啓動子或相同啓動子控制下，後述排列會產生雙順反子訊息。此類型之構築體在此項技術中爲已知的(例如美國專利第 4,713,339 號)。

[0267] 表現載體可編碼允許容易地純化重組產生之蛋白質之標籤。實例包括(但不限於)載體 pUR278(Ruther

等人 (1983) *EMBO J* 2:1791), 其中欲表現之蛋白質之編碼序列可與 lac z 編碼區同框連接至載體中以使得產生所標記融合蛋白; pGEX 載體可用於表現具有麩胱甘肽 (glutathione)S 轉移酶 (GST) 標籤之本發明蛋白質。此等蛋白質通常為可溶性的且可易於藉由吸附於麩胱甘肽-瓊脂糖珠粒, 隨後在游離麩胱甘肽存在下溶離來自細胞純化。載體包括裂解位點 (凝血酶或因子 Xa 蛋白酶或 PRESSION PROTEASETM (Pharmacia, Peapack, N.J.)) 以便在純化之後容易地移除標籤。

[0268] 一或多個表現載體接著轉染或共轉染至將表現多肽之適合目標細胞中。此項技術中已知之轉染技術包括 (但不限於) 磷酸鈣沈澱 (Wigler 等人 (1978) *Cell* 14:725)、電穿孔 (Neumann 等人 (1982) *EMBO J* 1:841) 及脂質體基試劑。多種宿主表現載體系統可用於表現本文所述之蛋白質, 該等系統包括原核細胞與真核細胞兩者。此等系統包括 (但不限於) 微生物, 諸如經含有適當編碼序列之重組噬菌體 DNA 或質體 DNA 表現載體轉型之細菌 (例如大腸桿菌); 經含有適當編碼序列之重組酵母或真菌表現載體轉型之酵母或絲狀真菌; 經含有適當編碼序列之重組病毒表現載體 (例如桿狀病毒) 感染之昆蟲細胞系統; 經重組病毒表現載體 (例如花椰菜花葉病毒 (cauliflower mosaic virus) 或煙草花葉病毒 (tobacco mosaic virus)) 感染或經含有適當編碼序列之重組質體表現載體 (例如 Ti 質體) 轉型之植物細胞系統; 或動物細胞系統, 包括哺乳動物細

胞(例如 HEK 293、CHO、Cos、HeLa、HKB11 及 BHK 細胞)。

[0269] 在一個實施例中，宿主細胞為真核細胞。如本文所用，真核細胞係指具有明確細胞核之任何動物或植物細胞。動物之真核細胞包括脊椎動物(例如哺乳動物)之細胞及無脊椎動物(例如昆蟲)之細胞。植物之真核細胞特定言之可包括(但不限於)酵母細胞。真核細胞不同於原核細胞(例如細菌)。

[0270] 在某些實施例中，真核細胞為哺乳動物細胞。哺乳動物細胞為源於哺乳動物之任何細胞。哺乳動物細胞特定言之包括(但不限於)哺乳動物細胞株。在一個實施例中，哺乳動物細胞為人類細胞。在另一實施例中，哺乳動物細胞為 HEK 293 細胞，其為人類胚腎細胞株。HEK 293 細胞可以 CRL-1533 自美國菌種中心(American Type Culture Collection, Manassas, VA)及以 293-H 細胞(目錄編號 11631-017)或 293-F 細胞(目錄編號 11625-019)自 Invitrogen(Carlsbad, Calif.)獲得。在一些實施例中，哺乳動物細胞為 PER.C6[®]細胞，其為一種源於視網膜之人類細胞株。PER.C6[®]細胞可自 Crucell(Leiden, The Netherlands)獲得。在其他實施例中，哺乳動物細胞為中國倉鼠卵巢(CHO)細胞。CHO 細胞可自美國菌種中心(Manassas, VA.)獲得(例如 CHO-K1；CCL-61)。在其他實施例中，哺乳動物細胞為幼小倉鼠腎(BHK)細胞。BHK 細胞可自美國菌種中心(Manassas, Va.)獲得(例如 CRL-1632)。在一些實施例

中，哺乳動物細胞為 HKB11 細胞，其為 HEK293 細胞與人類 B 細胞株之雜交細胞株。Mei 等人, *Mol. Biotechnol.* 34(2): 165-78 (2006)。

[0271] 在一個實施例中，將包括 FVIII(X)-Fc 融合體編碼序列、VWF 片段-L-Fc 融合體編碼序列或兩者及可選擇標記(例如博萊黴素(zeocin)抗性)之質體轉染至 HEK 293 細胞中以供產生嵌合蛋白。

[0272] 在另一實施例中，將包括 FVIII-Fc 融合體編碼序列、VWF 片段-XTEN-L-Fc 融合體編碼序列或兩者及可選擇標記(例如博萊黴素抗性)之質體轉染至 HEK 293 細胞中以供產生嵌合蛋白。

[0273] 在其他實施例中，將包括 FVIII(X)-Fc 融合體編碼序列、Fc 編碼序列或兩者及可選擇標記(例如博萊黴素抗性)之質體轉染至 HEK 293 細胞中以供產生嵌合蛋白。

[0274] 在一些實施例中，將包括 FVIII(X)-Fc 融合體編碼序列及第一可選擇標記(例如博萊黴素抗性基因)之第一質體、及包括 Fc 編碼序列或 VWF 片段-L-Fc 編碼序列及第二可選擇標記(例如新黴素(neomycin)抗性基因)之第二質體、及包括蛋白質轉化酶編碼序列及第三可選擇標記(例如潮黴素(hygromycin)抗性基因)之第三質體共轉染至 HEK 293 細胞中以供產生嵌合蛋白。第一及第二質體可以相等量(亦即 1:1 莫耳比)引入，或其可以不相等量引入。

[0275] 在其他實施例中，將包括 FVIII-Fc 融合體編

碼序列及第一可選擇標記(例如博萊黴素抗性基因)之第一質體、及包括 VWF 片段-XTEN-L-Fc 編碼序列及第二可選擇標記(例如新黴素抗性基因)之第二質體、及包括蛋白質轉化酶編碼序列及第三可選擇標記(例如潮黴素抗性基因)之第三質體共轉染至 HEK 293 細胞中以供產生嵌合蛋白。第一及第二質體可以相等量(亦即 1:1 莫耳比)引入，或其可以不相等量引入。

● [0276] 在其他實施例中，將包括 FVIII(X)-Fc 融合體編碼序列及第一可選擇標記(例如博萊黴素抗性基因)之第一質體、及包括 VWF 片段-XTEN-L-Fc 編碼序列及第二可選擇標記(例如新黴素抗性基因)之第二質體、及包括蛋白質轉化酶編碼序列及第三可選擇標記(例如潮黴素抗性基因)之第三質體共轉染至 HEK 293 細胞中以供產生嵌合蛋白。第一及第二質體可以相等量(亦即 1:1 莫耳比)引入，或其可以不相等量引入。

● [0277] 在某些實施例中，將包括嵌合蛋白編碼 FVIII(有或無 XTEN)-F1-L1-V-XTEN-L2-F2 編碼序列及第一可選擇標記(例如博萊黴素抗性基因)之第一質體及包括蛋白質轉化酶編碼序列及第二可選擇標記(例如潮黴素抗性基因)之第二質體共轉染至 HEK 293 細胞中以供產生嵌合蛋白。FVIII(X)-Fc 編碼序列之啟動子與 VWF-XTEN-Fc 編碼序列之啟動子可不同或其可相同。

[0278] 在其他實施例中，轉染細胞係經穩定轉染。此等細胞可使用熟習此項技術者已知之習知技術選擇及維

持為穩定細胞株。

[0279] 使含有蛋白質之 DNA 構築體之宿主細胞生長在適當生長培養基中。如本文所用，術語「適當生長培養基」意謂含有細胞生長所需要之養分之培養基。細胞生長所需要之養分可包括碳源、氮源、必需胺基酸、維生素、礦物質及生長因子。視情況，培養基可含有一或多種選擇因子。視情況，培養基可含有小牛血清或胎牛血清(FCS)。在一個實施例中，培養基實質上不含 IgG。生長培養基將通常藉由例如藥物選擇或缺乏必需養分來選擇含有 DNA 構築體之細胞，該必需養分由 DNA 構築體上或與 DNA 構築體共轉染之可選擇標記補充。培養之哺乳動物細胞通常生長在市售含血清或無血清培養基(例如 MEM、DMEM、DMEM/F12)中。在一個實施例中，培養基為 CD293(Invitrogen, Carlsbad, CA.)。在另一實施例中，培養基為 CD17(Invitrogen, Carlsbad, CA.)。對適於所用特定細胞株之培養基之選擇在一般技藝人士之技能範圍內。

[0280] 為共表現嵌合蛋白之兩條多肽鏈，在允許兩條鏈表現之條件下培養宿主細胞。如本文所用，培養係指在活體外維持活細胞至少一定時間。維持可(但無需)包括活細胞群體增加。舉例而言，維持於培養物中之細胞在群體方面可為靜態的，但仍然具有活力且能夠產生所要產物，例如重組蛋白質或重組融合蛋白。適用於培養真核細胞之條件在此項技術中為熟知的且包括適當選擇培養基、培養基補充劑、溫度、pH 值、氧飽和度及其類似條件。

出於商業目的，培養可包括使用各種類型擴增系統中之任一者，包括振盪瓶、滾瓶、中空纖維生物反應器、攪拌槽生物反應器、氣升生物反應器、搖袋式生物反應器(Wave bioreactor)及其他系統。

[0281] 亦選擇細胞培養條件以允許 VWF 片段與 FVIII 蛋白質締合。允許 VWF 片段及/或 FVIII 蛋白質表現之條件可包括存在維生素 K 來源。舉例而言，在一個實施例中，將穩定轉染之 HEK 293 細胞在補充有 4 mM 麩醯胺酸之 CD293 培養基 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 或 OptiCHO 培養基 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 中培養。

[0282] 在一個態樣中，本發明係有關一種表現、製備或產生本發明之嵌合蛋白之方法，其包含 a) 轉染包含編碼該嵌合蛋白之聚核苷酸之宿主細胞及 b) 在適於表現該嵌合蛋白之條件下在培養基中培養該宿主細胞，其中該嵌合蛋白得以表現。

[0283] 在其他實施例中，含有連接於 XTEN 序列之 VWF 片段或連接於 XTEN 序列之 FVIII 蛋白質的蛋白質產物分泌至培養基中。將培養基與細胞分離、濃縮、過濾且接著穿過兩個或三個親和管柱，例如蛋白質 A 管柱及一或兩個陰離子交換管柱。

[0284] 在某些態樣中，本發明係關於藉由本文所述之方法產生之嵌合蛋白。

[0285] 活體外生產允許擴增以得到大量本發明所要改造多肽。用於在組織培養條件下進行哺乳動物細胞培養

之技術在此項技術中為已知的且包括例如在氣升反應器中或在連續攪拌反應器中進行均質懸浮培養，或例如在中空纖維、微囊中、在瓊脂糖微珠粒或陶瓷管殼上進行固定或包埋式細胞培養。必要及/或需要時，多肽之溶液可藉由慣用層析方法進行純化，該等方法例如凝膠過濾、離子交換層析、疏水性相互作用層析(HIC)、經 DEAE-纖維素層析或親和層析。

醫藥組合物

[0286] 含有本發明之嵌合蛋白之組合物可含有醫藥學上可接受之適合載劑。舉例而言，該等組合物可含有有助於將活性化合物加工成設計用於傳遞至作用部位之製劑之賦形劑及/或助劑。

[0287] 醫藥組合物可調配成用於藉由團式注射進行非經腸投藥(亦即靜脈內、皮下或肌肉內)。注射用調配物可以例如於添加有防腐劑之安瓿或多劑量容器中的單位劑型提供。組合物可採用諸如於油性或水性媒劑中之懸浮液、溶液或乳液之形式，且可含有調配劑，諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑。或者，活性成分可呈用於以適合媒劑(例如無熱原質水)復原之粉末形式。

[0288] 適用於非經腸投藥之調配物亦包括呈水溶性形式(例如水溶性鹽)之活性化合物之水溶液。此外，可投與呈適當油性注射懸浮液形式之活性化合物懸浮液。適合親脂性溶劑或媒劑包括脂肪油(例如芝麻油)或合成脂肪酸

酯(例如油酸乙酯或三酸甘油酯)。水性注射懸浮液可含有增加懸浮液黏度之物質，包括例如羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇及葡聚糖。視情況，懸浮液亦可含有穩定劑。脂質體亦可用於囊封本發明之分子以傳遞至細胞或間質間隙中。醫藥學上可接受之示範性載劑為生理上相容之溶劑、分散介質、包衣、抗細菌劑及抗真菌劑、等張劑及吸收延遲劑、水、生理食鹽水、磷酸鹽緩衝生理食鹽水、右旋糖、甘油、乙醇及其類似物。在一些實施例中，組合物包含等張劑，例如糖、多元醇(諸如甘露糖醇、山梨糖醇)或氯化鈉。在其他實施例中，組合物包含增強活性成分之保存期限或有效性的醫藥學上可接受之物質，諸如濕潤劑或少量輔助物質，諸如濕潤劑或乳化劑、防腐劑或緩衝劑。

[0289] 本發明之組合物可呈多種形式，包括例如液體(例如可注射及可輸注溶液)、分散液、懸浮液、半固體及固體劑型。較佳形式取決於投藥模式及治療應用。

[0290] 組合物可調配成溶液、微乳液、分散液、脂質體或適於高藥物濃度之其他有序結構。可藉由將活性成分以所需量在必要時與以上列舉之一種成分或成分之組合一起併入適當溶劑中，隨後進行過濾滅菌來製備無菌可注射溶液。一般而言，藉由將活性成分併入含有基本分散介質及來自以上列舉之成分之所需其他成分的無菌媒劑中來製備分散液。在用於製備無菌可注射溶液之無菌粉末之情況下，較佳製備方法為真空乾燥及冷凍乾燥，其產生活性成分外加來自先前無菌過濾溶液之任何其他所要成分的粉

末。溶液之適當流動性可例如藉由使用包衣(諸如卵磷脂(lecithin))、在分散液之情況下藉由維持所需粒度及藉由使用界面活性劑來維持。可注射組合物之延長吸收可藉由在組合物中包括延遲吸收之試劑(例如單硬脂酸鹽及明膠)來達成。

[0291] 活性成分可用控制釋放調配物或裝置調配。此等調配物及裝置之實例包括植入物、經皮貼片及微囊封傳遞系統。可使用生物可降解之生物相容性聚合物，例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、膠原蛋白(collagen)、聚原酸酯及聚乳酸。製備此等調配物及裝置之方法在此項技術中為已知的。參見例如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson 編, Marcel Dekker 公司, New York, 1978。

[0292] 可注射儲積式調配物可藉由在諸如聚丙交酯-聚乙交酯之生物可降解聚合物中形成微囊封藥物基質來製備。視藥物與聚合物之比率及所用聚合物之性質而定，可控制藥物釋放速率。其他示範性生物可降解聚合物為聚原酸酯及聚酸酐。儲積式可注射調配物亦可藉由將藥物包埋在脂質體或微乳液中來製備。

[0293] 可在組合物中併入補充性活性化合物。在一個實施例中，本發明之嵌合蛋白與另一凝結因子或其變異體、片段、類似物或衍生物一起調配。舉例而言，凝結因子包括(但不限於)因子 V、因子 VII、因子 VIII、因子 IX、因子 X、因子 XI、因子 XII、因子 XIII、凝血酶原、

纖維蛋白原、范威爾邦德因子或重組可溶性組織因子(rsTF)或任何前述因子之活化形式。止血劑之凝結因子亦可包括抗纖維蛋白溶解藥物，例如 ϵ -胺基-己酸、胺甲環酸(tranexamic acid)。

[0294] 可調整劑量方案以提供最佳所要反應。舉例而言，可投與單一大丸劑，可隨時間投與若干分次劑量，或可如藉由治療情形之緊急性所指示，按比例降低或增加劑量。宜以劑量單位形式調配非經腸組合物以便於投藥及達成劑量均一性。參見例如 Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Pub.公司, Easton, Pa. 1980)。

[0295] 除活性化合物之外，液體劑型亦可含有惰性成分，諸如水、乙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苯甲酯、丙二醇、1,3-丁二醇、二甲基甲醯胺、油、甘油、四氫糠醇、聚乙二醇及脫水山梨糖醇脂肪酸酯。

[0296] 適合醫藥載劑之非限制性實例亦描述於由 E. W. Martin 所著之 Remington's Pharmaceutical Sciences 中。賦形劑之一些實例包括澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、稻米、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、甘油單硬脂酸酯、滑石、氯化鈉、脫脂乳粉、甘油、丙二醇、水、乙醇及其類似物。組合物亦可含有 pH 值緩衝試劑及濕潤劑或乳化劑。

[0297] 對於經口投藥，醫藥組合物可採用藉由習知手段製備之錠劑或膠囊形式。組合物亦可製備成液體，例如糖漿或懸浮液。液體可包括懸浮劑(例如山梨糖醇糖

漿、纖維素衍生物或氫化食用脂肪)、乳化劑(卵磷脂或阿拉伯膠(acacia))、非水性媒劑(例如杏仁油、油性酯、乙醇或分餾植物油)及防腐劑(例如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯或山梨酸)。製劑亦可包括調味劑、著色劑及甜味劑。或者，組合物可以用於以水或另一適合媒劑復原之乾燥產品形式提供。

[0298] 對於經頰投藥，組合物可採用習知方案之錠劑或口含錠形式。

[0299] 對於藉由吸入投藥，供根據本發明使用之化合物宜以有或無賦形劑之霧化氣霧劑形式或以氣霧劑噴霧形式視情況在推進劑(例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟甲烷、二氧化碳或其他適合氣體)存在下自加壓包裝或噴霧器傳遞。在加壓氣霧劑之情況下，劑量單位可藉由提供用以傳遞經計量之量的閥來確定。用於在吸入器或吹入器中使用之例如明膠之膠囊及藥筒可調配成含有化合物與諸如乳糖或澱粉之適合粉末基質之粉末混合物。

[0300] 醫藥組合物亦可調配用於以例如含有習知栓劑基質(諸如可可脂或其他甘油酯)之栓劑或保留灌腸劑形式經直腸投藥。

[0301] 在一個實施例中，醫藥組合物包含嵌合蛋白、編碼該嵌合蛋白之聚核苷酸、包含該聚核苷酸之載體或包含該載體之宿主細胞及醫藥學上可接受之載劑。相較於野生型 FVIII 蛋白質或無 VWF 片段之相應 FVIII 蛋白質，嵌合蛋白中之 FVIII 蛋白質具有延長之半衰期。在一

個實施例中，其中 FVIII 蛋白質之半衰期延長至野生型 FVIII 之半衰期的至少約 1.5 倍、至少約 2 倍、至少約 2.5 倍、至少約 3 倍、至少約 4 倍、至少約 5 倍、至少約 6 倍、至少約 7 倍、至少約 8 倍、至少約 9 倍、至少約 10 倍、至少約 11 倍或至少約 12 倍長。在另一實施例中，因子 VIII 之半衰期為至少約 17 小時、至少約 18 小時、至少約 19 小時、至少約 20 小時、至少約 21 小時、至少約 22 小時、至少約 23 小時、至少約 24 小時、至少約 25 小時、至少約 26 小時、至少約 27 小時、至少約 28 小時、至少約 29 小時、至少約 30 小時、至少約 31 小時、至少約 32 小時、至少約 33 小時、至少約 34 小時、至少約 35 小時、至少約 36 小時、至少約 48 小時、至少約 60 小時、至少約 72 小時、至少約 84 小時、至少約 96 小時或至少約 108 小時。

[0302] 在一些實施例中，組合物係藉由選自由以下組成之群之途徑投與：局部投與、眼內投與、非經腸投與、鞘內投與、硬膜下投與及經口投與。非經腸投與可為靜脈內或皮下投與。

[0303] 在其他實施例中，組合物用於治療有需要之個體之流血疾病或病狀。流血疾病或病狀係選自由以下組成之群：流血凝血病症、關節積血、肌肉流血、口腔流血、出血、向肌肉中出血、口腔出血、創傷、頭部創傷、胃腸流血、顱內出血、腹內出血、胸內出血、骨折、中樞神經系統流血、咽後間隙中流血、腹膜後間隙中流血、髂

腰肌鞘中流血及其任何組合。在其他實施例中，個體預定經歷手術。在其他實施例中，治療為預防性或按需治療。

基因療法

[0304] 本發明之其嵌合蛋白可在哺乳動物(例如人類患者)體內活體內產生，使用基因療法方法來治療流血疾病或病症將具有治療上之益處，該流血疾病或病症選自由以下組成之群：流血凝血病症、關節積血、肌肉流血、口腔流血、出血、向肌肉中出血、口腔出血、創傷、頭部創傷、胃腸流血、顱內出血、腹內出血、胸內出血、骨折、中樞神經系統流血、咽後間隙中流血、腹膜後間隙中流血及髂腰肌鞘中流血。在一個實施例中，流血疾病或病症為血友病。在另一實施例中，流血疾病或病症為 A 型血友病。此方法涉及投與可操作地連接於適合表現控制序列之適合嵌合蛋白編碼核酸。在某些實施例中，此等序列係併入病毒載體中。適用於此基因療法之病毒載體包括腺病毒載體、慢病毒載體、桿狀病毒載體、艾伯斯坦巴爾病毒載體、乳多泡病毒載體(papovaviral vector)、牛痘病毒載體、單純性疱疹病毒載體、及腺相關病毒(AAV)載體。病毒載體可為複製缺陷型病毒載體。在其他實施例中，腺病毒載體在其 E1 基因或 E3 基因中具有缺失。當使用腺病毒載體時，哺乳動物可不暴露於編碼可選擇標記基因之核酸。在其他實施例中，序列係併入熟習此項技術者已知之非病毒載體中。

使用嵌合蛋白之方法

[0305] 本發明係有關一種使用本文所述之嵌合蛋白來阻止或抑制內源性 VWF 結合 FVIII 蛋白質之方法。本發明亦係有關一種使用具有連接於 XTEN 及 Ig 恆定區或其部分之 FVIII 蛋白質之嵌合蛋白的方法。

[0306] 本發明之一個態樣係有關藉由阻斷或遮蔽 FVIII 上之 VWF 結合位點以免與內源性 VWF 結合來阻止或抑制 FVIII 與內源性 VWF 相互作用及同時使用 XTEN 序列與亦可為半衰期延長劑之 Ig 恆定區或其部分之組合來延長 FVIII 蛋白質之半衰期。在一個實施例中，本發明係有關一種構築半衰期長於野生型 FVIII 之 FVIII 蛋白質之方法。在一個實施例中，XTEN 序列抑制或阻止嵌合蛋白中之 FVIII 蛋白質與內源性 VWF 相互作用。在另一實施例中，Ig 恆定區或其部分抑制或阻止 FVIII 蛋白質與內源性 VWF 相互作用。適用於該方法中之嵌合蛋白包括本文所述之任一或多種嵌合蛋白。

[0307] 本發明之另一態樣包括一種向有需要之個體投與包含半衰期長於野生型 FVIII 之 FVIII 蛋白質之嵌合蛋白的方法，其中該方法包含向該個體投與本文所述之嵌合蛋白。

[0308] 在一個實施例中，本發明係有關一種使用 XTEN 序列及 Ig 恆定區或其部分來延長 FVIII 蛋白質及 VWF 片段之半衰期以阻止或抑制內源性 VWF 與 FVIII 蛋

白質相互作用的方法。連接於 XTEN 序列(例如 FVIII(X))且接著與 VWF 片段結合或締合之 FVIII 蛋白質受到遮蔽或保護以免遭 VWF 之清除路徑且因此相較於未結合於 VWF 片段之 FVIII 蛋白質，清除率降低。因此，相較於未與 XTEN 序列及 VWF 片段結合或締合之 FVIII 蛋白質，受遮蔽 FVIII 蛋白質之半衰期得到最大延長。在某些實施例中，與 VWF 片段締合或受 VWF 片段保護且連接於 XTEN 序列之 FVIII 蛋白質不由 VWF 清除受體清除。在其他實施例中，與 VWF 片段締合或受 VWF 片段保護且連接於 XTEN 序列之 FVIII 蛋白質自系統之清除慢於未與 VWF 片段締合或受 VWF 片段保護且連接於 XTEN 序列之 FVIII 蛋白質。

[0309] 在一個態樣中，包含連接於 XTEN 序列之 FVIII 蛋白質或與連接於 XTEN 之 VWF 片段結合或締合之 FVIII 蛋白質的嵌合蛋白自循環之清除率降低，因為 VWF 片段不含 VWF 清除受體結合位點。VWF 片段阻止或抑制與 VWF 片段結合或締合之 FVIII 經由 VWF 清除路徑自系統清除。適用於本發明之 VWF 片段亦可提供至少一或多種由內源性 VWF 提供之 VWF 樣 FVIII 保護性質。在某些實施例中，VWF 片段或 XTEN 序列亦可掩蔽一或多個 FVIII 清除受體結合位點，藉此阻止 FVIII 藉由其自身清除路徑清除。

[0310] 在一些實施例中，由 VWF 片段或 XTEN 序列阻止或抑制 FVIII 蛋白質結合內源性 VWF 可發生在活體

外或活體內。

[0311] 亦提供一種增加 FVIII 蛋白質之半衰期之方法，其包含向有需要之個體投與本文所述之嵌合蛋白。與全長 VWF 結合或締合之非活化型 FVIII 在血漿中之半衰期為約 12 至 14 小時。在循環中幾乎不存在 VWF 之 3 型 VWD 中，FVIII 之半衰期僅為約六小時，從而由於 FVIII 濃度降低而在此等患者中產生輕度至中度 A 型血友病之症狀。與本發明之 VWF 片段或 XTEN 序列連接或締合之 FVIII 蛋白質的半衰期可增加至與全長 VWF 結合或締合之非活化型 FVIII 之半衰期的至少約 1.5 倍、1.6 倍、1.7 倍、1.8 倍、1.9 倍、2.0 倍、2.1 倍、2.2 倍、2.3 倍、2.4 倍、2.6 倍、2.7 倍、2.8 倍、2.9 倍、3.0 倍、3.1 倍、3.2 倍、3.3 倍、3.4 倍、3.5 倍、3.6 倍、3.7 倍、3.8 倍、3.9 倍或 4.0 倍高。

[0312] 在一個實施例中，在包含 XTEN 序列之嵌合蛋白中與 VWF 片段連接或締合或連接於 Ig 恆定區或其部分之 FVIII 蛋白質的半衰期增加至與全長 VWF 結合或締合之非活化型 FVIII 之半衰期的至少約 2 倍、2.5 倍、3.0 倍、3.5 倍、4.0 倍、4.5 倍、5.0 倍、5.5 倍、6.0 倍、7 倍、8 倍、9 倍或 10 倍高。在另一實施例中，在包含 XTEN 序列之嵌合蛋白中與 VWF 片段或 Ig 恆定區或其部分連接或締合之 FVIII 蛋白質的半衰期增加至與全長 VWF 結合或締合之非活化型 FVIII 或野生型 FVIII 之半衰期的約 2 至約 5 倍、約 3 至約 10 倍、約 5 至約 15 倍、約 10

至約 20 倍、約 15 至約 25 倍、約 20 至約 30 倍、約 25 至約 35 倍、約 30 至約 40 倍、約 35 至約 45 倍高。在一特定實施例中，在 FVIII 及 VWF 雙重基因剔除小鼠中，在包含 XTEN 序列之嵌合蛋白中與 VWF 片段連接或締合或連接於 Ig 恆定區之 FVIII 蛋白質的半衰期增加至野生型 FVIII 之半衰期的至少約 30、31、32、33、34、35、36、37、38、39 或 40 倍高。

[0313] 在一些實施例中，包含融合於第一 Ig 恆定區或其部分(例如第一 Fc 區)及 XTEN 序列之 VWF 片段、及連接於 XTEN 序列及第二 Ig 恆定區或其部分(例如第二 Fc 區)之 FVIII 蛋白質之嵌合蛋白的半衰期長於與內源性 VWF 締合之 FVIII 之半衰期。在其他實施例中，嵌合蛋白之半衰期為野生型 FVIII 或與內源性 VWF 締合之 FVIII 蛋白質之半衰期的至少約 1.5 倍、2 倍、2.5 倍、3.5 倍、3.6 倍、3.7 倍、3.8 倍、3.9 倍、4.0 倍、4.5 倍或 5.0 倍。

[0314] 在一些實施例中，作為本發明之結果，相較於無 VWF 片段之 FVIII 蛋白質或野生型 FVIII，FVIII 蛋白質之半衰期得到延長。本發明嵌合蛋白之半衰期為無 VWF 片段之 FVIII 蛋白質或野生型 FVIII 之半衰期的至少約 1.5 倍、至少約 2 倍、至少約 2.5 倍、至少約 3 倍、至少約 4 倍、至少約 5 倍、至少約 6 倍、至少約 7 倍、至少約 8 倍、至少約 9 倍、至少約 10 倍、至少約 11 倍或至少約 12 倍長。在一個實施例中，FVIII 之半衰期為野生型 FVIII 之半衰期的約 1.5 倍至約 20 倍、約 1.5 倍至約 15

倍、或約 1.5 倍至約 10 倍長。在另一實施例中，相較於野生型 FVIII 或無 VWF 片段之 FVIII 蛋白質，FVIII 之半衰期延長至約 2 倍至約 10 倍、約 2 倍至約 9 倍、約 2 倍至約 8 倍、約 2 倍至約 7 倍、約 2 倍至約 6 倍、約 2 倍至約 5 倍、約 2 倍至約 4 倍、約 2 倍至約 3 倍、約 2.5 倍至約 10 倍、約 2.5 倍至約 9 倍、約 2.5 倍至約 8 倍、約 2.5 倍至約 7 倍、約 2.5 倍至約 6 倍、約 2.5 倍至約 5 倍、約 2.5 倍至約 4 倍、約 2.5 倍至約 3 倍、約 3 倍至約 10 倍、約 3 倍至約 9 倍、約 3 倍至約 8 倍、約 3 倍至約 7 倍、約 3 倍至約 6 倍、約 3 倍至約 5 倍、約 3 倍至約 4 倍、約 4 倍至約 6 倍、約 5 倍至約 7 倍、或約 6 倍至約 8 倍。在其他實施例中，本發明之嵌合蛋白之半衰期為至少約 17 小時、至少約 18 小時、至少約 19 小時、至少約 20 小時、至少約 21 小時、至少約 22 小時、至少約 23 小時、至少約 24 小時、至少約 25 小時、至少約 26 小時、至少約 27 小時、至少約 28 小時、至少約 29 小時、至少約 30 小時、至少約 31 小時、至少約 32 小時、至少約 33 小時、至少約 34 小時、至少約 35 小時、至少約 36 小時、至少約 48 小時、至少約 60 小時、至少約 72 小時、至少約 84 小時、至少約 96 小時或至少約 108 小時。在其他實施例中，本發明之嵌合蛋白之半衰期為約 15 小時至約兩週、約 16 小時至約一週、約 17 小時至約一週、約 18 小時至約一週、約 19 小時至約一週、約 20 小時至約一週、約 21 小時至約一週、約 22 小時至約一週、約 23 小時至約

一週、約 24 小時至約一週、約 36 小時至約一週、約 48 小時至約一週、約 60 小時至約一週、約 24 小時至約六天、約 24 小時至約五天、約 24 小時至約四天、約 24 小時至約三天、或約 24 小時至約兩天。

[0315] 在一些實施例中，每位個體中本發明嵌合蛋白之平均半衰期為約 15 小時、約 16 小時、約 17 小時、約 18 小時、約 19 小時、約 20 小時、約 21 小時、約 22 小時、約 23 小時、約 24 小時(1 天)、約 25 小時、約 26 小時、約 27 小時、約 28 小時、約 29 小時、約 30 小時、約 31 小時、約 32 小時、約 33 小時、約 34 小時、約 35 小時、約 36 小時、約 40 小時、約 44 小時、約 48 小時(2 天)、約 54 小時、約 60 小時、約 72 小時(3 天)、約 84 小時、約 96 小時(4 天)、約 108 小時、約 120 小時(5 天)、約六天、約七天(一週)、約八天、約九天、約 10 天、約 11 天、約 12 天、約 13 天或約 14 天。

[0316] 此外，本發明提供一種治療或預防流血疾病或病症之方法，其包含投與有效量之嵌合蛋白。在一個實施例中，流血疾病或病症係選自由以下組成之群：流血凝血病症、關節積血、肌肉流血、口腔流血、出血、向肌肉中出血、口腔出血、創傷、頭部創傷、胃腸流血、顱內出血、腹內出血、胸內出血、骨折、中樞神經系統流血、咽後間隙中流血、腹膜後間隙中流血及髂腰肌鞘中流血。在一特定實施例中，流血疾病或病症為 A 型血友病。

[0317] 藉由本發明製備之包含 XTEN 序列及 Ig 恆定

區或其部分與本文所述之 VWF 片段(其阻止或抑制 FVIII 蛋白質與內源性 VWF 相互作用)之組合的嵌合蛋白具有許多用途，如將由熟習此項技術者所認識到，包括(但不限於)治療患有止血病症之個體之方法及治療需要一般性止血劑之個體之方法。在一個實施例中，本發明係關於一種治療患有止血病症之個體之方法，其包含投與治療有效量之嵌合蛋白。

● [0318] 嵌合蛋白中之 FVIII 蛋白質部分藉由在帶負電荷磷脂表面上充當因子 IX 之輔因子，藉此形成 X 酶複合物來治療或預防止血病症。活化型凝血因子結合磷脂表面使此過程定位於血管損壞部位。在磷脂表面上，因子 VIIIa 使由因子 IXa 達成之因子 X 活化之最大速度增加約 200,000 倍，從而導致凝血酶產生之大規模瞬間爆發。

● [0319] 本發明之嵌合蛋白可用於治療任何止血病症。可藉由投與本發明之嵌合蛋白治療之止血病症包括(但不限於)A 型血友病以及與因子 VIII 相關之缺乏症或結構異常。在一個實施例中，止血病症為 A 型血友病。

[0320] 本發明之嵌合蛋白可預防性用於治療患有止血病症之個體。本發明之嵌合蛋白可用於治療患有止血病症之個體之急性流血事件。在另一實施例中，止血病症可為缺陷性凝結因子，例如范威爾邦德氏因子之結果。在一個實施例中，止血病症為遺傳性病。在另一實施例中，止血病症為獲得性病。獲得性病可由潛在繼發性疾病或病狀所致。無關病狀可為例如(但不作為限制)癌症、自

體免疫性疾病或妊娠。獲得性病徵可由老齡或治療潛在繼發性病徵之藥物治療(例如癌症化學療法)所致。

[0321] 本發明亦係關於治療未患先天性止血病症，但患有例如由於產生抗 FVIII 抗體或手術而導致獲得止血病症之繼發性疾病或病狀之個體的方法。因此，本發明係關於一種治療需要一般性止血劑之個體之方法，其包含投與治療有效量之藉由本發明方法製備之嵌合蛋白。

[0322] 本發明亦係關於降低 FVIII 之免疫原性或降低所誘導針對 FVIII 之免疫原性的方法，其包含投與有效量之本文所述之嵌合蛋白或編碼其之聚核苷酸。

[0323] 在一個實施例中，需要一般性止血劑之個體正經歷或即將經歷手術。本發明之嵌合蛋白可在手術之前、期間或之後作為預防性方案加以投與。本發明之嵌合蛋白可在手術之前、期間或之後投與以控制急性流血事件。

[0324] 本發明之嵌合蛋白可用於治療未患止血病症但具有急性流血事件之個體。急性流血事件可由嚴重創傷，例如手術、車禍、傷口、槍擊裂傷、或導致流血不受控制之任何其他創傷事件所致。流血事件之非限制性實例包括流血凝血病症、關節積血、肌肉流血、口腔流血、出血、向肌肉中出血、口腔出血、創傷、頭部創傷、胃腸流血、顱內出血、腹內出血、胸內出血、骨折、中樞神經系統流血、咽後間隙中流血、腹膜後間隙中流血、髂腰肌鞘中流血及其任何組合。

[0325] 在預防性應用中，將一或多種含有本發明嵌合蛋白或其混合物之組合物投與尚未處於疾病病況中之患者以增強該患者之抗性或減輕與疾病或病症相關之症狀。該種量定義為「預防有效劑量」。在治療性應用中，有時需要以相對較短時間間隔投與相對較高劑量(例如每劑約 1 至 400 mg/kg 之多肽，其中 5 至 25 mg 之劑量更通常用於放射免疫結合物且更高劑量用於細胞毒素-藥物修飾之多肽)直至疾病進展減緩或終止，及直至患者顯示疾病症狀部分或完全改善。此後，可向患者投與預防性方案。

[0326] 在一些實施例中，本發明之嵌合蛋白或組合物用於按需治療，其包括治療流血事件、關節積血、肌肉流血、口腔流血、出血、向肌肉中出血、口腔出血、創傷、頭部創傷(頭創傷)、胃腸流血、顱內出血、腹內出血、胸內出血、骨折、中樞神經系統流血、咽後間隙中流血、腹膜後間隙中流血或髂腰肌鞘中流血。個體可能需要手術預防、手術期間管理或手術治療。此等手術包括例如小手術、大手術、拔牙、扁桃體切除術、腹股溝疝切開術、滑膜切除術、全膝置換、開顱術、骨縫合術、創傷手術、顱內手術、腹內手術、胸內手術或關節置換手術。

[0327] 在一個實施例中，本發明之嵌合蛋白係靜脈內、皮下、肌肉內投與或經由任何黏膜表面投與，例如經口、舌下、經頰、經鼻、經直腸、經陰道或經由肺途徑投與。本發明之包含 VWF 片段及 FVIII 蛋白質之嵌合蛋白可植入在允許嵌合蛋白緩慢釋放至流血部位之生物聚合物

固體支撐物內或連接於該生物聚合物固體支撐物，或植入繃帶/敷料中。嵌合蛋白之劑量將視個體及所用特定投藥途徑而變化。劑量可在每公斤體重 0.1 至 100,000 μg 之範圍內。在一個實施例中，劑量範圍為 0.1-1,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。在另一實施例中，劑量範圍為 0.1-500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。蛋白質可連續或以特定時間間隔投與。可採用活體外分析來確定投藥之最佳劑量範圍及/或時程。量測凝結因子活性之活體外分析在此項技術中為已知的，例如 STA-CLOT VIIa-rTF 凝結分析或 ROTEM 凝結分析。另外，可自由動物模型(例如血友病狗)獲得之劑量-反應曲線外推出有效劑量(Mount 等人 2002, *Blood* 99(8):2670)。

[0328] 現已詳細描述了本發明，藉由參照以下實例將更清楚地瞭解本發明，該等實例係僅出於說明之目的包括於本文中且不欲限制本發明。本文中提及之所有專利、公開案及文章皆以引用的方式明確且特定地併入本文中。

實例

[0329] 除非另外陳述，否則在整篇實例中，使用以下材料及方法。

材料及方法

[0330] 一般而言，除非另外指示，否則本發明之實施採用習知化學技術、生物物理學技術、分子生物學技術、重組 DNA 技術、免疫學技術(尤其例如抗體技術)及

標準電泳技術。參見例如 Sambrook, Fritsch 及 Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) ; Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996) ; Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty 編, Irl Pr (1996) ; Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow 等人, C.S.H.L. Press, Pub. (1999) ; 及 Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel 等人編, John Wiley & Sons (1992)。

實例 1：選殖不同 VWF 域(圖 1)

(a)選殖 pSYN-VWF-002

[0331] pSYN-VWF-002 含有編碼 VWF 片段之核苷酸序列，該 VWF 片段為 SEQ ID NO: 100 之胺基酸 1-477。

[VWF-D'D3 蛋白質序列]胺基酸編號表示無肽原之成熟 VWF 序列且對應於 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764-1240。

pSYN-VWF-002 構築體在 N 末端具有允許所合成蛋白質適當分泌之 FVIII 信號肽，且隨後在 C 末端具有用於蛋白質純化之 6×His 標籤。其係藉由使用以下引子組合來合成：

ESC48-Fwd-VWF-D'D3，具有 VIII 信號及 BsiW1 位點

TCGCGACGTACGGCCGCCACCATGCAAATAGAGCTCTCC
ACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGCC
TATCCTGTCGGCCCCCATG(SEQ ID NO: 90)

ESC51-Rev-VWF D'D3(1-477 胺基酸)，具有 6His 及 Not 1 位點

TGACCTCGAGCGGCCGCTCAGTGGTGATGGTGATGATGC
GGCTCCTGGCAGGCTTCACAGGTGAGGTTGACAAC(SEQ
ID NO: 91)

[0332] 使用 2 步 PCR 擴增循環：94℃ 2 分鐘；21 個循環之(96℃ 30 秒，68℃ 2 分鐘)，用 ESC48/ESC51 引子組合及作為模板之全長 VWF 質體進行 50 μl PCR 反應。1460 bp 亮帶用凝膠萃取套組 (Qiagen, Valencia, Calif.) 進行凝膠純化且選殖至 pcDNA 4 之 BsiWI 及 NotI 限制位點中以產生 pSYN-VWF 002。

(b)選殖 pSYN-VWF-010 及 013

[0333] 使用 pSYN-VWF-008 及 pSYN-VWF-002 構築 pSYN-VWF-010。pSYN-VWF-008 在 pcDNA 3.1 中含有全長 VWF 序列(SEQ ID NO: 2 之胺基酸 1-2813)，其包括含有 763 個胺基酸之肽原(亦即 D1D2 域)，隨後為成熟 VWF 之含有剩餘 2050 個胺基酸之序列。pSYN-VWF-002 中之 FVIII 信號肽置換為來自 pSYN-VWF-008 之 D1D2 域，所得構築體為 pSYN-VWF-010。pSYN-VWF-008 具有位於 Arg907 之 BamH1 位點及位於編碼區末端(在終止密碼子之後)之 Not1 位點。pSYN-VWF-008 及 002 用 BamH1 及 Not1 限制酶消化。將來自 pSYN-VWF-002 之插入物(1026 bp)連接至經 bamH1/Not1 消化之 pSYN-VWF-008(8242 bp)中以獲得 pSYN-VWF-010(D1D2D'D3: SEQ ID NO: 2 之胺基酸 1-1240)，在 C 末端亦添加 6×His 標籤。在轉型細胞中，合成之 pSYN-VWF-010 具有肽原，但歸因於細胞內加工，分泌之產物不含任何肽原(D1D2)。由 VWF-010 獲得

之蛋白質以二聚體形式存在。

[0334] pSYN-VWF-010 用於產生 pSYN-VWF-013，pSYN-VWF-013 在對應於 SEQ ID NO: 100 之 C336A 及 C379A(胺基酸編號表示無 D1D2 域之成熟 VWF 序列-VWF 序列 2)處具有兩個點突變。預測此等突變會阻止 VWF D'D3 域之二聚化。

(c)選殖 pSYN-VWF-025 及 pSYN-VWF-029

[0335] pSYN-VWF-025 在 pLIVE 載體中含有全長 VWF 之野生型 D1D2D'D3 序列，且 pSYN-VWF-029 含有具有 C336A 及 C379A 突變之 D1D2D'D3 序列。對於選殖 pSYN-VWF-025，使用以下引子組合：

具有 Nhe1 位點之 ESC 89-fwd =

CTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCCG(SEQ ID NO: 92)

具有 Sal1 之 ESC 91-rev =

CTGGATCCCGGGAGTCGACTCGTCAGTGGTGATGGTGATGATG(SEQ ID NO: 93)

[0336] 使用 3 步 PCR 擴增循環：94℃ -2 分鐘；21 個循環之(96℃ -30 秒，55℃ -30 秒，68℃ -4 分鐘)，用 ESC89/ESC91 引子組合及作為模板之 pSYN-VWF-010(針對 pSYN-VWF-025)或 pSYN-VWF-013(針對 pSYN-VWF-029)質體進行 50 µl PCR 反應。將預期尺寸亮帶(約 3800 bp)用凝膠萃取套組(Qiagen，Valencia, Calif.)進行凝膠純化且選殖至 pLIVE-Mirus 載體(Invitrogen，Carlsbad, Calif.)之 Nhe1 及 Sal1 限制位點中以產生 pSYN-VWF-025

及 029。

(d)選殖 pSYN-VWF-031

[0337] pSYN-VWF-031 為一種

D1D2D'D3(C336A/C379A)-Fc 構築體，其在 VWF D1D2D'D3(C336A/C379A)與 Fc 序列之間具有長度為 48 個胺基酸之凝血酶可裂解連接子(8× GGGGS(SEQ ID NO 94)+凝血酶位點)。為製備此構築體，自構築體 pSYN-FVIII-064(以下稱為 FVIII-VWF 構築體)擴增 VWF-Fc 區。pSYN-FVIII-VWF 用 Xba1 及 Nhe1 消化。含有 VWF 片段及 Fc 區之 4165 bp 所得插入物區域用作藉由引子組合 LW22/LW23 擴增 VWF 及 Fc 區之模板。

LW 22-FWD-VWF-D'D3，具有 FVIII 信號序列及 BsiW1 位點
GCGCCGGCCGTACGATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCT
TCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGCCTATCCTG
TCGGCCCCCATG(SEQ ID NO: 95)

LW 23-Rev-Fc，具有終止密碼子及 Not1 位點

TCATCAATGTATCTTATCATGTCTGAATTCGCGGCCGCT
CATTTACC(SEQ ID NO:96)

[0338] 將由 LW22/LW23 擴增獲得之 PCR 產物(約 2300 bp)選殖於經 BsiW1/Not1 消化之 pSYN-VWF-002 中以獲得 pSYN-VWF-014 中間物。pSYN-VWF-014 依次含有 FVIII 信號肽-D'D3-含 20 個胺基酸之凝血酶可裂解連接子及 Fc 區。

[0339] 為產生 D1D2D'D3-Fc 構築體，使用引子組合

LW24/LW27 藉由標準 PCR 方法自 pSYN-VWF-013 擴增 D1D2D'D3 區。

LW24-Fwd-VWF D1D2D'D3 選殖寡聚物，具有 BsiW1 位點

GCGCCGGCCGTACGATGATTCCTGCCAGATTTGCCGGGGTG (SEQ ID NO:97)

LW27-Rev-VWF D'D3 寡聚物，具有 EcoRV

CCACCGCCAGATATCGGCTCCTGGCAGGCTTCACAGGTGAG (SEQ ID NO:98)

[0340] 將由 LW22/LW23 擴增獲得之 PCR 產物(約 3750 bp)選殖於經 BsiW1/EcoRV 消化之 pSYN-VWF-014 中以獲得 pSYN-VWF-015 中間物。改變 VWF 片段與 Fc 區之間的連接子長度以獲得 pSYN-VWF-031。

VWF-D1D2D'D3 蛋白質序列 1(SEQ ID NO: 99)

1	MIPARFAGVL	LALALILPGT	LCAEGTRGRS	STARCSLFGS	DFVNTFDGSM
51	YSFAGYCSYL	LAGGCQKRSF	SIIGDFQNGK	RVSLSVYLGE	FFDIHLFVNG
101	TVTQGDQRV	MPYASKGLYL	ETEAGYYKLS	GEAYGFVARI	DGSGNFQVLL
151	SDRYFNKTCG	LCGNFNIFAE	DDFMTQEGTL	TSDPYDFANS	WALSSGEQWC
201	ERASPPSSSC	NISSGEMQKG	LWEQCQLLKS	TSVFARCHPL	VDPEPFVALC
251	EKTLCECAGG	LECACPALLE	YARTCAQEGM	VLYGWTDHSA	CSPVCPAGME
301	YRQCVSPCAR	TCQSLHINEM	CQERCVDGCS	CPEGQLLDEG	LCVESTECPC
351	VHSGKRYPPG	TSLSRDCNTC	ICRNSQWICS	NEECPGECLV	TGQSHFKSFD
401	NRYFTFSGIC	QYLLARDCQD	HSFSIVIETV	QCADDRDAVC	TRSVTVRLPG
451	LHNSLVKLKH	GAGVAMDGQD	IQLPLLKGD	RIQHTVTASV	RLSYGEDLQM
501	DWDGRGRLLV	KLSPVYAGKT	CGLCGNYNGN	QGDDFLTPSG	LAEPRVEDFG
551	NAWKLHGDCQ	DLQKQHS DPC	ALNPRMTRFS	EEACAVLTSP	TFEACHRAVS
601	PLPYLRNCRY	DVCSCSDGRE	CLCGALASYA	AACAGRGVRV	AWREPGRCCL
651	NCPKGQVYLQ	CGTPCNLTCT	SLSYPDEECN	EACLEGCFCP	PGLYMDERGD
701	CVPKACQPCY	YDGEIFQPED	IFSDHHTMCY	CEDGFMHCTM	SGVPGSLLPD
751	AVLSSPLSHR	SKRSLSCRPP	MVKLVCPADN	LRAEGLECTK	TCQNYDLECM
801	SMGCVSGCLC	PPGMVRHENR	CVALERCPCF	HQKKEYAPGE	TVKIGCNTCV
851	CRDRKWNCTD	HVCDATCSTI	GMAHYLTFDG	LKYLFPGECQ	YVLVQDYCGS
901	NPGETFRILVG	NKGCSHPSVK	CKKRVITLVE	GGEIELFDGE	VNVKRPMDKE
951	THFEVVESGR	YIILLGKAL	SVVWDRHLSI	SVVLKQTYQE	KVCGLCGNFD
1001	GIQNNDLTSS	NLQVEEDPVD	FGNSWKVSSQ	CADTRKVPLD	SSPATCHNNI
1051	MKQTMVDSSC	RILTSDVFQD	CNKLVDPEPY	LDVCIYDTCS	CESIGDCACF
1101	CDTIAAYAHV	CAQHGVVVTW	RTATLCPQSC	EERNLRENGY	ECEWRYNSCA
1151	PACQVTCQHP	EPLACPVCV	EGCHAHCPPG	KILDELLQTC	VPEDCPVCE
1201	VAGRRFASGK	KVTLNPSDPE	HCQICHCDVV	NLTCEACQEP*	

VWF-D1D2D'D3 蛋白質序列 2(SEQ ID NO: 100)

```

1    SLSCRPPMVK LVCPADNLRA EGLECTKTCQ NYDLECMMSG CVSGCLCPPG
51   MVRHENRCVA LERCPCFHQG KEYAPGETVK IGCNTCVCRD RKWNCTDHVC
101  DATCSTIGMA HYLTFDGLKY LFPGECQYVL VQDYCGSNPG TFRILVGNKG
151  CSHPSVKCKK RVTILVEGGE IELFDGEVNV KRPMKDETHF EVVESGRYII
201  LLLGKALSVV WDRHLSISVV LKQTYQEKVC GLCGNFDGIQ NNDLTSSNLQ
251  VEEDPVDFGN SWKVSSQCAD TRKVPLDSSP ATCHNNIMKQ TMVDSSCRIL
301  TSDVFQDCNK LVDPEPYLDV CIYDTCSCES IGDCACFCDT IAAYAHVCAQ
351  HGKVVWTRTA TLCPQSCEER NLRENGYECE WRYNSCAPAC QVTCQHPEPL
401  ACPVQCVEGC HAHCPPGKIL DELLQTCVDP EDCPVCEVAG RRFASGKKVT
451  LNPSDPEHCQ ICHCDVVNLT CEACQEP
    
```

實例 2：D'D3 及 XTEN 融合體對 FVIII 半衰期延長之影響

[0341] 為評估 D'D3 延長 rFVIII-XTEN 融合蛋白之 FVIII 半衰期之潛力，藉由流體動力學注射 VWF D'D3 二聚體之相應 DNA 構築體 VWF-025(實例 1)來將該 VWF D'D3 二聚體引入 FVIII-VWF DKO 小鼠體內。在 D'D3 已達到穩態表現(注射後第 5 天)之後，藉由靜脈內注射以 200 IU/kg 劑量投與單次劑量之 rFVIII-XTEN。收集血液樣品直至 rFVIII-XTEN 給藥後 120 小時。藉由 FVIII 顯色分析來分析血漿 FVIII 活性。藉由 VWF ELISA 量測 D'D3 表現量，且使用 WinNonlin 程式分析 rFVIIIIfc PK 概況。

[0342] 研究結果展示於圖 2 中，且有/無 D'D3 之 rFVIII-XTEN 在循環中之 PK 參數列於表 16 中。D'D3 二聚體進一步使 rFVIII-XTEN $t_{1/2}$ 自 3.4 小時延長至 17.8 小時，增加 5 倍。除半衰期之外，亦觀測到 MRT 增加 5 倍，AUC 增加 3.6 倍，清除率降低 3.8 倍。

[0343] 吾人已觀測到 D'D3 片段及 XTEN 技術之協同效應，將在血友病動物中評估一系列 FVIII/VWF/XTEN 構

築體延長 FVIII 半衰期之潛力。

表16：有/無D'D3之rFVIII-XTEN在血液循環中之PK參數

治療劑	5分鐘回收率(%)	t _{1/2} (小時)	MRT (小時)	Cl (mL/hr/kg)	V _{ss} (mL/kg)	AUC_D (hr*kg*mIU/ mL/mIU)
rFVIIIXTEN VWF-025	80	17.8	19.3	3.5	67.4	0.29
rFVIIIXTEN	74	3.4	3.8	13.1	63.68	0.08
改良倍數	1.1	5.2	5.1	3.8	0.9	3.6

FVIII-XTEN之蛋白質純化

FVIII-XTEN 之蛋白質純化

[0344] 將 AE288 XTEN 插入在 BDD-FVIII 之 C 末端以進行此研究。為純化此蛋白質，首先使用切向流過濾 (TFF)步驟對條件培養基進行緩衝液交換。接著使用強陰離子交換層析捕捉濾液中之產物，並接著使用親和層析進一步純化。根據 HPLC-SEC，分子之純度為可接受的且藉由西方墨點術進一步確認。如藉由 aPTT 分析及 ELISA 所量測，分子之比活性與 B 域缺失之 FVIII 類似。

FVIII 顯色分析

[0345] 使用來自 DiaPharma 之 COATEST SP FVIII 套組(批號 N089019)量測 FVIII 活性且所有培育皆在振盪下於 37℃ 板式加熱器上進行。

[0346] rFVIII 標準範圍為 100 mIU/mL 至 0.78 mIU/mL。將匯合之正常人類血漿分析對照及血漿樣品(用 1× Coatest 緩衝液稀釋)一式兩份添加至 Immulon 2HB 96

孔盤中 (25 μ L/孔)。新鮮製備之 IXa/FX/磷脂混合物 (50 μ L)、25 μ L 25 mM CaCl₂ 及 50 μ L FXa 受質依序添加至各孔中，在各次添加之間培育 5 分鐘。在與受質一起培育之後，添加 25 μ L 20% 乙酸以終止顯色反應，且用 SpectraMAX plus(Molecular Devices)儀器量測 OD₄₀₅ 之吸光度。用 SoftMax Pro 軟體(第 5.2 版)分析資料。最低定量含量(LLOQ)為 7.8 mIU/mL。

VWF ELISA：

[0347] 使用 0.5 μ g/孔之山羊抗人類 VWF 抗體(經親和純化，affinity biological，GAVWF-AP)作為捕捉抗體且使用 VWF-EIA-D(Affinity Biologicals，VWF-EIA-D，1:100 稀釋)作為 VWF ELISA 之偵測抗體。遵循標準 ELISA 程序進行 ELISA 分析，使用 TMB 作為 HRP 受質，使用 PBST/1.5% BSA/0.5 M NaCl 緩衝液作為阻斷及結合緩衝液。分析標準範圍為 100 ng 至 0.78 ng，且分析之定量下限(LLOQ)為 7.8 ng/mL。

實例 3：含有 XTEN 之 FVIII/VWF 構築體之質體構築

(a)選殖 pSYN-FVIII-161(圖 3)

[0348] FVIII-161 質體包含具有在於細胞中合成期間加工之酶裂解位點之單鏈 FC(scFc)骨架。該構築體具有全長 VWF 之 FVIII 結合域(D'D3)。

[0349] 質體(pSYN-FVIII-161)設計成用於表現 FVIII-Fc 及 VWF-Fc 雜二聚體，其中 D'D3 域結合 FVIII 且阻止

FVIII 與磷脂及活化型蛋白質 C 相互作用。由 pSYN-FVIII-161 獲得之蛋白質在細胞中表現為單一多肽，其中 FVIII-Fc 次單元之 C 末端藉由 6×(GGGGS)多肽連接子 (SEQ ID NO: 64)連接於 VWF D'D3-Fc 次單元之 N 末端。此外，RRRRS(SEQ ID NO: 11)及 RKRRKR(SEQ ID NO: 10)序列分別插入在多肽連接子之 5'末端及 3'末端以便由前蛋白轉化酶在各序列之末位 Arg 之後進行細胞內裂解。因此，細胞可表現雙鏈 FVIII-Fc/D'D3-Fc 雜二聚體，其中 FVIII-Fc 鏈在 C 末端具有 RRRRS 序列(SEQ ID NO: 11)，但連接子序列之其餘部分已移除。將之後緊接有 IS{5×(GGGGS)}LVPRGSGG(SEQ ID NO: 122)多肽(含有凝血酶裂解位點)之 AE288 XTEN 片段引入在 VWF 域與 Fc 區之間以促進 FVIII-VWF 雜二聚蛋白質由凝血酶活化後自 FVIII 釋放 VWF 片段，從而允許 FVIII 與其他凝結因子相互作用。

[0350] pSYN-FVIII-161(SEQ ID NO: 101)。蛋白質序列(FVIII 序列胺基酸位置 1-1457；加下劃線區域表示 Fc 區；曲線下劃線表示第一 Fc 與 VWF 片段之間的可裂解連接子；加雙下劃線區域表示 VWF 片段；粗體區域表示 VWF 片段與 Fc 之間的可裂解連接子。

1	MQIELSTCFF	LCLLRFCFSA	TRRYYLGAWE	LSWDYMQSDL	GELPVDARFP
51	PRVPKSFPPN	TSVVYKKTLE	VEFTDHLFNI	AKPRPPWMGL	LGPTIQAEVY
101	DTVVITLKNM	ASHPVSLHAV	GVSYWKASEG	AEYDDQTSQR	EKEDDKVFPG
151	GSHTYVWQVL	KENGPMASDP	LCLTYSYLSH	VDLVKDLNSG	LIGALLVCRE
201	GSLAKEKTQT	LHKFILLFAV	FDEGKSWHSE	TKNSLMQDRD	AASARAWPKM
251	HTVNGYVNRS	LPGLIGCHRK	SVYWHVIGMG	TTPEVHSIFL	EGHTFLVRNH
301	RQASLEISPI	TFLTAQTLLM	DLGQFLLFCH	ISSHQHDGME	AYVKVDSCPE
351	EPQLRMKNNE	EAEDYDDDLT	DSEMDVVRFD	DDNSPSFIQI	RSVAKKHPKT
401	WVHYIAAEEE	DWDYAPLVLA	PDDRSYKSQY	LNNGPQRIGR	KYKKVRFMAY
451	TDETFTKREA	IQHESGILGP	LLYGEVGDIT	LIIFKNQASR	PYNIYPHGIT
501	DVRPLYSRRL	PKGKVKHLKDF	PILPGEIFKY	KWTVTVEDGP	TKSDPRCLTR
551	YSSSFVNMER	DLASGLIGPL	LICYKESVDQ	RGNQIMSDKR	NVILFSVFDE
601	NRSWYL TENI	QRFLPNPAGV	QLEDPEFQAS	NIMHSINGYV	FDSLQLSVCL
651	HEVAYWYILS	IGAQTDFLSV	FFSGYTFFKH	MYEDTLTLF	PFSGETVFMS
701	MENPGLWILG	CHNSDFRNRG	MTALLKVSSC	DKNTGDYD	SYEDISAYLL
751	SKNNAIEPRS	FSQNPVPLKR	HQREITRTTL	QSDQEEIDYD	DTISVEMKKE
801	DFDIYDEDEN	QSPRSFQKKT	RHYFIAAVER	LWDYGMSSSP	HVLRNRAQSG
851	SVPPQFKKVV	QEFTDGSFTQ	PLYRGELNEH	LGLLGPYIRA	EVEDNIMVTF
901	RNQASRPYSF	YSSLISYEED	QRQGAEPKRN	FVKPNETKTY	FWKVQHMAP
951	TKDEFDCKAW	AYFSDVDLEK	DVHSGLIGPL	LVCHTNTLNP	AHGRQVTVQE
1001	FALFFTIFDE	TKSWYFTENM	ERNCRAPCNI	QMEDPTFKEN	YRFHAINGYI
1051	MDTLPGLVMA	QDQIRIRWYLL	SMGSNENIHS	IHFSGHVFTV	RKKEEYKMAL
1101	YNLYPGVFET	VEMLPSKAGI	WRVECLIGEH	LHAGMSTLFL	VYSNKCQTPL
1151	GMASGHIRDF	QITASGQYQG	WAPKLARLHY	SGSINAWSTK	EPFSWIKVDL
1201	LAPMIIHGKI	TQGARQKFSS	LYISQFIIMY	SLDGKKWQTY	RGNSTGTLMV
1251	FFGNVDSSGI	KHNIFNPPII	ARYIRLHPTH	YSIRSTLRME	LMGCDLNSCS
1301	MPLGMESKAI	SDAQITASSY	FTNMFATWSP	SKARLHLQGR	SNAWRPQVNN
1351	PKEWLQVDFQ	KTMKVTGVTT	QGVKSLLTSM	YVKEFLISS	QDGHQWTLFF
1401	QNGKVKVFQG	NQDSFTPVVN	SLDPPLLTRY	LRIHPQSWVH	QIALRMEVLG
1451	CBAQDLYDKT	HTCPPCPAPE	LLGGPSVFLF	PPKPKDTLMI	SRTPEVTCVV
1501	VDVSHEDPEV	KFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	EQYNSTYRVV	SVLTVLHQDW
1551	LNGKEYKCKV	SNKALPAPIE	KTISKAKGQP	REPQVYTLPP	SRDELTKNQV
1601	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT	TPPVLDSDGS	FFLYSKLTVD
1651	KSRWQQGNVF	SCSVMHEALH	NHYTQKSLSL	SPGKRRRRSG	GGGSGGGGSG
1701	GGGSGGGGSG	GGGSGGGGSR	KRRKRSLSR	PPMVKLVCAP	DNLRAEGLEC
1751	TKTCQNYDLE	CMSMGCVSGC	LCPPGMVRHE	NRCVALERCP	CFHOGKEYAP
1801	GETVKIGCNT	CVCRRDRKWC	TDHVCDATCS	TIGMAHYLTF	DGLKYLFPGE
1851	CQYVLVQDYC	GSNPGTFRIL	VGNKGCSPHS	VKCKKRVTL	VEGGEIELFD
1901	GEVNVKRPKM	DETHFEVVES	GRYIILLGK	ALSVVWDRHL	SISVVLKQTY
1951	QEKVCGLCGN	FDGIQNNDLT	SSNLQVEEDP	VDFGNSWKVS	SQCADTRKVP
2001	LDSSPATCHN	NIMKQTMVDS	SCRILTSDFV	QDCNKLVDPE	PYLDVCIYDT
2051	CSCESIGDCA	AFCDTIAAAY	HVCAQHGKVV	TWRTATLCPO	SCEERNLREN
2101	GYAEWRYNS	CAPACQVTCQ	HPEPLACPVQ	CVEGCHAHCP	PGKILDELLQ
2151	TCVDPEDCPV	CEVAGRRFAS	GKKVTLNPSD	PEHCQICHCD	VVNLTCACQ
2201	EPISGTSESA	TPESGPGSEP	ATSGSETPGT	SESATPESGP	GSEPATSGSE
2251	TPGTSESATP	ESGPGTSTEP	SEGSAPGSPA	GSPTSTEEGT	SESATPESGP
2301	GSEPATSGSE	TPGTSESATP	ESGPGSPAGS	PTSTEEGSPA	GSPTSTEEGT
2351	STEPSEGSAP	GTSSESATPES	GPGTSESATP	ESGPGTSESA	TPESGPGSEP
2401	ATSGSETPGS	EPATSGSETP	GSPAGSPTST	EEGTSTEPSE	GSAPGTSTEP
2451	SEGSAPGSEP	ATSGSETPGT	SESATPESGP	GTSTEPSEGS	APDSGGGGSG
2501	GGGSGGGGSG	GGGSGGGGSL	VPRGSGGDKT	HTCPPCPAPE	LLGGPSVFLF
2551	PPKPKDTLMI	SRTPEVTCVV	VDVSHEDPEV	KFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE
2601	EQYNSTYRVV	SVLTVLHQDW	LNGKEYKCKV	SNKALPAPIE	KTISKAKGQP
2651	REPQVYTLPP	SRDELTKNQV	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT
2701	TPPVLDSDGS	FFLYSKLTVD	KSRWQQGNVF	SCSVMHEALH	NHYTQKSLSL
2751	SPGK				

(b)選殖 pSYN-FVIII-168、175、172 及 174(圖 4A-

4D)

[0351] pSYN-FVIII-168、172、174 及 175 為 pSYN-FVIII-161 之衍生物。將 R1645A/R1648A 突變引入 pSYN-FVIII-161 中以形成產生 SC-FVIII 同功異型物之 pSYN-FVIII-168，且使 AE288 XTEN 直接融合至 FVIII-HC 之 C 末端中以進一步延長半衰期。為構築 pSYN-FVIII-175，自 pSYN-FVIII-168 移除 D'D3 密碼子序列以便評估 Fc 及 XTEN 技術對 FVIII 半衰期延長之影響。

[0352] 為構築 pSYN-FVIII-172，使 AE288 XTEN 片段直接融合至 FVIII-HC 之 C 末端中以進一步延長半衰期，且自 pSYN-FVIII-172 移除 D'D3 密碼子序列以形成 pSYN-FVIII-174 來用於評估 Fc 及 XTEN 技術對 FVIII 半衰期延長之影響。

(c)選殖 pSYN-FVIII-170(圖 4E)

[0353] 構築 pSYN-FVIII-170 以評估 XTEN 及 D'D3 片段對 FVIII 半衰期延長之影響。將密碼子序列 VWF-D1D2D'D3 片段及 BDD-FVIII 引入表現卡匣之 5'末端及 3'末端，使用之後接有 35 aa 凝血酶可裂解連接子之 AE288 XTEN 密碼子序列來連接 VWF 與 FVIII 分子。在細胞內加工之後，分泌之蛋白質包含含有成熟 VWF 分子之 D'D3 片段之多肽，該 D'D3 片段藉由 AE288 XTEN/35 aa 凝血酶可裂解連接子連接於成熟 BDD-FVIII 之 N 末端。

pSYN-FVIII-170蛋白質序列(SEQ ID NO: 102)

1	SLSCRPPMVK	LVCPADNLRA	EGLECTKTCQ	NYDLECMMSG	CVSGCLCPPG
51	MVRHENRCVA	LERPCFHHQ	KEYAPGETVK	IGCNTCVCRD	RKWNCTDHVC
101	DATCSTIGMA	HYLTFDGLKY	LFPGECQYVL	VQDYCGSNPG	TFRILVGNKG
151	CSHPSVKCKK	RVTILVEGGE	IELFDGEVNV	KRPMKDETHF	EVVESGRYII
201	LLLKGKALS	VWDRHLSISV	LKQTYQEKVC	GLCGNFDGIQ	NNDLTSSNLQ
251	VEEDPVDFGN	SWKVSSQCAD	TRKVPLDSSP	ATCHNNIMKQ	TMVDSSCRIL
301	TSDVFQDCNK	LVDPEPYLDV	CIYDTCSCES	IGDCAAFCDT	IAAYAHVCAQ
351	HGKVVTWRTA	TLCPCQSCEER	NLRENGYEAE	WRYNSCAPAC	QVTCQHPEPL
401	ACPVQCVEGC	HAHCPPGKIL	DELLQTCVDP	EDCPVCEVAG	RRFASGKKVT
451	LNPSPDEHCQ	ICHCDVVNLT	CEACQEPISG	TSESATPESG	PGSEPATSGS
501	ETPGTSESAT	PESGPGSEPA	TSGSETPGTS	ESATPESGPG	TSTEPSEGSA
551	PGSPAGSPTS	TEEGTSESAT	PESGPGSEPA	TSGSETPGTS	ESATPESGPG
601	SPAGSPTSTE	EGSPAGSPTS	TEEGTSTEPS	EGSAPGTSES	ATPESGPGTS
651	ESATPESGPG	TSESATPESG	PGSEPATSGS	ETPGSEPATS	GSETPGSPAG
701	SPTSTEEGTS	TEPSEGSAPG	TSTEPSEGSA	PGSEPATSGS	ETPGTSESAT
751	PESGPGTSTE	PSEGSAPDSG	GGSGGGGGSG	GGSGGGGGSG	GGGSLVPRGS
801	GGASATRRYY	LGAVELSWDY	MQSDLGELPV	DARFPFPRVPK	SFPFNTSVVY
851	KKTLFVEFTD	HLFNIAPKRP	PWMGLLGPTI	QAEVYDTVVI	TLKNMASHPV
901	SLHAVGVSYW	KASEGAEYDD	QTSQREKEDD	KVFPGGSHTY	VWQVLKENG
951	MASDPLCLTY	SYLSHVDLVK	DLNSGLIGAL	LVCREGSLAK	EKTQTLHKFI
1001	LLFAVFDEGK	SWHSETKNSL	MQDRDAASAR	AWPKMHTVNG	YVNRSLPGLI
1051	GCHRRKSVYWH	VIGMGTTEPEV	HSIFLEGHTF	LVRNHRQASL	EISPTITFLTA
1101	QTLTLLMDLQ	LLFCHISSHQ	HDGMEAYVKV	DSCPEEPQLR	MKNNEEAEDY
1151	DDDLTDSEMD	VVRFDDDNSP	SFIQIRSVAK	KHPKTWVHYI	AAEEEDWDYA
1201	PLVLAPDDRS	YKSQYLNNGP	QRIGRKYKKV	RFMAYTDETF	KTREAIQHES
1251	GILGPLLYGE	VGDTLLIIFK	NQASRPYNIY	PHGITDVRPL	YSRRLPKGVK
1301	HLKDFPILPG	EIFKYKWTVT	VEDGPTKSDP	RCLTRYYSF	VNMERDLASG
1351	LIGPLLICYP	ESVDQQRNQI	MSDKRNVILF	SVFDENRSWY	LTENIQRFPL
1401	NPAGVQLEDP	EFQASNIMHS	INGYVFDLSQ	LSVCLHEVAY	WYILSIGAQT
1451	DFLSVFFSGY	TFKHKMYVED	TLTLFPFSGE	TVFMSMENPG	LWILGCHNSD
1501	FRNRGMTALL	KVSSCDKNTG	DYYEDSYEDI	SAYLLSKNNA	IEPRSFSSQNP
1551	PVLKRHQREI	TRTTLQSDQE	EIDYDDTISV	EMKKEDFDIY	DEDENQSPRS
1601	FQKKTRHYFI	AAVERLWDYG	MSSSPHVLRN	RAQSGSVPPQ	KKVVFQFETD
1651	GSFTQPLYRG	ELNEHLGLLG	PYIRAEVEDN	IMVTFRNQAS	RPYSFYSSLI
1701	SYEEDQRQGA	EPRKNFVKPN	ETKTYFWKVQ	HMAPTKDEF	DKAWAYFSD
1751	VDLEKDVHSG	LIGPLLVCNT	NTLNPAHGRQ	VTVQEFALFF	TIFDETKSWY
1801	FTENMERNCR	APCNIQMEDP	TFKENYRFHA	INGYIMDTLP	GLVMAQDQRI
1851	RWYLLSMGSN	ENIHSIHFSG	HVFTVRKKEE	YKMALYNLYP	GVFETVEMLP
1901	SKAGIWRVEC	LIGEHLHAGM	STLFLVYSNK	CQTPLGMASG	HIRDFQITAS
1951	GQYGQWAPKL	ARLHYSGSIN	AWSTKEPFSW	IKVDLLAPMI	IHGKIQGAR
2001	QKFSSLYISQ	FIIMYSLDGK	KWQTYRGNST	GTLMVFFGNV	DSSGIKHNI
2051	NPPIIARYIR	LHPHTYSIRS	TLRMELMGCD	LNSCSMPLGM	ESKAISDAQI
2101	TASSYFTNMF	ATWSPSKARL	HLQGRSNAWR	PQVNNPKEWL	QVDFQKTMKV
2151	TGVTTQGVKS	LLTSMYVKEF	LISSSQDGHQ	WTLFFQNGKV	KVFQGNQDSF
2201	TPVVNSLDPP	LLTRYLRIHP	QSWVHQIALR	MEVLGCEAQD	LY

實例 4：在 FVIII 及 VWF 缺乏小鼠中流體動力學注射含有 XTEN 之 FVIIIIF/VWF 構築體

[0354] 圖 3 及 4 中含有 XTEN 之 DNA 構築體已將 2-3 個半衰期延長元件組合在一起。為評估其 FVIII 半衰期延長潛力，藉由在每只小鼠 100 μg 之劑量下進行流體動

力學注射(HDI)來將圖 3 及圖 4 中之一組所選 DNA 構築體引入 FVIII/VWF 雙重基因剔除(DKO)小鼠中。接著藉由眶後血液收集法在 HDI 後 24 小時收集血液樣品。藉由 FVIII 顯色分析來分析 HDI 後血漿 FVIII 活性，且結果列於表 17 及圖 5 中。相較於野生型 BDD-FVIII，所有含有 XTEN 之 DNA 構築體皆在 HDI 後 24 小時產生顯著較高的 FVIII 血漿活性，從而指示相應分子之循環蛋白質半衰期顯著長於 BDD-FVIII。在血友病動物中進一步評估彼等半衰期延長元件之組合之應用。

表17：在FVIII/VWF DKO小鼠中HDI後24小時之FVIII血漿活性

DNA 構築體	BDD- FVIII	FVIII-161	FVIII-168	FVIII-172	BDD- FVIII	FVIII- 170
DNA劑量 (μg/ 小鼠)	100	100	100	100	50	50
FVIII 活性 (mU/mL)	219±72	2446±1012	2209±609	1671±223	197±21	399±30

流體動力學注射：

[0355] 流體動力學注射為一種在諸如小鼠及大鼠之小動物中高效且安全地向肝傳遞非病毒基因之方法。其最初被描述為在約 5-7 秒內在動物體重之十分之一體積下快速注射不含內毒素之裸質體 DNA/生理食鹽水溶液。裸質體 DNA 含有相關基因且肝產生於動物體重之十分之一體積中。目標蛋白質在肝中由所注射 DNA 產生且可在注射後 24 小時內偵測到。接著收集血漿樣品以研究所表現蛋白質之治療性質。

[0356] 對於本文進行之所有流體動力學注射，在約 4-7 秒內經由靜脈內尾靜脈注射將 2 ml 含質體 DNA 之 0.9%無菌生理食鹽水溶液傳遞至體重為 20-35 公克之小鼠體內。持續前 2 小時密切監測小鼠直至恢復正常活動。在經由眶後血液收集法收集血液樣品之後，接著獲得血漿樣品且儲存在 -80℃ 下以供進一步分析。

實例 5：含有 XTEN 插入之 FVIII-Fc-VWF 雜二聚體之共轉染系統之質體構築(圖 6)

[0357] 為增加蛋白質生產產量，產生兩個用於蛋白質產生之共轉染系統，其含有三種 DNA 構築體。第一 DNA 構築體編碼 FVIII-Fc 融合蛋白，其中 AE288 XTEN 片段直接融合於 FVIII 重鏈之 C 末端且之後接有野生型 FVIII 輕鏈片段 (pSYN-FVIII-173，圖 6B) 或具有 R1645A/R1648A 突變之 FVIII 輕鏈片段 (pSYN-FVIII-169，圖 6A)，接著使 FVIII 輕鏈直接融合於單一 Fc 片段。第二 DNA 構築體為編碼 D'D3-Fc 融合蛋白之 pSYN-VWF-031(實例 1)。HEK293F 細胞用該兩種質體連同第三質體(PC5)一起以 80:15:5 比率轉染。合成之蛋白質分泌為 FVIII (XTEN) Fc/D'D3Fc 雜二聚體及 D'D3Fc 二聚體且藉由蛋白質純化使 FVIII (XTEN) Fc/D'D3Fc 雜二聚體與 D'D3Fc 二聚體分離。

pSYN-FVIII-169成熟蛋白質序列(SEQ ID NO: 103) :

```

1   ATRRYYLGA V ELSWDYMQSD LGELPVDARF PPRVPKSFPP NTSVVYKRTL
51  FVEFTDHLFN IAKPRPPWMG LLGPTIQAEV YDTVVITLKN MASHPVSLHA
101 VGVSYWKASE GA EYDDQTSQ REKEDDKVFP GGSHTYVWQV LKENGPMASD
151 PLCLTYSYLS HVDLVKDLNS GLIGALLVCR EGSLAKEKTQ TLHKFILLFA
201 VFDEGKSWHS ETKNSLMQDR DAASARAWPK MHTVNGYVNR SLPGLIGCHR
251 KSVYWHVIGM GTTPEVHSIF LEGHTFLVRN HRQASLEISP ITFLTAQTLL
301 MDLGQFLLCF HISSHQHDGM EAYVKVDSCP EEPQLRMKNN EEAEDYDDDL
351 TDSEMDVVRF DDDNSPSFIQ IRSVAKKHPK TWVHYIAAEE EDWDYAPLVL
401 APDDRSYKSQ YLNNGPQRIG RKYKKVRFMA YTDETFKTRE AIQHESGILG
451 PLLYGEVGD T LLIIFKNQAS RPYNIYPHGI TDVRPLYSR R LPKGVKHLKD
501 FPILPGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYYSFVNME RDLASGLIGP
551 LLICYKESVD QRGNQIMSDK RNVILFSVFD ENRSWYL T EN IQRFLPNPAG
601 VQLEDPEFQA SNIMHSINGY VFDSLQLSVC LHEVAYWYIL SIGAQTDFLS
651 VFFSGYTFKH KMYEDTLTL PFFSGETVFM SMENPGLWIL GCHNSDFRNR
701 GMTALLKVSS CDKNTGDYYE DSYEDISAYL LSKNNAIEPR SFSQNGAPGT
751 SESATPESGP GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPGTSE
801 SATPESGPGT STEPSEGSAP GSPAGSPTST EEGTSESATP ESGPGSEPAT
851 SGSETPGTSE SATPESGPGS PAGSPTSTEE GSPAGSPTST EEGTSTEPSE
901 GSAPGTSESA TPESGPGTSE SATPESGPGT SESATPESGP GSEPATSGSE
951 TPGSEPATSG SETPGSPAGS PTSTEEGTST EPSEGSAPGT STEPSEGSAP
1001 GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGTSTEP SEGSA PASSP PVLKRHQAEI
1051 TRTTLQSDQE EIDYDDTISV EMKKEDFDIY DEDENQSPRS FQKKTRHYFI
1101 AAVERLWDYG MSSSPHVL RN RAQSGSVPQF KKVVFQEFTD GSFTQPLYRG
1151 ELNEHLGLLG PYIRAEVEDN IMVTFRNQAS RPYSFYSSLI SYEEDQRQGA
1201 EPRKNFVKPN ETKTYFWKVQ HHMAPTKDEF DCKAWAYFSD VDLEKDVHSG
1251 LIGPLLVCHT NTLNPAHGRQ VTVQEFALFF TIFDETKSWY FTENMERNCR
1301 APCNIQMEDP TFKENYRFHA INGYIMDTLP GLVMAQDQRI RWYLLSMGSN
1351 ENIHSIHFSG HVFTVRKKEE YKMALYNLYP GV FETVEMLP SKAGIWRVEC
1401 LIGEHLHAGM STLFLVYSNK CQTPLGMASG HIRDFQITAS GQYQGWAPKL
1451 ARLHYSGSIN AWSTKEPFSW IKVDLLAPMI IHGIKTQGAR QKFSSLYISQ
1501 FIIMYSLDGK KWQTYRGNST GTLMVFFGNV DSSGIKHNIF NPPIIARYIR
1551 LHPHTYSIRS TLRMELMGCD LNCSMPLGM ESKAISDAQI TASSYFTNMF
1601 ATWSPSKARL HLQGRSNAWR PQVNNPKEWL QVDFQKTMKV TGVTTQGVKS
1651 LLTSMYVKEF LISSSQDGHQ WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF TPVVNSLDPP
1701 LLTRYLRIHP QSWVHQIALR MEVLGCEAQD LYDKTHTCPP CPAPELLGGP
1751 SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK
1801 TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
1851 AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
1901 NNYKTPPV L DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFS CSVM HEALHNHYTQ
1951 KSLSLSPGK

```

pSYN-FVIII-173成熟蛋白質序列(SEQ ID NO: 104) :

```

1   ATRRYYLGAVALSWDYMQSD LGELPVDARF PPRVPKSFPP NTSVVYKKTLL
51  FVEFTDHLFN IAKPRPPWMG LLGPTIQAEV YDTVVITLKN MASHPVSLHA
101 VGVSYWKASE GAEYDDQTSQ REKEDDKVFP GGSHTYVWQV LKENGPMASD
151 PLCLTYSYLS HVDLVKDLNS GLIGALLVCR EGSLAKEKTQ TLHKFILLFA
201 VFDEGKSWHS ETKNSLMQDR DAASARAWPK MHTVNGYVNR SLPGLIGCHR
251 KSVYWHVIGM GTTPEVHSIF LEGHTFLVRN HRQASLEISP ITFLTAQTLL
301 MDLGQFLLFC HISSHQHDGM EAYVKVDSCP EEPQLRMKNN EEAEDYDDDL
351 TDSEMDVVRF DDDNSPSFIQ IRSVAKKHPK TWVHYIAAEE EDWDYAPLVL
401 APDDRSYKSQ YLNNGPQRIG RKYKKVRFMA YTDFTFKTRE AIQHESGILG
451 PLYGEVGDGDT LLIIFKNQAS RPYNIYPHGI TDVRLYSRR LPKGVKHLKD
501 FPILPGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYYSFVNME RDLASGLIGP
551 LLICYKESVD QRGNQIMSDK RNVILFSVFD ENRSWYLTEN IQRFLPNPAG
601 VQLEDPEFQA SNIMHSINGY VFDSLQLSVC LHEVAYWYIL SIGAQTDFLS
651 VFFSGYTFKH KMVYEDTLTL FPFSGETVFM SMENPGLWIL GCHNSDFNR
701 GMSATLKVSS CDKNTGDYYE DSYEDISAYL LSKNNAIEPR SFSQNGAPGT
751 SESATPESGP GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPGTSE
801 SATPESGPGT STEPSEGSAP GSPAGSPTST EGTSESATP ESGPGSEPAT
851 SGSETPGTSE SATPESGPGS PAGSPTSTEE GSPAGSPTST EGTSTEPSE
901 GSAPGTSESA TPESGPGTSE SATPESGPGT SESATPESGP GSEPATSGSE
951 TPGSEPATSG SETPGSPAGS PTSTEEGTST EPSEGSAPGT STEPSEGSAP
1001 GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGTSTEP SEGSAPASSP PVLKRHQREI
1051 TRITLQSDQE EIDYDDTISV EMKKEDFDIY DEDENQSPRS FQKKTRHYFI
1101 AAVERLWDYG MSSSPHVLRN RAQSGSVQPF KKVVVFQFTD GSFTQPLYRG
1151 ELNEHLGLLG PYIRAEVEDN IMVTFRNQAS RPYSFYSSLI SYEEDQRQGA
1201 EPRKNFVKPN ETKTYFWKVQ HHMAPTKDEF DCKAWAYFSD VDLEKDVHSG
1251 LIGPLLVCHT NTLNPAHGRQ VTVQEFALFF TIFDETKSWY FTENMERNCR
1301 APCNIQMEDP TFKENYRFHA INGYIMDTLP GLVMAQDQRI RWYLLSMGSN
1351 ENIHSIHFSG HVFTVRKKEE YKMALYNLYP GVFETVEMLP SKAGIWRVEC
1401 LIGEHLHAGM STLFLVYSNK CQTPLGMASG HIRDFQITAS GQYGQWAPKL
1451 ARLHYSGSIN AWSTKEPFSW IKVDLLAPMI IHGIKTQGAR QKFSSLYISQ
1501 FIIMYSLDGK KWQTYRGNST GTLMVFFGNV DSSGIKHNIF NPPIIARYIR
1551 LHPHTYSIRS TLRMELMGCD LNCSMPLGM ESKAISDAQI TASSYFTNMF
1601 ATWSPSKARL HLQGRSNAWR PQVNNPKEWL QVDFQKTMKV TGVTTQGVKS
1651 LLTSMYVKEF LISSSQDGHQ WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF TPVVNSLDPP
1701 LLTRYLRIHP QSWVHQIALR MEVLGCEAQD LYDKTHTCPP CPAPELLGGP
1751 SVFLFPKPKP DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK
1801 TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
1851 AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
1901 NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ
1951 KSLSLSPGK

```

實例 6. FVIII-169/VWF-031 及 FVIII-173/VWF-031 之蛋白質純化

[0358] 使用切向流過濾(TFF)步驟對澄清之條件培養基進行緩衝液交換。接著使用兩步層析方法純化 FVIII-169/VWF-031 或 FVIII-173/VWF-031 雜二聚體。依次使用弱陰離子交換樹脂及親和層析。根據 SEC-HPLC，最終純化產物具有可接受之純度。如藉由 FVIII 顯色分析及

A280 濃度所量測，比活性與 B 域缺失之 FVIII 相容。藉由 SDS-PAGE 及西方墨點術確認此分子之純度及此分子各部分之存在。

實例 7. 藉由 Octet 分析評估 FVIII-169/VWF-031 之 VWF 結合能力

[0359] 在 25℃ 下，使用 Tris 結合緩衝液(50 mM Tris(pH 7.2)、150 mM NaCl、5 mM CaCl_2)，用 ForteBio Octet 384 儀器藉由基於生物層干涉量測術(BLI)之量測法 (Octet 分析)來獲得 FVIII-169/VWF-031 之 VWF 結合能力。用於測定 FVIII 結合之 Octet 分析係基於將人類范威爾邦德因子(Haematologic Technologies 目錄編號 HCVWF-0191)疏水性固定於 APS 生物感測器上，之後接著結合 1.0%牛血清白蛋白(Jackson ImmunoResearch 目錄編號 001-000-161)。簡言之，將 hvWF(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)於 Tris 緩衝液中稀釋且在整個 APS 生物感測器上裝載 600 秒，從而在反應探針上產生約 3.0-3.5 nm 結合。對照 APS 探針在不存在 hvWF 下用 1.0% BSA 裝載用於參照扣除。在裝載之後，所有探針皆在 Tris 緩衝液中培育 300 秒以建立新基線。隨後，將生物感測器探針在室溫下在 FVIII-XTEN 169 或 FVIIIIFc 藥物(0、0.6、2、6、20、60、200、600 IU/mL)之溶液中培育 5 分鐘，隨後進行 5 分鐘解離步驟。使用 Octet 資料分析軟體，由經扣除資料(反應探針減去參照探針)獲得結合反應(nm)。未偵測到 FVIII-169/VWF-031

與固定 VWF 之結合(圖 7)，從而指示 FVIII 由 D'D3 片段完全遮蔽而免於與全長 VWF 分子結合。

實例 8. FVIII-169/VWF-031 在 HemA 及 FVIII/VWF DKO 小鼠中之 PK

[0360] 在 HemA 及 FVIII/VWF DKO 小鼠中測試 FVIII-169/VWF-031 之 PK 概況以評估 D'D3 片段遮蔽 FVIII 部分以免與內源性 VWF 結合之能力。HemA 或 FVIII/VWF DKO 小鼠用 200 IU/kg 單次靜脈內劑量之 FVIII-169/VWF-031 處理，接著在給藥後 5 分鐘、8 小時、24 小時、48 小時及 72 小時收集血漿樣品。藉由 FVIII 顯色分析測試血漿樣品之 FVIII 活性，且使用 WinNonlin 程式計算 FVIII-169/VWF-031 之半衰期。

[0361] 對於 FVIII-169/VWF-031，藉由生物層干涉量測術(圖 7)證明完全抑制構築體與固定 VWF 之結合。此指示分子中之 D'D3 片段已成功阻斷 FVIII 與天然 VWF 分子之結合，因此，預期 FVIII-169/VWF-031 在兩種不同小鼠品系中之半衰期類似。如圖 8A 及表 18 中所示，如所預期，FVIII-169/VWF-031 在 HemA 小鼠與 FVIII/VWF DKO 小鼠兩者中具有類似 PK 概況，從而證明 FVIIIIFc/VWF 雜二聚體之半衰期與內源性 VWF 之半衰期無關。

FVIIIIFc/VWF 雜二聚體半衰期與內源性 VWF 半衰期之分離消除了 FVIII 延長最高限度且開闢進一步延長 FVIII 半衰期超過由內源性 VWF 造成之 2 倍半衰期限制的可能

性。

表18：FVIII-169/VWF-031在HemA及FVIII/VWF DKO小鼠中之PK

小鼠品系	回收率 (%)	t _{1/2} (小時)	MRT (小時)	Cl (mL/hr/kg)	Vss (mL/kg)	AUC (hr*kg*mIU/mL/mIU)
FVIII/VWF DKO	69	17.94	20.1	4.06	81.69	0.2461
HemA	83	16.65	18.44	3.57	85.72	0.28

[0362] 藉由比較 FVIII-169/VWF-031 與 FVIII-169/Fc 及 FVIIIIFc 在 FVIII/VWF DKO 小鼠中之半衰期來評估 XTEN 插入及 D'D3 片段之 FVIII 保護能力。在單次靜脈內投藥之後，對於 FVIII-169/VWF-031，在 5 分鐘、8 小時、24 小時、48 小時及 72 小時收集血液樣品，對於 FVIII-169/Fc，在 5 分鐘、8 小時、24 小時、32 小時、48 小時收集血液樣品，且對於 FVIIIIFc，在 5 分鐘、1 小時、2 小時、4 小時、6 小時及 8 小時收集血液樣品。藉由 FVIII 顯色分析測試血漿樣品之 FVIII 活性，且使用 WinNonlin 程式計算 FVIII-155/VWF-031 之半衰期。

[0363] 研究結果概述於圖 8B 及表 19 中，由於 VWF 保護喪失，rFVIIIIFc 在 DKO 小鼠中具有 1.6 小時之半衰期。當將 XTEN 插入引入 FVIIIIFc 分子中時，所得 FVIII-169/Fc 分子具有 7 小時半衰期，半衰期因 XTEN 插入而延長 4 倍。最後，當將 D'D3 片段併入分子中以形成 FVIII-169/VWF-031 時，觀測到 17 小時半衰期，由 D'D3 片段再進一步增加 2.5 倍。除半衰期改良之外，如表 19 中所

示，亦觀測到平均滯留時間(MRT)、清除率(CI)及 AUC 改良。

[0364] FVIII-169/VWF-031 已在 HemA 小鼠與 FVIII/VWF DKO 小鼠兩者中達成 17-18 小時 $t_{1/2}$ ，此為由 VWF 清除造成之 $t_{1/2}$ 延長最高限度之上限。此分子中可進一步併入更多 $t_{1/2}$ 延長元件，諸如 FVIII 內之第二 XTEN 插入。D'D3 片段與 XTEN 插入之協同效應提供完全保護 FVIII 免遭其清除路徑之可能性，最終突破 2 倍 FVIII $t_{1/2}$ 延長限制可能藉由 FVIII_{IFc}/XTEN/VWF 變異體達成。

表19. FVIII-169/VWF-031在FVIII/VWF DKO小鼠中之PK

小鼠品系	治療劑	回收率 (%)	$t_{1/2}$ (小時)	MRT (小時)	CI (mL/hr/kg)	Vss (mL/kg)	AUC/D (hr*kg*mIU/mL/mIU)
FVIII/VWF DKO	rFVIII _{IFc}	35	1.6	2.1	57.7	120.2	0.0173
	rFVIII-169/ Fc	77	7.0	6.2	6.4	39.2	0.1573
	rFVIII-169/ VWF-031	69	17.9	20.1	4.1	81.7	0.2461

實例 9：FVIII-XTEN 變異體細胞培養基濃縮物在 D'D3 表現 FVIII/VWF DKO 小鼠中之 PK

[0365] 在 D'D3 表現 FVIII/VWF DKO 小鼠模型(實例 2 中所述)中評估 D'D3 片段延長 FVII-XTEN 之 $t_{1/2}$ 的能力。在此研究中，替代使用 VWF-025 將 D'D3 二聚體引入循環中，改為使用 VWF-029 構築體將 D'D3 單體引入循環中。為製備 FVIII-XTEN 變異體蛋白質，在轉染後第 4 天製備小規模(50-100 mL)短暫轉染培養基，收集細胞培養物且濃縮以達到適於 PK 研究之 FVIII 活性範圍 10-20

IU/mL。接著使用濃縮細胞培養基用於在循環中有或無 D'D3 之 FVIII/VWF DKO 小鼠中進行標準 PK 研究。

[0366] 在系統中測試總計 6 個含有 1-3 個 XTEN 插入之 FVIII-XTEN 變異體，其 $t_{1/2}$ 概述於表 20 中且來自代表性變異體之資料繪製於圖 9A 中。

[0367] 觀測到在循環中存在 D'D3 片段時，所有 FVIII-XTEN 變異體之半衰期皆較長(表 20)，此證明 D'D3 保護 FVIII-XTEN 免遭其清除路徑。此外，當與其在 HemA 小鼠中之 14 小時半衰期比較時，LSD0055.021 在 D'D3 表現 DKO 小鼠中具有 20.4 小時 $t_{1/2}$ (圖 9B，表 20)，指示最終突破 FVIII 分子之 2 倍半衰期延長最高限度。藉由進一步修飾 FVIII(XTEN)/VWF 分子，吾人可潛在達成甚至更長之 FVIII $t_{1/2}$ ，且提供 HemA 患者僅需要每週一次或更小頻率給藥方案之 FVIII 蛋白質。

表20. FVIII-XTEN在D'D3表現FVIII/VWF DKO小鼠中之 $t_{1/2}$

FVIII-XTEN ID	XTEN插入之數目	插入位點	XTEN大小	$t_{1/2}$ (hr) DKO 小鼠	$t_{1/2}$ (小時) pLIVE-D'D3/ DKO 小鼠	$t_{1/2}$ (小時) HemA 小鼠
pSD-0013	1	CT	144	3.3	7.9	
LSD0003.009	2	B*/CT	144/288	9.7	16.4	
LSD0038.015	2	1656/26	144/144	7.8	17.2	
LSD0049.002	3	18/B*/CT	144/144/288	12.6	17.5	
LSD0051.002	3	403/B*/CT	144/144/288	11.1	19.9	
LSD0055.021	3	1900/B*/CT	144/144/288	16	20.4	14

* B指示XTEN序列(例如144)緊靠對應於成熟FVIII序列之胺基酸殘基745之下游插入。

實例 10：含有 VWF 之 FVIII 變異體及含有 XTEN 之 FVIII 變異體在 FVIII/VWF 雙重基因剔除(DKO)血漿中之穩定性

[0368] 測試 rFVIIIIFc 蛋白質變異體在 FVIII/VWF 雙重基因剔除(DKO)小鼠血漿中之血漿穩定性。對於穩定性分析，將 HEK293 細胞用引導 rFVIIIIFc 或 FVIII-169(在 B 域接合點處插入 288 AE XTEN 之 rFVIIIIFc)表現之質體及引導 IgG-Fc 或 VWF-031(融合於 IgG-Fc 之 VWF D'D3 區)表現之質體共轉染。在轉染後第四天，收集細胞培養基且基於 FVIII 顯色活性濃縮至 30 IU/ml。接著添加濃縮細胞培養基至 DKO 小鼠血漿中以產生 5 IU/mL 之 FVIII 活性且在 37°C 下培育。在不同時間點收集等分試樣以藉由顯色分析量測活性。一式兩份量測在各時間點之活性且將平均活性作為時間之函數繪圖。FVIIIIFc(雙鏈(dc)FVIII 分子，其中重鏈及輕鏈係藉由非共價相互作用保持在一起)在 DKO 小鼠血漿中之活性均隨時間降低(圖 10)。相對於 rFVIIIIFc，在 B 域接合點處含有 288 AE XTEN 插入之 FVIII-169:Fc 之活性以減小之速率衰減，從而指示由 XTEN 插入賦予增強之穩定性。鑒於已提出 VWF 會增強 FVIII 之活體內穩定性，吾人評估 FVIII-169:VWF-031 之血漿穩定性。FVIII 元件及 VWF D'D3 元件融合於 Fc 之各別半域之此雜二聚分子相對於 FVIII-169:Fc 展現附加血漿穩定性，從而指示 VWF D'D3 域及 XTEN 對 rFVIIIIFc 之血漿穩定性具有協同效應。

實例 11：Fc 融合、XTEN 插入及 VWF 之 D'D3 片段對 FVIII 半衰期之影響

[0369] 為評估 Fc 融合、XTEN 插入及 VWF 之 D'D3 片段對 FVIII 之半衰期之影響，在 FVIII/VWF 雙重基因剔除 (DKO) 小鼠中評估 B 域缺失之重組 FVIII(rBDD-FVIII)、rFVIIIIFc、FVIII-169:Fc 及 FVIII-169:VWF-031 之藥物動力學性質。

[0370] DKO 小鼠以單次靜脈內投與 200 IU/kg 之 FVIII 蛋白質進行處理，且在如圖 11 中所指示之指定時間點收集血漿樣品。藉由 FVIII 顯色分析來分析血漿樣品之 FVIII 活性且使用 WinNonlin-Phoenix 程式計算半衰期。所測試分子之藥物動力學參數列於表 21 中。各 FVIII 變異體之血漿 FVIII 活性之時間回歸曲線繪製於圖 11 中。

[0371] 未修飾 BDD-FVIII 在 DKO 小鼠中具有 0.23 小時之半衰期，由於 FVIIIIFc 蛋白質經由 Fc:FcRn 相互作用再循環，FVIIIIFc 融合蛋白在 DKO 小鼠中具有 1.66 小時之延長半衰期。當將 288 個殘基之 AEXTEN 多肽併入 FVIIIIFc 分子內 FVIII 之 B 域區中時，所得 FVIII169/Fc 蛋白質在 DKO 小鼠中之半衰期進一步延長至 7.41 小時。最後，在添加 VWF 之 D'D3 域時，FVIII169/VWF031 雜二聚體在 DKO 小鼠中之半衰期已達到 17.9 小時(圖 11，表 21)。除半衰期之外，所有其他 PK 參數亦隨各元件之添加而按比例改良(表 21)。FVIII 可耐受多種半衰期延長元件，且三種元件對 FVIII 半衰期延長之此協同效應使得能夠進一步改良 FVIII-XTEN VWF 雜二聚體之半衰期。

表21：FVIII變異體之PK參數

FVIII	FVIII 同功 異型物	XTEN 插入		T _{1/2} (小時)	MRT (小時)	Cl (mL/hr/kg)	Vss (mL/kg)	AUC_D kg*hr/mL
		位點	XTEN 長度					
BDD-FVIII	dc			0.23	0.24	407.72	97.42	0.0025
FVIII-Fc	dc			1.66	2.06	62.66	128.82	0.0161
FVIII169/Fc	sc	B*	AE288	7.41	6.67	6.24	41.61	0.1603
FVIII169/VWF031	sc	B*	AE288	17.94	20.1	4.06	81.69	0.2463

* B指示XTEN序列(例如144)緊靠對應於成熟FVIII序列之胺基酸殘基745之下游插入。

實例 12：不同 FVIII-XTEN_VWF 雜二聚體之藥物動力學性質

[0372] 為評估 VWF-D'D3 片段及 XTEN 插入對 FVIII 半衰期之組合作用，在 HemA 小鼠中測試 FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 雜二聚體之藥物動力學性質且與 BDD-FVIII 之單鏈同功異型物(scBDD-FVIII)及 FVIII-169:VWF-031(實例 10)之藥物動力學性質進行比較。產生七個新 FVIII-XTEN-Fc 構築體(蛋白質序列列於表 24 中)。彼等構築體之示意圖展示於圖 14A-H 中。FVIII-195 及 FVIII-199 分別為 FVIII 雙鏈及單鏈同功異型物，其各自在位置 1900 及 1656 處含有兩個 XTEN 插入。FVIII-196 及 FVIII-201 分別為 FVIII 雙鏈及單鏈同功異型物，其各自在位置 26、1656 及 1900 處含有三個 XTEN 插入。FVIII-203、FVIII-204 及 FVIII-205 為在 B 域接合點處及分別在位置 1900、403 或 18 處具有兩個 XTEN 插入之 sc-FVIII-Fc 分子。各 FVIII-XTEN-Fc 構築體與 VWF-031 一起在 HEK293 細胞中共表現以產生 FVIII-XTEN-Fc/VWF 雜二聚蛋白質。在轉染後第四天，收集細胞培養基且基於 FVIII 顯色活性濃

縮至 20 IU/mL(FVIII-195:VWF-031、FVIII-196:VWF-031、FVIII-199:VWF-031、FVIII-203:VWF-031 及 FVIII-204:VWF-031) 或純化(scBDD-FVIII、FVIII-169:VWF-031、FVIII-201:VWF-031 及 FVIII-205:VWF-031)。已證明由 FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 雜二聚體(FVIII-169:VWF-031，實例 5)中之 D'D3 片段完全分子內遮蔽 FVIII 分子以免與內源性 VWF 結合，選擇 HemA 小鼠進行 PK 評估。藉由以 200 IU/10 mL/kg 之劑量進行靜脈內投藥來向 8-12 週齡 HemA 小鼠投與純化蛋白質或濃縮細胞培養基。在給藥後 5 分鐘、8 小時、16 小時、24 小時、32 小時、48 小時、72 小時及 96 小時收集血漿樣品。藉由 FVIII 顯色分析來分析血漿樣品之 FVIII 活性且使用 WinNonlin-Phoenix 程式計算半衰期。所測試分子之藥物動力學參數列於表 22 中。FVIII-XTEN-Fc/VWF-Fc 變異體在所選時間點之血漿 FVIII 活性繪製於圖 12A-C 中。

[0373] 當將 XTEN 插入位置 1900 及 1656(FVIII-195、FVIII-199)中時，觀測到 scFVIII 同功異型物(FVIII-199:VWF-031)相較於 FVIII-169:VWF-031，半衰期有適度改良。然而，dcFVIII 同功異型物展現之半衰期短於 FVIII-169:VWF-031 所展現之半衰期，從而指示單鏈同功異型物可能比相應雙鏈同功異型物顯著更穩定(表 22 及圖 12A)。當將第三 XTEN 在位置 26 處之插入併入 FVIII-199 中時，所得分子 FVIII-201:VWF-031 之半衰期已達到 24.6 小時，此表示相對於 scBDD-FVIII，半衰期改良大於三倍

(表 22 及圖 12C)。吾人亦已測試各自與 B 域 XTEN 插入組合之在位置 403(A2 域)、1900(A3 域)及 18(A1 域)上之第二 XTEN 插入的半衰期延長作用。儘管添加 A2 或 A3 XTEN 插入不賦予額外半衰期益處(表 22，圖 12b)，但添加 A1 插入進一步延長 FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 雜二聚體之半衰期至 29.4 小時(表 22，圖 12C)，此大於 scBDD-FVIII 之半衰期三倍長。

[0374] 當將 XTEN 併入 FVIII-Fc/VWF 雜二聚體構築體中時，所得分子之半衰期改良程度可變化，且在半衰期與 XTEN 插入位點或數目之間無明顯關聯，從而表明 FVIII-XTEN-Fc/VWF 雜二聚體之半衰期由整個分子之完整性而非由 XTEN 插入之數目或位置決定。

[0375] 所觀測到 FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 雜二聚體之 24.6 小時及 29.4 小時半衰期明確超過 FVIII 半衰期延長之 1.6 至 2 倍限制。若此研究結果轉至 HemA 患者，其將允許每週一次或以更小頻率給藥來進行 FVIII 預防。

表22：FVIII-XTEN-Fc/VWF-Fc雜二聚體之PK參數

FVIII	FVIII 同功 異型物	XTEN 插入		T _{1/2} (小時)	MRT (小時)	Cl (mL/hr/kg)	Vss (mL/kg)	AUC_D kg*hr/mL
		位點	XTEN 長度					
scBDD-FVIII	sc			7.16	10.16	4.38	44.44	0.23
FVIII169/VWF031	sc	B*	AE288	16.65	18.44	3.57	65.79	0.28
FVIII195/VWF031	dc	1656/1900	AG144/ AE144	12.56	13.88	9.04	125.48	0.11
FVIII199/VWF031	sc	1656/1900	AG144/ AE144	18.57	20.09	6.24	125.28	0.16
FVIII201/VWF031	sc	26/1656/ 1900	AG144/AG144/AE144	24.63	33.67	1.9	63.97	0.53
FVIII203/VWF031	sc	403/B*	AE144/AE288	15.52	18	3.65	65.61	0.27
FVIII204/VWF031	sc	1900/B*	AE144/AE288	16.3	20.63	2.87	59.14	0.35
FVIII205/VWF031	sc	18/B*	AE144/AE288	29.4	37.06	1.82	67.39	0.55

* B指示XTEN序列(例如144)緊靠對應於成熟FVIII序列之胺基酸殘基745之下游插入。

[0376] 除將 XTEN 併入 FVIII 分子中之外，吾人亦評估將 XTEN 作為連接子併入在 D'D3 與 Fc 片段之間的潛在半衰期延長益處。將 FVIII-155(scFVIII-Fc)與 VWF-034(具有 AE 288 XTEN 加含 35 個殘基之凝血酶可裂解連接子之 VWF-Fc)一起共表現於 HEK293 細胞中。在轉染後第 4 天，收集細胞培養基且基於 FVIII 活性分析濃縮至 20 IU/mL。以單次靜脈內注射對 FVIII/VWF DKO 小鼠給與 200 IU/10 mL/kg 之濃縮細胞培養基。在給藥後 5 分鐘、8 小時、24 小時、48 小時、72 小時及 96 小時收集血漿樣品。藉由 FVIII 顯色分析來分析血漿樣品之 FVIII 活性，且繪製血漿 FVIII 活性隨時間變化之回歸曲線(圖 13)。FVIII-155/VWF-034 與具有 AE 288 XTEN 插入 FVIII 之 B 域接合點中之 FVIII-169/VWF-031 展現相同半衰期改良，如藉由兩種分子之重疊回歸曲線所說明(圖 13)。對 XTEN 插入 VWF-Fc 多肽中會以與藉由在 FVIII 多肽之 B 域接合點處插入 XTEN 所賦予之量級類似之量級賦予半衰期改良的證明表明有可能在使 FVIII 多肽中分子內 XTEN 插入與 VWF-Fc 多肽之 VWF 與 Fc 元件之間域內 XTEN 插入相組合的雜二聚分子中進一步改良半衰期。

實例 13A：其他 FVIII-XTEN_VWF 雜二聚體之藥物動力學性質

[0377] 除表 22 中所列之 FVIII-XTEN VWF 雜二聚體之外，在或將在 HemA 中測試含有 XTEN 插入、單鏈及雙

鏈形式 FVIII(表 23A)之不同組成之 FVIII-XTEN VWF 雜二聚體的藥物動力學性質。以下亦揭露各種 FVIII 構築體(表 23B)及 VWF 構築體(表 23C)。HemA 小鼠將以單次靜脈內投與 200 IU/10 mL/kg 劑量之雜二聚體蛋白質進行治療。接著在給藥後 5 分鐘、24 小時、48 小時、72 小時、96 小時及 120 小時收集血漿樣品。藉由 FVIII 顯色分析來分析血漿樣品之 FVIII 活性且使用 WinNonlin-Phoenix 程式計算半衰期。所列雜二聚體之蛋白質序列列於表 25 中。

表23A. 用於PK及活性改良之合理FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc雜二聚體組合。

	pSYN VWF-015	pSYN VWF-031	pSYN VWF-034 **	pSYN VWF-036
pSYN FVIII 010	-	t _{1/2} 8.7 小時 DKO 小鼠	待測試	-
pSYN FVIII 155	t _{1/2} 6.3 小時 DKO 小鼠	t _{1/2} 10.8 小時 HemA 小鼠	t _{1/2} 18.6 小時 HemA 小鼠	t _{1/2} 13.3 小時 HemA 小鼠
pSYN FVIII 169 **	-	t _{1/2} 16.7 小時 HemA 小鼠	t _{1/2} 31.1 小時 HemA 小鼠	-
pSYN FVIII 173	-	t _{1/2} 15.2 小時	t _{1/2} 28.9 小時	待測試
**		DKO 小鼠	HemA 小鼠	
pSYN FVIII 205	-	t _{1/2} 29.4 小時 HemA 小鼠	t _{1/2} 32.4 小時 HemA 小鼠	t _{1/2} 29.7 小時 HemA 小鼠
pSYN FVIII 266	-	t _{1/2} 24.5 小時 HemA 小鼠	t _{1/2} 27.4 小時 HemA 小鼠	-
pSYN FVII 267	-	t _{1/2} 23.0 小時 HemA 小鼠	t _{1/2} 25.7 小時 HemA 小鼠	
pSYN FVIII 268	-	待測試	待測試	待測試
pSYN FVIII 268 之雙鏈同功 異型物		待測試	待測試	待測試
** XTEN之長度可改變為72、144、288、324、333、576或864。				

表23B. FVIII構築體：

pSYN FVIII 010	雙鏈FVIIIc
pSYN FVIII 169	在B域中具有288 AE XTEN之單鏈FVIIIc
pSYN FVIII 173	在B域中具有288 AE XTEN之雙鏈FVIIIc
pSYN FVIII 195	在胺基酸1656及1900處具有兩個144 XTEN之雙鏈FVIIIc
pSYN FVIII 196	在胺基酸26、1656及1900處具有三個144 XTEN之雙鏈FVIIIc
pSYN FVIII 199	在胺基酸1656及1900處具有兩個144 XTEN之單鏈FVIIIc
pSYN FVIII 201	在胺基酸26、1656及1900處具有三個144 XTEN之單鏈FVIIIc
pSYN FVIII 203	在胺基酸1900處具有144 AE XTEN且在B域中具有288 AE XTEN之單鏈FVIIIc
pSYN FVIII 204	在胺基酸403處具有144 AE XTEN且在B域中具有288 AE XTEN之單鏈FVIIIc
pSYN FVIII 205	在胺基酸18處具有144 AE XTEN且在B域中具有288 AE XTEN之單鏈FVIIIc
pSYN FVIII 207	單鏈FVIII(無Fc，無XTEN)
pSYN FVIII 266	在胺基酸18處具有42 AE XTEN且在B域中具有288 AE XTEN之單鏈FVIIIc
pSYN FVIII 267	在胺基酸18處具有72 AE XTEN且在B域中具有288 AE XTEN之單鏈FVIIIc
pSYN FVIII 268	在胺基酸18處具有144 AE XTEN之單鏈FVIIIc
pSYN FVIII 269	在胺基酸18處具有72 AE XTEN之單鏈FVIIIc
pSYN FVIII 271	在胺基酸18處具有42 AE XTEN之單鏈FVIIIc
pSYN FVIII 272	在胺基酸18處具有144 AE XTEN且在B域中具有288 AE XTEN之單鏈FVIII(無Fc)

表23C. VWF構築體：

pSYN VWF031	VWF-D1D2D'D3-長48 aa之凝血酶可裂解GS連接子-具有C1099A/C1142A之Fc
pSYN VWF034	VWF-D1D2D'D3-288AE XTEN +長35 aa之凝血酶可裂解GS連接子-具有C1099A/C1142A之Fc
pSYN VWF035	VWF-D1D2D'D3-長72 aa之凝血酶可裂解GS連接子-具有C1099A/C1142A之Fc
pSYN VWF036	VWF-D1D2D'D3-長98 aa之凝血酶可裂解GS連接子-具有C1099A/C1142A之Fc
pSYN VWF041	在D3中具有288 AE XTEN且在D3之後具有長48 aa之凝血酶可裂解GS連接子之VWF-D1D2D'D3-具有C1099A/C1142A之Fc

實例 13B：其他 FVIII-XTEN_VWF 雜二聚體之藥物動力學性質。

[0378] 在 HemA 小鼠中測試 FVIII-XTEN_VWF 雜二聚體之藥物動力學性質。所測試之雜二聚體為 FVIII169/VWF034、FVIII205/VWF034、FVIII205/VWF036 及 FVIII266/VWF031。向 HemA 小鼠投與單次靜脈內 200 IU/10 mL/kg 劑量之各種雜二聚體蛋白質。在給藥後 5 分鐘、24 小時、48 小時、72 小時、96 小時及 120 小時收集血漿樣品。藉由 FVIII 顯色分析來分析血漿樣品之 FVIII

活性，且使用 WinNonlin-Phoenix 程式計算半衰期。PK 結果展示於以下表 24 中。

表24. HemA小鼠中之其他FVIII-XTEN_VWF-PK

治療劑	5分鐘 回收率 (%)	HL (小時)	MRT (小時)	Cl (mL/hr/kg)	Vss (mL/kg)	AUC_D (hr*kg*mIU/ mL/mIU)	相對於 scBDD-FVIII 之t _{1/2} 增加倍數
ScBDD-FVIII		7.16	10.16	4.83	44.44	0.23	-
FVIII169/VWF034	76	31.1	34.57	1.73	59.77	0.58	4.3
FVIII205/VWF034	68	32.41	39.79	1.55	61.73	0.64	4.6
FVIII205/VWF036	74	29.71	36.35	1.61	58.43	0.62	4.1
FVIII266/VWF031	66	24.45	22.75	2.67	60.83	0.37	3.4

pSYNFVIII 010核苷酸序列-(雙鏈FVIII_{FC})(SEQ ID NO: 125)

```
1  ATGCAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TCGGATTCTG
51  CTTTAGTGCC ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGA CTGTCATGGG
101 ACTATATGCA AAGTGATCTC GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCTT
151 CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC ACCTCAGTCG TGTACAAAAA
201 GACTCTGTTT GTAGAAATCA CGGATCACCT TTTCAACATC GCTAAGCCAA
251 GGCCACCCTG GATGGGTCTG CTAGGTCCTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
301 GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCAGTCT
351 TCATGCTGTT GGTGTATCCT ACTGGAAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG
401 ATGATCAGAC CAGTCAAAGG GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTTCCCTGGT
451 GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCCTG AAAGAGAATG GTCCAATGGC
501 CTCTGACCCA CTGTGCCTTA CCTACTCATA TCTTTCTCAT GTGGACCTGG
551 TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCCTACTAGT ATGTAGAGAA
601 GGGAGTCTGG CCAAGGAAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATACTACT
651 TTTTGCTGTA TTTGATGAAG GGAAAAGTTG GCACTCAGAA ACAAAGAACT
701 CCTTGATGCA GGATAGGGAT GCTGCATCTG CTCGGGCCTG GCCTAAAATG
751 CACACAGTCA ATGGTTATGT AAACAGGTCT CTGCCAGGTC TGATTGGATG
801 CCACAGGAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGGAAATGGC ACCACTCCTG
851 AAGTGCACTC AATATTCCTC GAAGGTCACA CATTTCTTGT GAGGAACCAT
901 CGCCAGGCGT CCTTGAAAAT CTCGCCAATA ACTTTCCTTA CTGCTCAAAC
951 ACTCTTGATG GACCTTGAC AGTTTCTACT GTTTTGTCAT ATCTCTCCC
1001 ACCAACATGA TGGCATGGAA GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG
1051 GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA GAAGCGGAAG ACTATGATGA
1101 TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT GATGACAACT
1151 CTCCTTCCTT TATCCAAATT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAAC
1201 TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT
```

1251	AGTCCTCGCC	CCCGATGACA	GAAGTTATAA	AAGTCAATAT	TTGAACAATG
1301	GCCCTCAGCG	GATTGGTAGG	AAGTACAAAA	AAGTCCGATT	TATGGCATACT
1351	ACAGATGAAA	CCTTTAAGAC	TCGTGAAGCT	ATTGAGCATG	AATCAGGAAT
1401	CTTGGGACCT	TTACTTTATG	GGGAAGTTGG	AGACACACTG	TTGATTATAT
1451	TTAAGAATCA	AGCAAGCAGA	CCATATAACA	TCTACCCTCA	CGGAATCACT
1501	GATGTCCGTC	CTTTGTATTC	AAGGAGATTA	CCAAAAGGTG	TAAAACATTT
1551	GAAGGATTTT	CCAATTCTGC	CAGGAGAAAT	ATTCAAATAT	AAATGGACAG
1601	TGACTGTAGA	AGATGGGCCA	ACTAAATCAG	ATCCTCGGTG	CCTGACCCGC
1651	TATTACTCTA	GTTTCGTAA	TATGGAGAGA	GATCTAGCTT	CAGGACTCAT
1701	TGGCCCTCTC	CTCATCTGCT	ACAAAGAATC	TGTAGATCAA	AGAGGAAACC
1751	AGATAATGTC	AGACAAGAGG	AATGTCATCC	TGTTTCTGT	ATTTGATGAG
1801	AACCGAAGCT	GGTACCTCAC	AGAGAATATA	CAACGCTTTC	TCCCCATCC
1851	AGCTGGAGTG	CAGCTTGAGG	ATCCAGAGTT	CCAAGCCTCC	AACATCATGC
1901	ACAGCATCAA	TGGCTATGTT	TTTGATAGTT	TGCAGTTGTC	AGTTTGTTTG
1951	CATGAGGTGG	CATACTGGTA	CATTCTAAGC	ATTGGAGCAC	AGACTGACTT
2001	CCTTTCTGTC	TTCTTCTCTG	GATATACCTT	CAAACACAAA	ATGGTCTATG
2051	AAGACACACT	CACCCTATTC	CCATTCTCAG	GAGAACTGT	CTTCATGTCG
2101	ATGGAAAACC	CAGGTCTATG	GATTCTGGGG	TGCCACAAC	CAGACTTTCG
2151	GAACAGAGGC	ATGACCGCCT	TACTGAAGGT	TTCTAGTTGT	GACAAGAACA
2201	CTGGTGATTA	TTACGAGGAC	AGTTATGAAG	ATATTTTCAGC	ATACTTGCTG
2251	AGTAAAAACA	ATGCCATTGA	ACCAAGAAGC	TTCTCTCAAA	ACCCACCAGT
2301	CTTGAAACGC	CATCAACGGG	AAATAACTCG	TACTACTCTT	CAGTCAGATC
2351	AAGAGGAAAT	TGACTATGAT	GATACCATAT	CAGTTGAAAT	GAAGAAGGAA
2401	GATTTTGACA	TTTATGATGA	GGATGAAAAT	CAGAGCCCC	GCAGCTTTCA
2451	AAAGAAAACA	CGACACTATT	TTATTGCTGC	AGTGGAGAGG	CTCTGGGATT
2501	ATGGGATGAG	TAGCTCCCCA	CATGTTCTAA	GAAACAGGGC	TCAGAGTGGC
2551	AGTGTCCCTC	AGTTCAAGAA	AGTTGTTTTC	CAGGAATTTA	CTGATGGCTC
2601	CTTTACTCAG	CCCTTATACC	GTGGAGAACT	AAATGAACAT	TTGGGACTCC
2651	TGGGGCCATA	TATAAGAGCA	GAAGTTGAAG	ATAATATCAT	GGTAACTTTC
2701	AGAAATCAGG	CCTCTCGTCC	CTATTCCTTC	TATTCTAGCC	TTATTTCTTA
2751	TGAGGAAGAT	CAGAGGCAAG	GAGCAGAACC	TAGAAAAAAC	TTTGTCAAGC
2801	CTAATGAAAC	CAAACTTAC	TTTTTGAAAG	TGCAACATCA	TATGGCACCC
2851	ACTAAAGATG	AGTTTGACTG	CAAAGCCTGG	GCTTATTTCT	CTGATGTTGA
2901	CCTGGAAAAA	GATGTGCACT	CAGGCCTGAT	TGGACCCCTT	CTGGTCTGCC
2951	ACACTAACAC	ACTGAACCCT	GCTCATGGGA	GACAAGTGAC	AGTACAGGAA
3001	TTTGCTCTGT	TTTTCAACAT	CTTTGATGAG	ACCAAAAGCT	GGTACTTCAC
3051	TGAAAATATG	GAAAGAACT	GCAGGGCTCC	CTGCAATATC	CAGATGGAAG
3101	ATCCCACTTT	TAAAGAGAAT	TATCGCTTCC	ATGCAATCAA	TGGCTACATA
3151	ATGGATACAC	TACCTGGCTT	AGTAATGGCT	CAGGATCAAA	GGATTCGATG
3201	GTATCTGCTC	AGCATGGGCA	GCAATGAAAA	CATCCATTCT	ATTCAATTTCA
3251	GTGGACATGT	GTTCACGTGA	CGAAAAAAG	AGGAGTATAA	AATGGCACTG
3301	TACAATCTCT	ATCCAGGTGT	TTTTGAGACA	GTGGAAATGT	TACCATCCAA
3351	AGCTGGAATT	TGGCGGGTGG	AATGCCTTAT	TGGCGAGCAT	CTACATGCTG
3401	GGATGAGCAC	ACTTTTTCTG	GTGTACAGCA	ATAAGTGTC	GACTCCCCTG
3451	GGAATGGCTT	CTGGACACAT	TAGAGATTTT	CAGATTACAG	CTTCAGGACA
3501	ATATGGACAG	TGGGCCCCAA	AGCTGGCCAG	ACTTCATTAT	TCCGGATCAA
3551	TCAATGCCTG	GAGCACCAG	GAGCCCTTTT	CTTGGATCAA	GGTGGATCTG
3601	TTGGCACCAA	TGATTATTCA	CGGCATCAAG	ACCCAGGGTG	CCCGTCAGAA
3651	GTTCTCCAGC	CTCTACATCT	CTCAGTTTAT	CATCATGTAT	AGTCTTGATG
3701	GGAAGAAGTG	GCAGACTTAT	CGAGGAAATT	CCACTGGAAC	CTTAATGGTC
3751	TTCTTTGGCA	ATGTGGATTC	ATCTGGGATA	AAACACAATA	TTTTTAACCC
3801	TCCAATTATT	GCTCGATACA	TCCGTTTGCA	CCCAACTCAT	TATAGCATTC
3851	GCAGCACTCT	TCGCATGGAG	TTGATGGGCT	GTGATTTAAA	TAGTTGCAGC
3901	ATGCCATTGG	GAATGGAGAG	TAAAGCAATA	TCAGATGCAC	AGATTACTGC
3951	TTCATCTTAC	TTTACCAATA	TGTTTGCCAC	CTGGTCTCCT	TCAAAGCTC
4001	GACTTCACCT	CCAAGGGAGG	AGTAATGCCT	GGAGACCTCA	GGTGAATAAT
4051	CCAAAAGAGT	GGCTGCAAGT	GGACTTCCAG	AAGACAATGA	AAGTCACAGG
4101	AGTAACACT	CAGGGAGTAA	AATCTCTGCT	TACCAGCATG	TATGTGAAGG
4151	AGTTCCTCAT	CTCCAGCAGT	CAAGATGGCC	ATCAGTGGAC	TCTCTTTTTT

4201 CAGAATGGCA AAGTAAAGGT TTTTCAGGGA AATCAAGACT CCTTCACACC
4251 TGTGGTGAAC TCTCTAGACC CACCGTTACT GACTCGCTAC CTTCGAATTC
4301 ACCCCCAGAG TTGGGTGCAC CAGATTGCCC TGAGGATGGA GGTTCTGGGC
4351 TGCGAGGCAC AGGACCTCTA CGACAAAAC CACACATGCC CACCGTGCCC
4401 AGCTCCAGAA CTCCTGGGCG GACCGTCAGT CTTCTCTTC CCCCCAAAAC
4451 CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG
4501 GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA
4551 CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA
4601 ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG
4651 CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC
4701 CCCCATCGAG AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC
4751 AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGATG AGCTGACCAA GAACCAGGTC
4801 AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGTGGA
4851 GTGGGAGAC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCTCCCG
4901 TGTGGAGTC CGACGGCTCC TTCTTCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC
4951 AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA
5001 GGCTCTGCAC AACCCTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA
5051 AATGA

pSYNFVIII 010蛋白質序列-(雙鏈FVIIIc)(SEQ ID NO: 126)

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGA VE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
51 PRVPKSF PFN TSVVYKKT LF VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVS YWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPFG
151 GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
251 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TPPEVHSIFL EGHTFLVRNH
301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPTK
401 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
601 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS
701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYYED SYEDISAYLL
751 SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQREITR TTL QSDQEEIDYD DTISVEMKKE
801 DFDIYDE DEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLRNRAQSG
851 SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPIYRA EVEDNIMVTF
901 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEP RKN FVKPNETKTY FWKVQH HMAP
951 TKDEFDC KAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
1001 FALFFTIFDE TKS WYFTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
1051 MDTLPGLVMA QDQIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL
1101 YNLYPGVFET VEMLP SKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
1151 GMASGHIRDF QITASGQYGQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
1201 LAPMIIHG I K TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
1251 FFGNV DSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHP TH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
1301 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
1351 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVT T QGVKSLLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
1401 QNGKVKVFQ G NQDSFTP VVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
1451 CEAQDLYDKT HTPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
1501 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
1551 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
1601 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDS DGS FFLYSKLTVD
1651 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SP GK*

實例 14：一類在 A 型血友病小鼠中半衰期延長大於三倍之新凝血因子 FVIII 分子

[0379] 設計一類新 FVIII 分子含有兩個多肽；一個多肽由在 FVIII 序列內之一或多個位置處插入有 XTEN 之單鏈 B 域缺失(BDD)FVIII 組成，且一個多肽由 VWF 之 D'D3 區構成。各多肽亦重組融合於 IgG1 之 Fc 區以使得 D'D3 區能夠恰當對準以結合 FVIII 部分。所得 FVIII 變異體藉由短暫轉染在 HEK 293 細胞中表現，且自條件培養基純化。藉由 FVIII 顯色分析評估 FVIII 活性且在 FVIII 基因剔除(HemA)小鼠與 FVIII/VWF 雙重基因剔除(DKO)小鼠兩者中評估藥物動力學性質。

[0380] 將 XTEN 及 VWF 之 D'D3 區併入 rFVIII 中導致融合蛋白之清除與內源性 VWF 解除關聯同時延長其循環半衰期。呈此融合組態之 FVIII 被完全遮蔽而不與 VWF 相互作用，如藉由生物層干涉量測術(Octet)分析所量測。與此一致，發現其在 HemA 及 DKO 小鼠中之藥物動力學概況相同，從而指示其在小鼠中之清除速率與 VWF 有效斷開關聯。對 XTEN 長度及用於插入 XTEN 之位置之最佳化鑒別出一子組超過 VWF 限制(16 小時)之蛋白質，其在 HemA 小鼠中達到長達 30 小時之循環半衰期，表示相比於 BDD-FVIII，得到 4 倍改良。重要的是，此等蛋白質維持其功能性，如藉由 FVIII 顯色分析所判斷。

[0381] VWF 依賴性對治療性 FVIII 之半衰期造成了根本限制。藉由融合 VWF 之 D'D3 區及 XTEN 來使 FVIII 與

VWF 清除路徑解除關聯同時延長半衰期已產生了半衰期延長 4 倍之新穎 FVIII 分子。此為首次報導在長效 FVIII 之開發中經由全行業努力觀測到工程改造 FVIII 已超過半衰期限制，此表示在預防性治療 A 型血友病方面之潛在顯著進步。

表25：FVIII-XTEN-Fc及VWF-Fc構築體之蛋白質序列

FVIII 195蛋白質序列(在胺基酸1656及1900處具有兩個144 AE XTEN之雙鏈FVIII(Fc))(SEO ID NO: 105)

1	MQIELSTCFF	LCLLRFCFSA	TRRYYLGAWE	LSWDYMQSDL	GELPVDARFP
51	PRVPKSFPPN	TSVVYKKTLE	VEFTDHLFNI	AKPRPPWMGL	LGPTIQAEVY
101	DTVVITLKNM	ASHPVSLHAV	GVSYWKASEG	AEYDDQTSQR	EKEDDKVFPG
151	GSHTYVWQVL	KENGPMASDP	LCLTYSYLSH	VDLVKDLNSG	LIGALLVCRE
201	GSLAKEKTQT	LHKFILLFAV	FDEGKSWHSE	TKNSLMQDRD	AASARAWPKM
251	HTVNGYVNRS	LPGLIGCHRK	SVYWHVIGMG	TTPEVHSIFL	EGHTFLVRNH
301	RQASLEISPI	TFLTAQTLLM	DLGQFLLFCH	ISSHQHDGME	AYVKVDSCPE
351	EPQLRMKNNE	EAEDYDDDLT	DSEMDVVRFD	DDNSPSFIQI	RSVAKKHPKT
401	WVHYIAAEEE	DWDYAPLVLA	PDDRSYKSQY	LNNGPQRIGR	KYKKVRFMAY
451	TDETFKTREA	IQHESGILGP	LLYGEVGDTL	LIIFKNQASR	PYNIYPHGIT
501	DVRPLYSRRL	PKGVKHLKDF	PILPGEIFKY	KWTVTVEDGP	TKSDPRCLTR
551	YYSSFVNMER	DLASGLIGPL	LICYKESVDQ	RGNQIMSDKR	NVILFSVFDE
601	NRSWYL TENI	QRFLPNPAGV	QLEDPEFQAS	NIMHSINGYV	FDSLQLSVCL
651	HEVAYWYILS	IGAQTDFLSV	FFSGYTFKHK	MVYEDTLTLF	PFSGETVFMS
701	MENPGLWILG	CHNSDFRNRG	MTALLKVSSC	DKNTGDYIED	SYEDISAYLL
751	SKNNAIEPRS	FSQNPPVLKR	HQREITRTTL	QGAPGTPGSG	TASSSPGASP
801	GTSSGTSGPGA	SPGTSSGTSGP	GASPGTSSGT	SPGSSPSAST	GTGPGTPGSG
851	TASSSPGASP	GTSSGTSGPGA	SPGTSSGTSGP	GASPGTSSGT	SPGSSTPSGA
901	TGSPGSSTPS	GATGSPGASP	GTSSGTSGPAS	SSDQEEIDYD	DTISVEMKKE
951	DFDIYDEDEN	QSPRSFQKKT	RHYFIAAVER	LWDYGMSSSP	HVLNRNAQSG
1001	SVPQFKKVVF	QEFTDGSFTQ	PLYRGELNEH	LGLLGPYIRA	EVEDNIMVTF
1051	RNQASRPYSF	YSSLISYEED	QRQGAEPKRN	FVKPNETKTY	FWKVQHMAP
1101	TKDEFDCXAW	AYFSDVDLEK	DVHSGSLIGPL	LVCHTNTLNP	AHGRQVTVQE
1151	FALFFTIFDE	TKSWYFTENM	ERNCRGAPTS	ESATPESGPG	SEPATSGSET
1201	PGTSESATPE	SGPGSEPATS	GSETPGTSES	ATPESGPGTS	TEPSEGSAPG
1251	TSESATPESG	PGSPAGSPTS	TEEGSPAGSP	TSTEEGSPAG	SPTSTEEGTS
1301	ESATPESGPG	TSTEPSEGSA	PGASSAPCNI	QMEDPTFKEN	YRFHAINGYI
1351	MDTLPLGLVMA	QDQRIRWYLL	SMGSNENIHS	IHFSGHVFTV	RKKEEYKMAL
1401	YNLYPGVFET	VEMLPSKAGI	WRVECLIGEH	LHAGMSTLFL	VYSNKCQTPL
1451	GMASGHIRDF	QITASGQYQG	WAPKLARLHY	SGSINAWSTK	EPFSWIKVDL
1501	LAPMIIHGII	TQGARQKFSS	LYISQFIIMY	SLDGKKWQTY	RGNSTGTLMV
1551	FFGNVDSSGI	KHNI FNPPII	ARYIRLHPTH	YSIRSTLRME	LMGCDLNCS
1601	MPLGMESKAI	SDAQITASSY	FTNMFATWSP	SKARLHLQGR	SNAWRPQVNN
1651	PKEWLQVDFQ	KTMKVTGVTT	QGVKSLLTSM	YVKEFLISSS	QDGHQWTLFF
1701	QNGKVKVFQG	NQDSFTPVVN	SLDPPLLTRY	LRIHPQSWVH	QIALRMEVLG
1751	CEAQDLYDKT	HTCPPCPAPE	LLGGPSVFLF	PPKPKDTLMI	SRTPEVTCVV
1801	VDVSHEDPEV	KFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	EQYNSTYRVV	SVLTVLHQDW
1851	LNGKEYKCKV	SNKALPAPIE	KTISKAKGQP	REPQVYTLPP	SRDELTKNQV
1901	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT	TPPVLDSDGS	FFLYSKLTVD
1951	KSRWQQGNVF	SCSVMHEALH	NHYTQKSLSL	SPGK*	

FVIII 196蛋白質序列(在胺基酸26、1656及1900處具有三個144 AE XTEN
之雙鏈FVIIIc)(SEQ ID NO: 106)

```

1      MQIELSTCFE LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL GELPVGAPGS
51     SPSASTGTGP GSSPSASTGT GPGASPGTSS TGSPGASPGT SSTGSPGSST
101    PSGATGSPGS SPSASTGTGP GASPGTSSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
151    TASSSPGSST PSGATGSPGS STPSGATGSP GASPGTSSTG SPASSDARFP
201    PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
251    DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPQ
301    GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
351    GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
401    HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
451    RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
501    EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
551    WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
601    TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDLE LIIFKNQASR PYNIIYPHGIT
651    DVPRLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
701    YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
751    NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
801    HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEYEDTLTLF PFSGETVFMS
851    MENPGLWLIG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
901    SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQREITRTTL QGAPGTPGSG TASSSPGASP
951    GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
1001   TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSTPGA
1051   TGSPGSSTPS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SSDQEEIDYD DTISVEMKKE
1101   DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLRNRAQSG
1151   SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF

1201   RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY FWKVQHMAP
1251   TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSLGIGPL LVCHTNLTNP AHGRQVTVQE
1301   FALFFTIFDE TKSIFYTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG SEPATSGSET
1351   PGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG
1401   TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGSP TSTEEGSPAG SPTSTEEGTS
1451   ESATPESGPG TSTEPSEGS A PGASSAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
1501   MDTLPLGLVMA QDQIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL
1551   YNLYPGVFET VEMPLSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
1601   GMASGHIRDF QITASGQYQG WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
1651   LAPMIIHGK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
1701   FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
1751   MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
1801   PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
1851   QNGKVVFQNG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
1901   CEAQDLYDKT HTPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
1951   VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
2001   LNGKEYKCKV SNKALPAIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
2051   SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSKLTVD
2101   KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

```

FVIII 199蛋白質序列(在胺基酸1656及1900處具有三個144 AE XTEN
之單鏈FVIII(Fc)(SEQ ID NO: 107)

1	MQIELSTCFF	LCLLRFCFSA	TRRYYLGAWE	LSWDYMQSDL	GELPVDARFP
51	PRVPKSFPPN	TSVVYKKTLE	VEFTDHLFNI	AKPRPPWMGL	LGPTIQAEVY
101	DTVVITLKNM	ASHPVSLHAV	GVSYWKASEG	AEYDDQTSQR	EKEDDKVFPF
151	GSHTYVWQVL	KENGPMASDP	LCLTYSYLSH	VDLVKDLNSG	LIGALLVCRE
201	GSLAKEKTQT	LHKFILLFAV	FDEGKSWHSE	TKNSLMQDRD	AASARAWPKM
251	HTVNGYVNR	LPGLIGCHRK	SVYWHVIGMG	TTPEVHSIFL	EGHTFLVRNH
301	RQASLEISPI	TFLTAQTLLM	DLGQFLLFCH	ISSHQHDGME	AYVKVDSCPE
351	EPQLRMKNNE	EAEDYDDDLT	DSEMDVVRFD	DDNSPSFIQI	RSVAKKHPKT
401	WVHYIAAEEE	DWDYAPLVLA	PDDRSYKSQY	LNNGPQRIGR	KYKKVRFMAY
451	TDETFTKREA	IQHESGILGP	LLYGEVGDIT	LIIFKNQASR	PYNIYPHGIT
501	DVRPLYSRRL	PKGKHLKDF	PILPGEIFKY	KWTVTVEDGP	TKSDPRCLTR
551	YYSSFVNMR	DLASGLIGPL	LICYKESVDQ	RGNQIMSDKR	NVILFSVFDE
601	NRSWYLTEI	QRFLPNPAGV	QLEDPEFQAS	NIMHSINGYV	FDSLQLSVCL
651	HEVAYWYIL	IGAQTDFLSV	FFSGYTFKHK	MVYEDTLTLF	PFSGETVFMS
701	MENPGLWIL	CHNSDFNRG	MTALLKVSSC	DKNTGDYED	SYEDISAYLL
751	SKNNAIEPRS	FSQNPPVLKR	HQAEITRTTL	QGAPGTPGSG	TASSSPGASP
801	GTSTGSPGA	SPGTSTGSP	GASPGTSTG	SPGSSPSAST	GTGPGTPGSG
851	TASSSPGASP	GTSTGSPGA	SPGTSTGSP	GASPGTSTG	SPGSSTPSGA
901	TGSPGSSTPS	GATGSPGASP	GTSTGSPAS	SSDQEEIDYD	DTISVEMKKE
951	DFDIYDEDE	QSPRSFQKKT	RHYFIAAVER	LWDYGMSSSP	HVLRNRAQSG
1001	SVPQFKKVVF	QEFTDGSFTQ	PLYRGELNEH	LGLLGPYIRA	EVEDNIMVTF
1051	RNQASRPYSF	YSSLISYEED	QRQGAEPKRN	FVKPNETKTY	FWKVQHMAP
1101	TKDEFDCXAW	AYFSDVDLEK	DVHSLGILGL	LVCHTNTLNP	AHGRQVTVQE
1151	FALFFTIFDE	TKSWYFTENM	ERNCRGAPTS	ESATPESGPG	SEPATSGSET
1201	PGTSESATPE	SGPGSEPATS	GSETPGTSES	ATPESGPGTS	TEPSEGSAPG
1251	TSESATPESG	PGSPAGSPTS	TEEGSPAGSP	TSTEEGSPAG	SPTSTEEGTS
1301	ESATPESGPG	TSTEPSEGS	PGASSAPCNI	QMEDPTFKEN	YRFHAINGYI
1351	MDTLPGLVMA	QDQIRWYLL	SMGSNENIHS	IHFSGHVFTV	RKKEEYKMAL
1401	YNLYPGVFET	VEMLPSKAGI	WRVECLIGEH	LHAGMSTLFL	VYSNKCQTPL
1451	GMASGHIRDF	QITASGQYQ	WAPKLARLHY	SGSINAWSTK	EPFSWIKVDL
1501	LAPMI IHGIK	TQGARQKFSS	LYISQFIIMY	SLDGKKWQTY	RGNSTGTLMV
1551	FFGNVDSSGI	KHNIFNPPII	ARYIRLHPTH	YSIRSTLRME	LMGCDLNSCS
1601	MPLGMESKAI	SDAQITASSY	FTNMFATWSP	SKARLHLQGR	SNAWRPQVNN
1651	PKEWLQVDFQ	KTMKVTGVT	QGVKSLLTSM	YVKEFLISS	QDGHQWTLFF
1701	QNGKVKVFQ	NQDSFTPVVN	SLDPPLLTRY	LRIHPQSWVH	QIALRMEVLG
1751	CEAQDLYDKT	HTCPPCPAPE	LLGGPSVFLF	PPKPKDTLMI	SRTPEVTCVV
1801	VDVSHEDPEV	KFNWYVDGVE	VHNAKTKPRE	EQYNSTYRVV	SVLTVLHQDW
1851	LNGKEYKCKV	SNKALPAPIE	KTISKAKGQP	REPQVYTLPP	SRDELTKNQV
1901	SLTCLVKGFY	PSDIAVEWES	NGQPENNYKT	TPPVLDSDGS	FFLYSKLTV
1951	KSRWQQGNVF	SCSVMHEALH	NHYTQKSLSL	SPGK*	

FVIII 201 蛋白質序列(在胺基酸26、1656及1900處具有三個144 AE XTEN
之單鏈FVIIIc)(SEQ ID NO: 108)

```

1    MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMOSDL GELPVGAPGS
51   SPSASTGTGP GSSPSASTGT GPGASPGTSS TGSPGASPGT SSTGSPGSSST
101  PSGATGSPGS SPSASTGTGP GASPGTSSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
151  TASSSPGSST PSGATGSPGS STPSGATGSP GASPGTSSTG SPASSDARFP
201  PRVPKSFPFN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
251  DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
301  GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
351  GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
401  HTVNGYVNRN LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
451  RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
501  EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
551  WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
601  TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
651  DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
701  YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
751  NRSWYLTEIN QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
801  HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS
851  MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
901  SKNNAIEPRS FSQNPVLKR HQAEITRTTL QGAPGTPGSG TASSSPGASP
951  GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
1001 TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSTPSGA
1051 TGSPGSSTPS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SSDQEEDYD DTISVEMKKE
1101 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLNRNAQSG
1151 SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
1201 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY FWKVQHMAP
1251 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNLNP AHGRQVTVQE
1301 FALFFTIFDE TKSIFYTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG SEPATSGSET
1351 PGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG
1401 TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGSP TSTEEGSPAG SPTSTEEGTS
1451 ESATPESGPG TSTEPSEGSA PGASSAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
1501 MDTLPLGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL
1551 YNLYPGVFET VEMPLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
1601 GMASGHIRDF QITASGQYGO WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
1651 LAPMIIHGKI TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
1701 FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
1751 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVMN
1801 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
1851 QNGKVQVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
1901 CEAQDLYDKT HTCPCCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
1951 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
2001 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
2051 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSKLTVD
2101 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

```

FVIII 203蛋白質序列(具有兩個AE XTEN之單鏈FVIII_{FC}；一個288AE XTEN在B域中且一個144 AE XTEN在胺基酸1900處)(SEQ ID NO: 109)

```

1    MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
51   PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
101  DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
151  GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
201  GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
251  HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
301  RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
351  EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
401  WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
451  TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDIT LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
501  DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
551  YYSFVNMNER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
601  NRSWYLTEINI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
651  HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEYEDTLTLF PFSGETVFMS
701  MENPGLWLIG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
751  SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET PGTSESATPE
801  SGPGSEPATG GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG SPAGSPTSTE
851  EGTSESATPE SGPGSEPATG GSETPGTSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG
901  SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGTS
951  ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP TSTEEGTSTE
1001 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE SGPGTSTEPS
1051 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
1101 EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVPPQFK
1151 KVVVFQFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
1201 PYSFYSSSIS YEEDQRQGAE PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
1251 CKAWAYFSDV DLEKDVHSGI IGPLLVCNTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT
1301 IFDETKSWYF TENMERNCRG APTSESATPE SGPGSEPATG GSETPGTSES
1351 ATPESGPGSE PATSGSETPG TSESATPESG PGTSTEPSEG SAPGTSESAT
1401 PESGPGSPAG SPTSTEEGSP AGSPTSTEEG SPAGSPTSTE EGTSESATPE
1451 SGPGTSTEPS EGSAPGASSA PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
1501 LVMAQDQIRI WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
1551 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC QTPLGMASGH
1601 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
1651 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
1701 SSGIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL NSCSMPLGME
1751 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
1801 VDFQKTMKVT GVTTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK
1851 VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL
1901 YDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
1951 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
2001 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV
2051 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
2101 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*

```

FVIII 204蛋白質序列(具有兩個AE XTEN之單鏈FVIIIc：一個288AE XTEN
在B域中且一個144 AE XTEN在胺基酸403處)(SEQ ID NO: 110)

```

1    MQIELSTCFE LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
51   PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
101  DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
151  GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
201  GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
251  HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
301  RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
351  EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
401  WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDGAPTSTEP SEGSAAGSPA GSPTSTEEGT
451  STEPSEGSAE GTSTEPSEGS APGTSESATP ESGPGTSTEP SEGSAAGTSE
501  SATPSGPGS EPATSGSETP GTSTEPSEGS APGTSTEPSE GSAPGTSESA
551  TPESGPGTS SATPSGPGA SSSRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
601  TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDLE LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
651  DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
701  YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
751  NRSWYLTEIN QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
801  HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEDTLTLF PFSGETVFMS
851  MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
901  SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPSGPGS SEPATSGSET PGTSESATPE
951  SGPGSEPAES GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAE SPAGSPTSTE
1001 EGTSESATPE SGPGSEPAES GSETPGTSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG
1051 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGTS
1101 ESATPSGPGS SEPATSGSET PGSEPAESGS ETPGSPAGSP TSTEEGTSTE
1151 PSEGSAAGTS TEPSEGSAE SEPATSGSET PGTSESATPE SGPGTSTEPS
1201 EGSAASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
1251 EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVPPQFK
1301 KVVFEFTDGE SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
1351 PYSFYSSLIS YEEDQRQGAE PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
1401 CKAWAYFSDV DLEKDVHSGE IGPLLCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT
1451 IFDETKSWYF TENMERNCRP PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
1501 LVMAQDQRIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
1551 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC QTPLGMASGH
1601 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
1651 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
1701 SSGIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMEMLMGCDL NSCSMPLGME
1751 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
1801 VDFQKTMKVT GVTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK
1851 VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL
1901 YDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
1951 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
2001 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELN KNQVSLTCLV
2051 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
2101 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*

```

FVIII 205蛋白質序列(具有兩個AE XTEN之單鏈FVIIIc;一個288AE XTEN
在B域中且一個144AE XTEN在胺基酸18處)(SEQ ID NO:111)

```

1   MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQGAP TSESATPESG
51  PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
101 TSTEPSEGSa PGSPAGSPTS TEEGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS
151 ESATPESGPG SPAGSPTSTE EGSPAGSPTS TEEGASSDL GELPVDARFP
201 PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
251 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPg
301 GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
351 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
401 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
451 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
501 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
551 WVHYIAEEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
601 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDLE LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
651 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
701 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
751 NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
801 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS
851 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
901 SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET PGTSESATPE
951 SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG SPAGSPTSTE
1001 EGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG
1051 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGTS
1101 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP TSTEEGTSTE
1151 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE SGPGTSTEPS
1201 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
1251 EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVPQFK
1301 KVVQEFETDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
1351 PYSFYSSLIS YEEDQRQGAE PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
1401 CKAWAYFSDV DLEKDVHSGL IGPLLVCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT
1451 IFDETKSWYF TENMERNCRa PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
1501 LVMAQDQRIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
1551 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC QTPLGMASGH
1601 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMI I
1651 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
1701 SSGIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL NSCSMPLGME
1751 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
1801 VDFQKTMKVT GVTQTGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK
1851 VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL
1901 YDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
1951 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
2001 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELt KNQVSLTCLV
2051 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
2101 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*

```

pSYN FVIII 266蛋白質序列(在胺基酸18處具有42 AE-XTEN且在B域中具有288 AE XTEN之FVIII Fc)SEQ ID NO: 112

```

1    MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQGAP GSPAGSPTST
51   EEGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPASSS DLGELPVDAR FPPRVPKSFP
101  FNTSVVYKKT LFVEFTDHLF NIAKPRPPWM GLLGPTIQAE VYDTPVITLK
151  NMASHPVSLH AVGVSYWKAS EGAEYDDQTS QREKEDDKVF PGGSHTYVWQ
201  VLKENGPMAS DPLCLTYSYL SHVDLVKDLN SGLIGALLVC REGSLAKEKT
251  QTLHKFILLF AVFDEGKSWH SETKNSLMQD RDAASARAWP KMHTVNGYVN
301  RSLPGLIGCH RKSVMYWHVIG MGTTPPEVHSI FLEGHTFLVR NHRQASLEIS
351  PITFLTAQTL LMDLGQFLLF CHISSHQHDG MEAYVKVDSC PEEPQLRMKN
401  NEEAEDYDDD LTDSEMDVVR FDDDNPSFSI QIRSVAKKHP KTWVHYIAAE
451  EEDWDYAPLV LAPDDRSYKS QYLNNGPQRI GRKYKKVRFM AYTDFTFKTR
501  EAIQHESGIL GPLLYGEVGD TLLIIFKNQA SRPYNIPYHG ITDVRPLYSR
551  RLPKGVKHLK DFPILPGEIF KYKWTVTVED GPTKSDPRCL TRYYSFVNM
601  ERDLASGLIG PLLICYKESV DQRGNQIMSD KRNVLFSVF DENRSWYLTE
651  NIQRFLPNPA GVQLEDPEFQ ASNIMHSING YVFDLQLSV CLHEVAYWYI
701  LSIGAQTDFL SVFFSGYTFK HKMVYEDTLT LFPFSGETVF MSMENPGLWI
751  LGCHNSDFRN RGMTALLKVS SCDKNTGDYI EDSYEDISAY LLSKNNAIEP
801  RSFQNGAPG TSESATPESG PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA
851  TSGSETPGTS ESATPESGPG TSTEPSEGSA PGSPAGSPTS TEEGTSESAT
901  PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG SPAGSPTSTE EGSPAGSPTS
951  TEEGTSTEPS EGSAPGTSES ATPESGPGTS ESATPESGPG TSESATPESG
1001 PGSEPATSGS ETPGSEPATS GSETPGSPAG SPTSTEEGTS TEPSEGSAPG
1051 TSTEPSEGSA PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGTSTE PSEGSAPASS
1101 PPVLKRHQAE ITRTTLQSDQ EEIDYDDTIS VEMKKEDFDI YDEDENQSPR
1151 SFQKKTRHYF IAAVERLWDY GMSSSPHVLR NRAQSGSVPQ FKKVVFQEFT
1201 DGSFTQPLYR GELNEHLGLL GPYIRAEVED NIMVTFRNQA SRPYSFYSSL
1251 ISYEEDQRQG AEPRKNFVKP NETKTYFWKV QHHMAPTKDE FDCKAWAYFS
1301 DVDLEKDVHS GLIGPLLVCN TNTLNPAHGR QVTVQEFALF FTIFDETKSW
1351 YFTENMERNR RAPCNQMED PTFKENYRFH AINGYIMDTL PGLVMAQDQR
1401 IRWYLLSMGS NENIHSIHFS GHVFTVRKKE EYKMALYNLY PGVFETVEML
1451 PSKAGIWRVE CLIGEHLHAG MSTLFLVYSN KCQTPLGMAH GHIRDFQITA
1501 SGQYQGWAPK LARLHYSISI NAWSTKEPFS WIKVDLLAPM IHHGIKTQGA
1551 RQKFSSLYIS QFIIMYSLDG KKWQTYRGNS TGTLMVFFGN VDSSGIKHNI
1601 FNPPIIARYI RLHPTHYSIR STLRMELMGC DLNSCSMPLG MESKAISDAQ
1651 ITASSYFTNM FATWSPSKAR LHLQGRSNAW RPQVNNPKEW LQVDFQKTMK
1701 VTGVTTQGVK SLLTSMYVKE FLISSQDGH QWTLFFQNGK VKVFQGNQDS
1751 FTPVVNSLDP PLLTRYLRIH PQSWVHQIAL RMEVLGCEAQ DLYDKTHTCP
1801 PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
1851 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA
1901 LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
1951 AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV
2001 MHEALHNHYT QKSLSLSPGK *

```

pSYN FVIII 267蛋白質序列(在胺基酸18處具有72 AE-XTEN且在B域中具有288 AE XTEN之FVIII Fc)SEQ ID NO: 113

1	MQIELSTCF	LCLLRFCFSA	TRRYLGA	LSWDYMQGAP	TSESATPESG
51	PGSEPATSGS	ETPGTSESAT	PESGPGSEPA	TSGSETPGTS	ESATPESGPG
101	TSTEPSEGS	PGASSDLGE	LPVDARFPPR	VPKSFPFNTS	VVYKTLFVE
151	FTDHLFNI	AKPRPPWMGLL	GPTIQAEVYDT	VVITLKNMAS	HPVSLHAVGV
201	SYWKASEGAE	YDDQTSQREK	EDDKVFP	GGSHTYVWQVLKE	NGPMASDPLC
251	LTYSYL	SHVDLVKDLNSGLI	GALLVCREGS	LAKEKTQTLH	KFILLFAVFD
301	EGKSWHSETK	NSLMQDRDAA	SARAWPKMHT	VNGYVNRSLP	GLIGCHRKSV
351	YWHVIGMGT	TPEVHSIFLEG	HTFLVRNHRQ	ASLEISPITF	LTAQTLLMDL
401	GQFLLFCHIS	SHQHDGMEAY	VKVDSCPEEP	QLRMKNNEEA	EDYDDDLTDS
451	EMDVVR	FDNNSPSFIQIRS	VAKKHPKTWV	HYIAAEEEDW	DYAPLVLPD
501	DRSYKSQYLN	NGPQRIGRKY	KKVRFMAYTD	ETFKTREAIQ	HESGILGPLL
551	YGEVGD	TLLIIFKNQASRPY	NIYPHGITDV	RPLYSRRLPK	GVKHLKDFPI
601	LPGEIFKYKW	TVTVEDGPTK	SDPRCLTRY	YSSFVNMERDL	ASGLIGPLLI
651	CYKESVDQRG	NQIMSDKRN	VILFSVFDENR	SWYLTENIQR	FLPNPAGVQL
701	EDPEFQASNI	MHSINGYVFD	SLQLSVCLHE	VAYWYILSIG	AQTDFLSVFF
751	SGYTFKHKMV	YEDTLTLFPF	SGETVFM	SME NPGLWILGCH	NSDFRNRGMT
801	ALLKVSSCDK	NTGDYEDSY	EDISAYLLSK	NNAIEPR	SFSQNGAPGTSES
851	ATPESGPGSE	PATSGSETPG	TSESATPESG	PGSEPATSGS	ETPGTSESAT
901	PESGPGTSTE	PSEGSAPGSP	AGSPTSTE	EGTSESATPESG	PGSEPATSGS
951	ETPGTSESAT	PESGPGSPAG	SPTSTE	EGSPAGSPTSTE	EGTSTEPSEGS
1001	PGTSESATPE	SGPGTSESAT	PESGPGTSES	ATPESGPGSE	PATSGSETPG
1051	SEPATSGSET	PGSPAGSPTS	TEEGTSTEPS	EGSAPGTSTE	PSEGSAPGSE
1101	PATSGSETPG	TSESATPESG	PGTSTEPSEG	SAPASSPPVL	KRHQAEITRT
1151	TLQSDQEEID	YDDTISVEMK	KEDFDIYDED	ENQSPRSFQK	KTRHYFIAAV
1201	ERLWDYGMSS	SPHVLNRNAQ	SGSV	PQFKKV VFQEFTDGSF	TQPLYRGELN
1251	EHLGLLGPYI	RAEVEDNIMV	TFRNQASRPY	SFYSSLISYE	EDQRQGAEP
1301	KNFVKPNETK	TYFWKVQH	HM APTKDEFDCK	AWAYFSDVDL	EKDVHSG
1351	PLLVCHTNTL	NPAHGRQVTV	QEFALFFTIF	DETKSWYFTE	NMERNCRAPC
1401	NIQMEDPTFK	ENYRFHAING	YIMDTLPGLV	MAQDQIRRWY	LLSMGSNENI
1451	HSIHFSGHVF	TVRKKEEYKM	ALYNLYPGVF	ETVEM	LPSKAGIWRVECLIG
1501	EHLHAGMSTL	FLVYSNKCQT	PLGMASGHIR	DFQITASGQY	GQWAPKLARL
1551	HYSGSINAWS	TKEPFSWIKV	DLLAPMI	IHG IKTQGARQKF	SSLYISQFII
1601	MYSLDGKKWQ	TYRGNSTGTL	MVFFGNVDSS	GIKHNIFNPP	IIARYIRLHP
1651	THYSIRSTLR	MELMGCDLNS	CSMPLGMESK	AISDAQITAS	SYFTNM
1701	SPSKARLHLQ	GRSNAWRPQV	NNPKEWLQVD	FQKTMKVTGV	TTQGVKSLLT
1751	SMYVKEFLIS	SSQDGHQWTL	FFQNGKV	KVF QGNQDSFTP	VVNSLDPPLLT
1801	RYLRIHPQSW	VHQIALRMEV	LGCEAQDLYD	KTHTCPPCPA	PELLGGPSVF
1851	LFPKPKD	TL MISRTPEVTC	VVVDVSHEDP	EVKFNWYVDG	VEVHNAKTKP
1901	REEQYNSTYR	VVSVLTVLHQ	DWLNGKEYKC	KVSNKALPAP	IEKTISKAKG
1951	QPREPQVYTL	PPSRDELTKN	QVSLTCLVK	G FYP	SDIAVEW ESNGQPENNY
2001	KTTTPVLDS	D GSFFLYSKLT	VDKSRWQGN	VFSCSVMHEA	LHNHYTQKSL
2051	SLSPGK*				

pSYN FVIII 268蛋白質序列(在胺基酸18處具有144 AE-XTEN之FVIII Fc)
SEQ ID NO: 114

```

1    MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQGAP TSESATPESG
51   PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
101  TSTEPSEGSa PGSPAGSPTS TEEGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS
151  ESATPESGPG SPAGSPTSTE EGSPAGSPTS TEEGASSSDL GELPVDARFP
201  PRVPKSFPFN TSVVYKTLF VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
251  DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKA SEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFP
301  GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
351  GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
401  HTVNGYVNRs LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
451  RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
501  EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
551  WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
601  TDFTFKTREa IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
651  DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
701  YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
751  NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
801  HEVAYWYILs IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEDTLTLF PFSGETVFMS
851  MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
901  SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQAEITR TTL QSDQEEIDYD DTISVEMKKE
951  DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLRNRAQSG
1001 SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
1051 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY FWKVQHMAP
1101 TKDEFDCkaw AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
1151 FALFFTIFDE TKSIFYTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
1201 MDTLPLGLVMA QDQIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMA
1251 YNLPGVFET VEMLPKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
1301 GMASGHIRDF QITASGQYQG WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
1351 LAPMIIHGIK TOGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
1401 FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
1451 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
1501 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
1551 QNGKVQVFQg NQDSFTPVVN SLDPPLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
1601 CEAQDLYDKT HTPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
1651 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
1701 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
1751 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TTPVLDSGDS FFLYSKLTVD
1801 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

```

pSYN FVIII 269蛋白質序列(在胺基酸18處具有72 AE-XTEN之FVIII Fc)
SEQ ID NO: 115

```

1    MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQGAP TSESATPESG
51   PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
101  TSTEPSEGSa PGASSSDLGE LPVDARFPPR VPKSFPFN TS VVYKTLFVE
151  FTDHLFNIaK PRPPWMLLG PTIQAEVYDT VVITLKNMAS HPVSLHAVGV
201  SYWKASEGAE YDDQTSQREK EDDKVFP GGS HTYVWQVLKE NGPMASDPLC
251  LTYSYLSHVD LVKDLNSGLI GALLVCREGS LAKEKTQTLH KFILLFAVFD
301  EGKSWHSETK NSLMQDRDAA SARAWPKMHT VNGYVNRSLP GLIGCHRKSV
351  YWHVIGMGTT PEVHSIFLEG HTFLVRNHRQ ASLEISPITF LTAQTLLMDL
401  GQFLLFCHIS SHQHDGMEAY VKVDSCPEEP QLRMKNNEEA EDYDDDLTDS
451  EMDVVRFD DD NSPSFIQIRS VAKKHPKTWV HYIAAEEEDW DYAPLVLAPD
501  DRSYKSQYLN NGPQRIGRKY KKVRFMAYTD ETFKTREAIQ HESGILGPLL
551  YGEVGD TLLI IFKNQASRPY NIYPHGITDV RPLYSRRLPK GVKHLKDFPI
601  LPGEIFKYKW TVTVEDGPTK SDPRCLTRY SSFVNMERDL ASGLIGPLLI
651  CYKESVDQRG NQIMSDKRN ILFSVFDENR SWYLTENIQR FLPNPAGVQL
701  EDPEFQASNI MHSINGYVFD SLQLSVCLHE VAYWYILSIG AQTDFLSVFF
751  SGYTFKHK MV YEDTLTLFPP SGETVFMSME NPGLWILGCH NSDFRNRGMT
801  ALLKVSSCDK NTGDYEDSY EDISAYLLSK NNAIEPRSF S QNPPVLKRHQ

```

```

851 AEITRTTLQS DQEEIDYDDT ISVEMKKEDF DIYDEDENQS PRSFQKKTRH
901 YFIAAVERLW DYGMSSSPHV LRNRAQSGSV PQFKKVVFQE FTDGSFTQPL
951 YRGELNEHLG LLGPYIRAEV EDNIMVTFRN QASRPYSFYS SLISYEEDQR
1001 QGAEPKRFV KPNETKTYFW KVQHMAPTK DEFDCWAY FSDVDLEKDV
1051 HSLGIGLLV CHTNTLPAH GRQVTVQEFA LFFTIFDETK SWYFTENMER
1101 NCRAPCNIQM EDPTFKENYR FHAINGYIMD TLPGLVMAQD QRIRWYLLSM
1151 GSNENIHSIH FSGHVFTVRK KEEYKMALYN LYPGVFETVE MLPSKAGIWR
1201 VECLIGEHLH AGMSTLFLVY SNKCQTPLGM ASGHIRDFQI TASGQYGQWA
1251 PKLARLHYSG SINAWSTKEP FSWIKVDLLA PMIIHGKIQ GARQKFSSLY
1301 ISQFIIMYSL DGKKWQTYRG NSTGTLMVFF GNVDSGSIKH NIFNPPIAR
1351 YIRLHPHTYSIRSTLRMELM GCDLNSCSMP LGMESKAISD AQITASSYFT
1401 NMFATWSPSK ARLHLQGRSN AWRPQVNNPK EWLQVDFQKT MKVTGVTTQG
1451 VKSLTSMYV KEFLISSSQD GHQWTLFFQN GKVKVFQGNQ DSFTPVVNSL
1501 DPPLLTRYLR IHPQSWVHQI ALRMEVLGCE AQDLYDKTHT CPPCPAPELL
1551 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH
1601 NAKKAPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT
1651 ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG
1701 QPENNYKTFP PVLDSGSGFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH
1751 YTQKSLSLSP GK*

```

pSYNFVIII 271蛋白質序列(在胺基酸18處具有42 AE-XTEN之FVIII Fc)
SEQ ID NO: 116

```

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQGAP GSPAGSPTST
51 EEGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPASSS DLGELPVDAR FPPRPVKSFP
101 FNTSVVYKKT LFVEFTDHLF NIAKPRPPWM GLLGPTIQAE VYDTPVITLK
151 NMASHPVSLH AVGVSYWKAS EGAEDDQTS QREKEDDKVF PGGSHTYVWQ
201 VLKENGPMAS DPLCLTYSYL SHVDLVKDLN SGLIGALLVC REGSLAKEKT
251 QTLHKFILLF AVFDEGKSWH SETKNSLMQD RDAASARAWP KMHTVNGYVN
301 RSLPGLIGCH RKSVMYWHVIG MGTTPPEVHSI FLEGHTFLVR NHRQASLEIS
351 PITFLTAQTL LMDLGQFLLF CHISSHQHDG MEAYVKVDSC PEEPQLRMKN
401 NEEAEDYDDD LTDSEMDVVR FDDDNPSFI QIRSVAKKHP KTWVHYIAAE
451 EEDWDYAPLV LAPDDRSYKS QYLNNGPQRI GRKYKKVRFM AYDDETFKTR
501 EAIQHESGIL GPLLYGEVGD TLLIIFKNQA SRPYNIIYPHG ITDVRPLYSR
551 RLPKGVKHLK DFPILPGEIF KYKWTVTVED GPTKSDPRCL TRYYSFVNM
601 ERDLASGLIG PLLICYKESV DQRGNQIMSD KRNVLFSVF DENRSWYLTE
651 NIQRFLPNPA GVQLEDPEFQ ASNIMHSING YVFDLSLQSV CLHEVAYWYI
701 LSIGAQTDFL SVFFSGYTFK HKMVYEDTLT LFPFSGETVF MSMPNGLWI
751 LGCHNSDFRN RGMTALLKVS SCDKNTGDY EDSEYEDISAY LLSKNNAIEP
801 RSFSQNPVPL KRHQAEITRT TLQSDQEEID YDDTISVEMK KEDFDIYDED
851 ENQSPRSFQK KTRHYFIAAV ERLWDYGMSS SPVHLNRNAQ SGSVPQFKKV
901 VFQESTDGSF TQPLYRGELN EHLGGLGPII RAEVEDNIMV TFRNQASRPY
951 SFYSSFLISYE EDQRQGAEPK KNFVKPNETK TYFWKVQHMM APTKDEFDCK
1001 AWAYFSDVDL EKDVHSGLIG PLLVCHTNTL NPAHGRQVTV QEFALFFTIF
1051 DETKSWYFTE NMERNCRAPC NIQMEDPTFK ENYRFHAING YIMDTLPGLV
1101 MAQDQIRIRWY LLSMGSNENI HSIHFSGHVF TVRKKEEYKM ALYNLYPGVF
1151 ETVEMLPSKA GIWRVECLIG EHLHAGMSTL FLVYSNKCQT PLGMASGHIR
1201 DFQITASGQY GQWAPKLARL HYSGSINAWS TKEPFSWIKV DLLAPMIIHG
1251 IKTQGARQKF SSLYISQFII MYSLDGKKWQ TYRGNSTGTL MVFFGNVDS
1301 GIKHNIFNPP IIRYIRLHP THYSIRSTLR MELMGCDLNS CSMP LGMESK
1351 AISDAQITAS SYFTNMFATW SPSKARLHLQ GRSNAWRPQV NNPKEWLQVD
1401 FQKTMKVTGV TTQGVKSLLT SMYVKEFLIS SSQDGHQWTL FFQNGKVKVF
1451 QGNQDSFTPV VNSLDPPLLT RYLRIHPQSW VHQIALRMEV LGCEAQDLYD
1501 KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
1551 EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
1601 KVSNAKALPA IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVK
1651 FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSG GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
1701 VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL SLSPGK*

```

pSYN FVIII蛋白質序列272(在胺基酸18處具有144 AE XTEN且在B域中
具有244 AE XTEN之FVIII-無Fc)SEQ ID NO: 117

```

1    MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQGAP TSESATPESG
51   PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
101  TSTEPSEGS A PGSPAGSPTS TEEGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS
151  ESATPESGPG SPAGSPTSTE EGSPAGSPTS TEEGASSSDL GELPVDARFP
201  PRVPKSFPPN TSVVYKKTFL VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
251  DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPF
301  GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
351  GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
401  HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
451  RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
501  EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
551  WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
601  TDETFTKREA IQHESGILGP LLYGEVGDIT LIIFKNQASR PYNIIYPHGIT
651  DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
701  YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
751  NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
801  HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS
851  MENPGLWLIG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
901  SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET PGTSESATPE
951  SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG SPAGSPTSTE
1001 EGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG
1051 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGTS
1101 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP TSTEEGTSTE
1151 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE SGPSTSTEPS
1201 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
1251 EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVPPQFK
1301 KVVVFQEFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
1351 PYSFYSSLIS YEEDQRQGA E PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
1401 CKAWAYFSDV DLEKDVHSGL IGPLLVCNTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT
1451 IFDETKSWYF TENMERNCR A PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
1501 LVMAQDQIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
1551 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TFLVYSNKC QTPLGMASGH
1601 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
1651 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
1701 SSGIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL NSCSMPLGME
1751 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
1801 VDFQKTMKVT GVTTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK
1851 VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL
1901 Y*

```

pSYN VWF 031蛋白質序列(VWF D1D2D'D3-長48 aa之凝血酶可裂解
GS連接子-Fc)SEQ ID NO: 118

1 MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFVNTFDGSM
51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
101 TVTQGDQRV MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL
151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
251 EKTLCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDHSA CSPVCPAGME
301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTECPC
351 VHSGKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECV TGQSHFKSFD
401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIETV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
451 LHNSLVKLKH GAGVAMDQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQM
501 DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
551 NAWKLHGDCQ DLQKQHS DPCALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCEL
651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCT SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVC PADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQKEYAPGE TVKIGCNTCV
851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ YVLVQDYCGS
901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVITLVE GGEIELFDGE VNVKREMKDE
951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
1001 GIONNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI
1051 MKQTMVDSSC RILTSDFVQD CNKLVDPEPY LDVCIYDTCS CESIGDCAAF
1101 CDTIAAYAHV CAQHGKVVTW RTATLCPQSC EERNLRENGY EAEWRYNSCA
1151 PACQVTCQHP EPLACPVCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGGGGSGGG
1251 GSGGGSGGG GSGGGSGGG GSVLPRGSGG GSGGGGSDK THTCP PCPAP
1301 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV
1351 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI
1401 EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
1451 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
1501 HNHYTQKSL LSPGK*

pSYN VWF 034蛋白質序列(VWF D1D2D'D3-288AE XTEN-長35 aa之
凝血酶可裂解GS連接子-Fc)SEQ ID NO: 119

```

1 MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFVNTFDGSM
51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
101 TVTQGDQRV MPYASKGLYL ETEAGYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL
151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
251 EKTLCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDHSA CSPVCPAGME
301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTECPC
351 VHS GKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD
401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIVTV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
451 LHNSLVKLKH GAGVAMDGQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQM
501 DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
551 NAWKLHGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCEL
651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCT SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFS DHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVC PADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
851 CRDRKWNCTD HVC DATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGE CQ YVLVQDYCGS
901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRV TILVE GGEIELFDGE VNVKRP MKDE
951 THFEVVESEGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI
1051 MKQTMVDSSC RILTS DVFQD CNKLVDPEPY LDVCIYDTCS CESIGDCAAF
1101 CDTIAAYAHV CAQH GKVV TW RTATLC PQSC EERNLRENGY EA EWRYNSCA
1151 PACQVTCQHP EPLACPVQCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGTSESATP
1251 ESGPGSEPAT SGSETPGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP GTSESATPES
1301 GPGTSTEPSE GSAPGSPAGS PTSTEEGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP
1351 GTSESATPES GPGSPAGSPT STEEGSPAGS PTSTEEGTST EPSEGSAPGT
1401 SESATPESGP GTSESATPES GPGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPGSEP
1451 ATSGSETPGS PAGSPTSTEE GTSTEPSEGS APGTSTEPSE GSAPGSEPAT
1501 SGSETPGTSE SATPESGPGT STEPSEGSAP DIGGGGGSGG GGS LVPRGSG
1551 GDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
1601 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
1651 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV
1701 KGFYP SDIAV EWESNGQPN NYKTT PPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
1751 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*

```

pSYN VWF 036蛋白質序列(VWF D1D2D'D-長98 aa之凝血酶可裂解GS
連接子-Fc)SEQ ID NO: 120

1	MIPARFAGVL	LALALILPGT	LCAEGTRGRS	STARCSLFGS	DFVNTFDGSM
51	YSFAGYCSYL	LAGGCQKRSF	SIIGDFQNGK	RVSLSVYLGE	FFDIHLFVNG
101	TVTQGDQRV	MPYASKGLYL	ETEAGYYKLS	GEAYGFVARI	DGSGNFQVLL
151	SDRYFNKTCG	LCGNFNIFAE	DDFMTQEGTL	TSDPYDFANS	WALSSGEQWC
201	ERASPPSSSC	NISSGEMQKG	LWEQCQLLKS	TSVFARCHPL	VDPEPFVALC
251	EKTLCECAGG	LECACPALLE	YARTCAQEGM	VLYGWTDHSA	CSPVCPAGME
301	YRQCVSPCAR	TCQSLHINEM	CQERCVDGCS	CPEGQLLEDEG	LCVESTECPC
351	VHSGKRYPPG	TSLSRDCNTC	ICRNSQWICS	NEECPGECLV	TGQSHFKSFD
401	NRYFTFSGIC	QYLLARDCQD	HSFSIVIETV	QCADDRDAVC	TRSVTVRLPG
451	LHNSLVKLKH	GAGVAMDQD	IQLPLLKGD	RIQHTVTASV	RLSYGEDLQM
501	DWDGRGRLLV	KLSPVYAGKT	CGLCGNYNGN	QGDDFLTPSG	LAEPREVDFG
551	NAWLHGDCQ	DLQKQHSDDC	ALNPRMTRFS	EEACAVLTSP	TFEACHRAVS
601	PLPYLRNCRY	DVCSCSDGRE	CLCGALASYA	AACAGRGVRV	AWREPGRCEL
651	NCPKGQVYLQ	CGTPCNLTCR	SLSYPDEECN	EACLEGCFCP	PGLYMDERGD
701	CVPKAQCPCY	YDGEIFQPED	IFSDHHTMCY	CEDGFMHCTM	SGVPGSLLPD
751	AVLSSPLSHR	SKRSLSCRPP	MVKLVCPADN	LRAEGLECTK	TCQNYDLECM
801	SMGCVSGCLC	PPGMVRHENR	CVALERCPCF	HQKEYAPGE	TVKIGCNTCV
851	CRDRKWNCTD	HVCDATCSTI	GMAHYLTFDG	LKYLFPGECQ	YVLVQDYCGS
901	NPGTFRILVG	NKGCSHPSVK	CKKRVTILVE	GGEIELFDGE	VNVKRPMKDE
951	THFEVVESGR	YIILLGKAL	SVVWDRHLSI	SVVLKQTYQE	KVCGLCGNFD
1001	GIQNNDLTSS	NLQVEEDPVD	FGNSWKVSSQ	CADTRKVPLD	SSPATCHNNI
1051	MKQTMVDSSC	RILTSDVFQD	CNKLVDPPEY	LDVCIYDTCS	CESIGDCAAF
1101	CDTIAAYAHV	CAQHGVVVTW	RTATLCPQSC	EERNLRENGY	EAEWRYNSCA
1151	PACQVTCQHP	EPLACPVCQV	EGCHAHCPPG	KILDELLQTC	VPEDCFVCE
1201	VAGRRFASGK	KVTLNPSDPE	HCQICHCDVV	NLTCEACQEP	ISGGGGSGGG
1251	GSGGGGSGGG	GSGGGGSGGG	GSGGGGSGGG	GSGGGGSGGG	GSGGGGSGGG
1301	GSGGGGSGGG	GSGGGGSGGG	GSLVPRGSGG	GSGGGGSGDK	THTCPPCPAP
1351	ELLGGPSVFL	FPPKPKDTLM	ISRTPEVTCV	VVDVSHEDPE	VKFNWYVDGV
1401	EVHNAKTKPR	EEQYNSTYRV	VSVLTVLHQD	WLNGKEYKCK	VSNKALPAPI
1451	EKTISKAKGQ	PREPQVYTLP	PSRDELTKNQ	VSLTCLVKGF	YPSDIAVEWE
1501	SNGQPENNYK	TTPPVLDSDG	SFFLYSKLTV	DKSRWQQGNV	FSCSVMEAL
1551	HNHYTQKSLS	LSPGK*			

pSYN Fc-015蛋白質序列(IgG-Fc域)SEQ ID NO: 121

1	METDTLLLV	LLLWVPGSTG	DKTHTCPPCP	APELLGGPSV	FLFPPKPKDT
51	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQYNSTY
101	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	PIEKTISKAK	GQPREPQVYT
151	LPPSRDELTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPPVLD
201	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVME	ALHNHYTQKS	LSLSPGK*

實例 15：FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 雜二聚體相較於野生型
BDD-FVIII 維持正常 FVIII 比活性。

[0382] 測定 FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 雜二聚體之
FVIII 比活性。使用兩步層析方法純化雜二聚體。依次使用
弱陰離子交換樹脂及親和層析。根據 SEC-HPLC，最終

純化產物具有可接受之純度。如藉由 FVIII 顯色分析及 A280 濃度所量測，將比活性與 B 域缺失之 FVIII(BDD-FVIII)進行比較。資料呈現於表 26 中。所有所測試分子皆表明具有與 BDD-FVIII 類似之 FVIII 比活性。藉由 SDS-PAGE 及西方墨點術確認分子之純度及分子各部分之存在。

表26：FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc雜二聚體之FVIII比活性

構築體	FVIII 207 scBDDFVIII	FVIII-66 dcBDD FVIII)	FVIII 155 / vWF31	FVIII 155 / vWF39	FVIII 169 / vWF31	FVIII 205 / vWF31	FVIII 169 / vWF34
量測到之 比活性 (IU/nmol)	1473	1592	1534	1796	1511	1345	1505

[0383] 比較 rFVIII-XTEN/D'D3 與 BDD-FVIII 在 HemA 小鼠中之半衰期(圖 15；表 27)。如圖 15 所示，rFVIII-XTEN/D'D3 達成之半衰期為由 BDD-FVIII 所達成之半衰期之四倍長。

表27：HemA小鼠中之rFVIII-XTEN/D'D3及BDD-FVIII

治療劑	5分鐘 回收率 (%)	HL (小時)	MRT (小時)	Cl (mL/hr/kg)	Vss (mL/kg)	AUC_D (hr*kg*mIU/mL/mIU)
BDD-FVIII	89	7.6	11	4.5	49.2	0.22
rFVIII-Fc	78	16	20	2.9	57.8	0.35
rFVIII-XTEN/D'D3	86	30	36	1.8	63.4	0.57

實例 16：如藉由單級 aPTT 分析所量測之 FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 雜二聚體之止血效能(FVIII 活性)

[0384] 如表 28 中所概述藉由 FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 雜二聚體之 FVIII 比 aPTT 活性來評估其止血效能。如藉由表 28 所示，儘管向 FVIII 之內域中添加 VWF D'D3 片段及插入 XTEN 會降低雜二聚體之 FVIII 比 aPTT 活性(如藉由 FVIII155/VWF031 資料及 FVIII205/VWF031 資料所指示)，但在 FVIII B 域區中或在 VWF D'D3 片段之 C 末端插入 XTEN 對 FVIII 比 aPTT 活性沒有負面影響(如藉由 FVIII169/VWF031 資料及 FVIII169/VWF034 資料所指示)。相較於雙鏈 BDD-FVIII(dcBDD-FVIII)，FVIII155/VWF031、FVIII169/VWF031、FVIII169/VWF034 及 VWF205/VWF031 顯示比 aPTT 活性分別降低 2.5 倍、2.8 倍、2.6 倍及 5.5 倍。

表28：FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc雜二聚體之FVIII比aPTT活性

構築體	FVIII 207 scBDD- FVIII	FVIII-66 dcBDD-FVIII	FVIII 155 / VWF31	FVIII 169 / VWF31	FVIII 205 / VWF31	FVIII 169 / VWF34
量測到之比 aPTT活性 (IU/nmol)	818 ± 153	1188 ± 213	448 ± 111	416 ± 70	214 ± 38	436 ± 189

FVIII 比 aPTT 分析

[0385] 將 FVIII 變異體用 aPTT 緩衝液 (0.15 M NaCl、0.05 M Tris-HCl、1% BSA，pH 7.4)稀釋至線性分析範圍(200-1.6 mU/mL)。將 50 µL 稀釋樣品或標準物依序與 50 µL 37℃ 天然人類 HemA 匯合血漿、50 µL 37℃ aPTT 試劑(ACTIN® FSL 活化腦透明質(cephaloplastin)試

劑-Dade Behring，參考編號 B4219-2)混合且在 37°C 下培育 4 分鐘。接著添加 50 μ l 20 mM CaCl_2 (Dade Behring[參考編號 ORFO37])至反應混合物中以起始凝結反應。使用各樣品之凝結時間(自添加 CaCl_2 直至開始形成凝塊之時長)，相對於用第 8 國際標準 FVIII 濃縮物產生之標準來計算 aPTT 活性。相對於各分子之藉由 OD280 量測之蛋白質濃度計算比 aPTT 活性。

實例 17：FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 雜二聚體在 HemA 小鼠尾夾放血模型中之活體內功效

[0386] 為進一步獲得雜二聚體之止血效能，以與 BDD-FVIII 進行比較之方式在 HemA 小鼠尾夾放血模型中評估 FVIII169/VWF034 及 FVIII205/VWF031 之急性功效。將 HemA 小鼠用單次靜脈內注射 200、65 及 20 IU/kg 之 BDD-FVIII 進行處理以產生尾夾損傷後失血對照量。將用 200 IU/kg 之 FVIII169/VWF034 或 FVIII205/VWF031 處理之小鼠之失血量與 BDD-FVIII 處理對照組之失血量進行比較以估計其止血效能。使用媒劑處理動物來產生模型之失血基線。如圖 16 中所示，相較於媒劑處理動物之失血量，觀測到所有 FVIII 處理組之失血量皆顯著降低($p < 0.05$)。FVIII169/VWF034 與 FVIII205/VWF031 兩者在 HemA 小鼠尾夾模型中均有效。相較於 BDD-FVIII，觀測到 FVIII169/VWF034 之效能低約 3 倍，如藉由由 65 IU/kg BDD-FVIII 及 200 IU/kg FVIII169/VWF034 達成之類似失

血量降低所證明。就 FVIII205/VWF034 而言，已觀測到 10 倍效能降低，如藉由由 20 IU/kg BDD-FVIII 及 200 IU/kg FVIII205/VWF031 達成之類似失血量降低所證明。

[0387] 即使 FVIII69/VWF034 及 FVIII205/VWF031 相較於 rBDD-FVIII 具有類似比 FVIII 顯色活性，但其 FVIII aPTT 活性與活體內效能兩者均由於對分子之修飾而降低。彼等資料指示 FVIII 分子之 aPTT 活性對於預測其活體內止血效能而言為比 FVIII 顯色活性更準確的量測結果。

HemA 小鼠尾夾放血模型

[0388] 使用 8-10 週齡雄性 HemA 小鼠進行研究。在尾夾損傷之前，用 50 mg/kg 克他明(Ketamine)/0.5 mg/kg 右旋美托咪啉(Dexmedetomidine)混合物麻醉小鼠且置放在 37°C 加熱板上以幫助維持體溫。接著將小鼠之尾巴浸漬在 37°C 水中 10 分鐘以擴張側靜脈。在靜脈擴張之後，經由尾靜脈注射 rFVIII 或媒劑溶液且 5 分鐘後，使用具有直緣之 11 號解剖刀切除遠端 1 cm 尾巴。將流出血液收集至 13 ml 37°C 溫熱生理食鹽水中持續 30 分鐘且接著藉由雙側開胸術在仍然處於麻醉下時對小鼠實施安樂死。在收集血液之前及之後藉由血液收集管之重量變化(以公克計)來以重量分析方式定量失血，該重量變化轉換成失血體積之毫升數(mL)(1 g 重量變化 = 1 mL 失血)。

[0389] 上文對特定實施例之描述將充分揭示本發明

之一般特性以致他人可在不脫離本發明之一般概念下，不進行過度實驗即可藉由應用此項技術技能範圍內之知識而容易地修改及/或改適對此等特定實施例進行各種應用。因此，基於本文呈現之教示及指導，意欲此等改適及修改在所揭露實施例之等效物的含義及範圍內。應瞭解本文之措辭或術語係出於描述而非限制之目的，因此本說明書之術語或措辭應由熟練技術人員根據教示及指南來解釋。

[0390] 本發明之其他實施例對於熟習此項技術者而言將藉由考慮本文揭露之本發明之說明書及實施而變得顯而易知。意欲說明書及實例被視為僅具有示範性，且本發明之真實範疇及精神由以下申請專利範圍指示。

[0391] 本文引用之所有專利及公開案皆以全文引用的方式併入本文中。

序列表

- <110> 拜健艾克麻州股份有限公司(Biogen Idec MA Inc.)
亞穆尼克斯營運公司(Amunix Operating Inc.)
- <120> 因子VIII與XTEN及范威爾邦德(VON WILLEBRAND)因子蛋白質之複合物及其用途
- <130> 2159. 365PC06/EKS/C-K/E-H
- <140> TW 102124926
- <141> 2013-07-11
- <150> US 61/840, 811
- <151> 2013-06-28
- <150> US 61/827, 158
- <151> 2013-05-24
- <150> US 61/801, 544
- <151> 2013-03-15
- <150> US 61/801, 504
- <151> 2013-03-15
- <150> US 61/759, 819
- <151> 2013-02-01
- <150> US 61/670, 401
- <151> 2012-07-11
- <160> 140
- <170> PatentIn 3.5 版
- <210> 1
- <211> 8442
- <212> DNA
- <213> 智人
- <400> 1
atgattcctg ccagatttgc cgggggtgctg cttgctctgg ccctcatttt gccagggacc 60

ctttgtgcag aaggaaactcg cggcaggtca tccacggccc gatgcagcct tttcggaagt 120

gacttcgtca acacctttga tgggagcatg tacagctttg cgggatactg cagttacctc	180
ctggcagggg gctgccagaa acgctccttc tcgattattg gggacttcca gaatggcaag	240
agagtgagcc tctccgtgta tcttggggaa ttttttgaca tccatttggt tgtcaatggt	300
accgtgacac agggggacca aagagtctcc atgccctatg cctccaaagg gctgtatcta	360
gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct atggctttgt ggccaggatc	420
gatggcagcg gcaactttca agtcctgctg tcagacagat acttcaacaa gacctgcggg	480
ctgtgtggca actttaacat ctttgcgtga gatgacttta tgaccaaga agggaccttg	540
acctcggacc cttatgactt tgccaactca tgggctctga gcagtggaga acagtgggtg	600
gaacgggcat ctcctcccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat gcagaagggc	660
ctgtgggagc agtgccagct tctgaagagc acctcgggtg ttgcccgctg ccacctctg	720
gtggaccccg agccttttgt ggccctgtgt gagaagactt tgtgtgagtg tgctgggggg	780
ctggagtgcg cctgccctgc cctcctggag tacgcccgga cctgtgccca ggagggaatg	840
gtgctgtacg gctggaccga ccacagcgcg tgcagcccag tgtgccctgc tggtatggag	900
tataggcagt gtgtgtcccc ttgcgccagg acctgccaga gcctgcacat caatgaaatg	960
tgtcaggagc gatgcgtgga tggctgcagc tgccctgagg gacagctcct ggatgaaggc	1020
ctctgcgtgg agagcaccga gtgtccctgc gtgcattccg gaaagcgcta cctccccggc	1080
acctccctct ctcgagactg caacacctgc atttgccgaa acagccagtg gatctgcagc	1140
aatgaagaat gtccagggga gtgccttgtc actgggtcaat cccacttcaa gagctttgac	1200
aacagatact tcaccttcag tgggatctgc cagtacctgc tggcccgga ttgccaggac	1260
cactccttct ccattgtcat tgagactgtc cagtgtgctg atgaccgca cgctgtgtgc	1320
acccgctccg tcaccgtccg gctgcctggc ctgcacaaca gccttgtaa actgaagcat	1380
ggggcaggag ttgccatgga tggccaggac atccagctcc ccctcctgaa aggtgacctc	1440

cgcatccagc atacagtac ggcctccgtg cgcctcagct acggggagga cctgcagatg	1500
gactgggatg gccgcgggag gctgctggtg aagctgtccc ccgtctatgc cgggaagacc	1560
tgcggcctgt gtgggaatta caatggcaac cagggcgacg acttccttac cccctctggg	1620
ctggcrgagc cccgggtgga ggacttcggg aacgcctgga agctgcacgg ggactgccag	1680
gacctgcaga agcagcacag cgatccctgc gccctcaacc cgcgcatgac caggttctcc	1740
gaggaggcgt gcgcggtcct gacgtccccc acattcgagg cctgccatcg tgccgtcagc	1800
ccgtcgccct acctgcggaa ctgccgctac gacgtgtgct cctgctcgga cggccgcgag	1860
tgctgtgctg gcgccctggc cagctatgcc gcggcctgcg cggggagagg cgtgcgcgtc	1920
gcgtggcgcg agccaggccg ctgtgagctg aactgcccga aaggccaggt gtacctgcag	1980
tgcgggaccc cctgcaacct gacctgccgc tctctctctt acccgatga ggaatgcaat	2040
gaggcctgcc tggagggtg cttctgcccc ccagggtctt acatggatga gaggggggac	2100
tgctgcccga aggccagtg cccctgttac tatgacggtg agatcttcca gccagaagac	2160
atcttctcag accatcacac catgtgctac tgtgaggatg gttcatgca ctgtaccatg	2220
agtgaggatc ccggaagctt gctgcctgac gctgtcctca gcagtccct gtctcatgc	2280
agcaaaagga gcctatcctg tcggcccccc atggtcaagc tgggtgtgtc cgctgacaac	2340
ctgcgggctg aagggtcga gtgtacaaa acgtgccaga actatgacct ggagtgcag	2400
agcatgggct gtgtctcttg ctgcctctgc cccccgggca tggtcggca tgagaacaga	2460
tgtgtggccc tggaaggtg tccctgcttc catcaggga aggagtatgc ccctggagaa	2520
acagtgaaga ttggctgcaa cacttgtgtc tgtcgggacc ggaagtggaa ctgcacagac	2580
catgtgtgtg atgccacgtg ctccacgac ggcatggccc actacctcac cttcgacggg	2640
ctcaaatacc tgttccccgg ggagtgccag tacgttctgg tgcaggatta ctgcggcagt	2700
aaccctggga cctttcgat cctagtgggg aataaggat gcagccacc ctcagtga	2760

tgcaagaaac gggtcacat cctgggtggag ggaggagaga ttgagctgtt tgacggggag	2820
gtgaatgtga agaggcccat gaaggatgag actcactttg aggtgggtgga gtctggccgg	2880
tacatcattc tgctgctggg caaagccctc tccgtgtgtc gggaccgcca cctgagcatc	2940
tccgtgttcc tgaagcagac ataccaggag aaagtgtgtg gcctgtgtgg gaattttgat	3000
ggcatccaga acaatgacct caccagcagc aacctccaag tggaggaaga ccctgtggac	3060
tttgggaact cctggaaagt gagctcgag tgtgtgaca ccagaaaagt gcctctggac	3120
tcacccctg ccacctgcca taacaacatc atgaagcaga cgatgggtgga ttcctcctgt	3180
agaatcctta ccagtgcgt cttccaggac tgcaacaagc tgggtggacc cgagccatat	3240
ctggatgtct gcatttacga cacctgtctc tgtgagtcca ttggggactg cgcctgttc	3300
tgcgacacca ttgtgccta tgcccacgtg tgtgccagc atggcaaggt ggtgacctgg	3360
aggacggcca cattgtgccc ccagagctgc gaggagagga atctccggga gaacgggtat	3420
gagtgtgagt ggcgtataa cagctgtgca cctgcctgtc aagtcacgtg tcagaccct	3480
gagccactgg cctgccctgt gcagtgtgtg gagggctgcc atgccactg ccctccagg	3540
aaaatcctgg atgagctttt gcagacctgc gttgacctg aagactgtcc agtgtgtgag	3600
gtggctggcc ggcgttttgc ctcaggaaag aaagtcacct tgaatcccag tgacctgag	3660
cactgccaga tttgccactg tgatgtgtc aacctcacct gtgaagcctg ccaggagccg	3720
ggaggcctgg tgggtgcctcc cacagatgcc ccggtgagcc ccaccactct gtatgtggag	3780
gacatctcgg aaccgccgtt gcacgatttc tactgcagca ggctactgga cctggtcttc	3840
ctgttgatg gctcctccag gctgtccgag gctgagttg aagtgtgaa ggcctttgtg	3900
gtggacatga tggagcggct gcgcatctcc cagaagtggg tccgcgtggc cgtgtgtggag	3960
taccacgacg gctcccacgc ctacatcggg ctcaaggacc ggaagcgacc gtcagagctg	4020
cggcgcattg ccagccaggt gaagtatgcg ggcagccagg tggcctccac cagcgaggtc	4080

ttgaaataca cactgttcca aatcttcagc aagatcgacc gccctgaage ctcccgcac	4140
gccctgctcc tgatggccag ccaggagccc caacggatgt cccggaactt tgtccgctac	4200
gtccagggcc tgaagaagaa gaaggtcatt gtgatcccg tgggcattgg gcccacatgcc	4260
aacctcaagc agatccgcct catcgagaag caggccccctg agaacaaggc cttcgtgctg	4320
agcagtgtgg atgagctgga gcagcaaagg gacgagatcg ttagctacct ctgtgacctt	4380
gccctgaag cccctcctcc tactctgccc cccgacatgg cacaagtcac tgtgggcccc	4440
gggtctttgg gggtttcgac cctggggccc aagaggaact ccatggttct ggatgtggcg	4500
ttcgtcctgg aaggatcgga caaaattggt gaagccgact tcaacaggag caaggagttc	4560
atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggccaggaca gcatccacgt cacggtgctg	4620
cagtactcct acatggtgac cgtggagtac ccttcagcg aggcacagtc caaaggggac	4680
atcctgcagc gggctgcgaga gatccgctac cagggcggca acaggaccaa cactgggctg	4740
gccctgcggt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc agggtgaccg ggagcaggcg	4800
cccaacctgg tctacatggt caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa gaggetgcct	4860
ggagacatcc aggtgggtgcc cattggagtg ggccctaata ccaacgtgca ggagctggag	4920
aggattggct ggcccaatgc ccctatcctc atccaggact ttgagacgct ccccgagag	4980
gtcctgacc tgggtctgca gaggtgctgc tccggagagg ggctgcagat cccaccctc	5040
tcccctgcac ctgactgcag ccagcccctg gacgtgatcc ttctcctgga tggctcctcc	5100
agtttccag cttcttattt tgatgaaatg aagagtttcg ccaaggcttt catttcaaaa	5160
gccaatatag ggctcgtct cactcaggtg tcagtgtgc agtatggaag catcaccacc	5220
attgacgtgc catggaacgt ggtcccggag aaagcccatt tgetgagcct tgtggacgtc	5280
atgcagcggg agggaggccc cagccaaatc ggggatgcct tgggctttgc tgtgcgatac	5340
ttgacttcag aaatgcatgg tgccaggccg ggagcctcaa aggcggtggt catcctggtc	5400

acggacgtct ctgtggattc agtggatgca gcagctgatg ccgccaggtc caacagagt	5460
acagtgttcc ctattggaat tggagatcgc tacgatgcag cccagctacg gatcttggca	5520
ggcccagcag gcgactccaa cgtggtgaag ctccagcgaa tcgaagacct ccctaccatg	5580
gtcaccttgg gcaattcctt cctccacaaa ctgtgctctg gatttgtag gatttgcag	5640
gatgaggatg ggaatgagaa gaggcccggg gacgtctgga ccttgccaga ccagtccac	5700
accgtgactt gccagccaga tggccagacc ttgctgaaga gtcacgggt caactgtgac	5760
cgggggctga ggcttcgtg ccctaacagc cagtcacctg ttaaagtga agagacctgt	5820
ggctgccgct ggacctgcc ctgygtgtgc acaggcagct ccactcggca catcgtgacc	5880
tttgatgggc agaatttcaa gctgactggc agctgttctt atgtcctatt tcaaacaag	5940
gagcaggacc tggaggatg tctccataat ggtgcctgca gccctggagc aaggcagggc	6000
tgcatgaaat ccatcgaggt gaagcacagt gccctctccg tcgagstgca cagtacatg	6060
gaggtgacgg tgaatgggag actggtctct gttccttacg tgggtgggaa catggaagtc	6120
aacgtttatg gtgccatcat gcatgaggtc agattcaatc accttggatc catcttcaca	6180
ttcactccac aaaacaatga gttccactg cagctcagcc ccaagacttt tgcttcaaag	6240
acgtatggtc tgtgtgggat ctgtgatgag aacggagcca atgacttcat gctgaggat	6300
ggcacagtca ccacagactg gaaaacactt gttcaggaat ggactgtgca gcggccagg	6360
cagacgtgcc agcccatcct ggaggagcag tgtcttgtcc ccgacagctc cactgccag	6420
gtcctcctct taccactgtt tgctgaatgc cacaaggtcc tggctccagc cacattctat	6480
gccatctgcc agcaggacag ttgccaccag gagcaagtgt gtgaggatg cgctcttat	6540
gcccacctct gtcggaccaa cggggtctgc gttgactgga ggacacctga tttctgtgct	6600
atgtcatgcc caccatctct ggtctacaac cactgtgagc atggctgtcc ccggcactgt	6660
gatggcaacg tgagctcctg tggggaccat ccctccgaag gctgtttctg ccctccagat	6720

aaagtcattgt tggaaggcag ctgtgtccct gaagaggcct gcactcagt catttggtgag	6780
gatggagtcc agcaccagtt cctggaagcc tgggtcccg accaccagcc ctgtcagatc	6840
tgcacatgcc tcagcgggcg gaaggtcaac tgcacaacgc agccctgccc cacggccaaa	6900
gctcccacgt gtggcctgtg tgaagtagcc cgcctccgcc agaattcaga ccagtgtgc	6960
cccagtatg agtgtgtgtg tgaccacagt agctgtgacc tgccccagt gcctcactgt	7020
gaacgtggcc tccagcccac actgaccaac cctggcgagt gcagaccaa cttcacctgc	7080
gcctgcagga aggaggagt caaaagagt tccccaccct cctgcccc gcaccgtttg	7140
cccacccttc ggaagaccca gtgtgtgat gagtatgagt gtgcctgcaa ctgtgtcaac	7200
tccacagtga gctgtccct tgggtacttg gcctcaaccg ccaccaatga ctgtggtgt	7260
accacaacca cctgccttc cgacaagggt tgtgtccacc gaagcaccat ctaccctgtg	7320
ggccagttct gggaggagg ctgcgatgtg tgcacctgca ccgacatgga ggatgccgtg	7380
atgggcctcc gcgtggccca gtgtcccg aagccctgtg aggacagctg tcggtcgggc	7440
ttcacttacg ttctgcatga aggcgagtgc tgtggaaggt gcctgccatc tgctgtgag	7500
gtggtgactg gctcaccg cggggactcc cagtcttcct ggaagagtgt cggctcccag	7560
tgggcctccc cggagaaccc ctgcctcatc aatgagtgtg tccgagtga ggaggaggtc	7620
tttatacaac aaaggaacgt ctctgcccc cagctggagg tccctgtctg cccctegggc	7680
tttcagctga gctgtaagac ctcagcgtgc tgcccaagct gtcgtgtga gcgcatggag	7740
gcctgcatgc tcaatggcac tgctattggg cccgggaaga ctgtgatgat cgatgtgtgc	7800
acgacctgcc gctgcatggt gcaggtaggg gtcctctctg gattcaagct ggagtgcagg	7860
aagaccacct gcaacccctg cccctgggt tacaaggaag aaaataacac aggtgaatgt	7920
tgtgggagat gtttgctac ggcttgacc attcagctaa gaggaggaca gatcatgaca	7980
ctgaagcgtg atgagacgt ccaggatggc tgtgatactc acttctgcaa ggtcaatgag	8040

agaggagagt acttctggga gaagagggtc acaggctgcc caccctttga tgaacacaag 8100

tgtcttgctg agggaggtaa aattatgaaa attccaggca cctgctgtga cacatgtgag 8160

gagcctgagt gcaacgacat cactgccagg ctgcagtatg tcaaggtggg aagctgtaag 8220

tctgaagtag aggtggatat ccactactgc cagggcaaat gtgccagcaa agccatgtac 8280

tccattgaca tcaacgatgt gcaggaccag tgctcctgct gctctccgac acggacggag 8340

cccatgcagg tggccctgca ctgcaccaat ggctctgttg tgtacatga ggttctcaat 8400

gccatggagt gcaaatgctc ccccaggaag tgcagcaagt ga 8442

<210> 2

<211> 2813

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(22)

<223> VWF 信號肽

<220>

<221> misc_feature

<222> (23)..(763)

<223> VWF D1D2 區域

<220>

<221> misc_feature

<222> (764)..(866)

<223> VWF D' 域

<220>

<221> misc_feature

<222> (867)..(1240)

<223> VWF D3 域

<220>

<221> misc_feature

<222> (1241).. (1479)
<223> VWF A1 域

<220>
<221> misc_feature
<222> (2016).. (2016)
<223> Xaa 可為任何天然存在之胺基酸

<400> 2

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
20 25 30

Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
35 40 45

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
50 55 60

Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
65 70 75 80

Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu
85 90 95

Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
100 105 110

Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys
115 120 125

Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
130 135 140

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
145 150 155 160

Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln
165 170 175

Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala
180 185 190

Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser
195 200 205

Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln
210 215 220

Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu
225 230 235 240

Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu
245 250 255

Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala
260 265 270

Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His
275 280 285

Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys
290 295 300

Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met
305 310 315 320

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu
 325 330 335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His
 340 345 350

Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn
 355 360 365

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys
 370 375 380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp
 385 390 395 400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg
 405 410 415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys
 420 425 430

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu
 435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val
 450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Ile Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu
 465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu
 485 490 495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu
500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn
515 520 525

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro
530 535 540

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln
545 550 555 560

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met
565 570 575

Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe
580 585 590

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
595 600 605

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly
610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu
660 665 670

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe
675 680 685

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys
690 695 700

Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp
705 710 715 720

Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met
725 730 735

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val
740 745 750

Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg
755 760 765

Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu
770 775 780

Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met
785 790 795 800

Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg
805 810 815

His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln
820 825 830

Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr
835 840 845

Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp
850 855 860

Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly
865 870 875 880

Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp
885 890 895

Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys
900 905 910

Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu
915 920 925

Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys
930 935 940

Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg
945 950 955 960

Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg
965 970 975

His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val
980 985 990

Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr
995 1000 1005

Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn
1010 1015 1020

Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro
1025 1030 1035

Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln
1040 1045 1050

Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe
1055 1060 1065

Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val
1070 1075 1080

Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala
1085 1090 1095

Cys Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln
1100 1105 1110

His Gly Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln
1115 1120 1125

Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu
1130 1135 1140

Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln
1145 1150 1155

His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys
1160 1165 1170

His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln
1175 1180 1185

Thr	Cys	Val	Asp	Pro	Glu	Asp	Cys	Pro	Val	Cys	Glu	Val	Ala	Gly
1190						1195					1200			

Arg	Arg	Phe	Ala	Ser	Gly	Lys	Lys	Val	Thr	Leu	Asn	Pro	Ser	Asp
1205						1210					1215			

Pro	Glu	His	Cys	Gln	Ile	Cys	His	Cys	Asp	Val	Val	Asn	Leu	Thr
1220						1225						1230		

Cys	Glu	Ala	Cys	Gln	Glu	Pro	Gly	Gly	Leu	Val	Val	Pro	Pro	Thr
1235						1240						1245		

Asp	Ala	Pro	Val	Ser	Pro	Thr	Thr	Leu	Tyr	Val	Glu	Asp	Ile	Ser
1250						1255						1260		

Glu	Pro	Pro	Leu	His	Asp	Phe	Tyr	Cys	Ser	Arg	Leu	Leu	Asp	Leu
1265						1270						1275		

Val	Phe	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Arg	Leu	Ser	Glu	Ala	Glu	Phe
1280						1285						1290		

Glu	Val	Leu	Lys	Ala	Phe	Val	Val	Asp	Met	Met	Glu	Arg	Leu	Arg
1295						1300						1305		

Ile	Ser	Gln	Lys	Trp	Val	Arg	Val	Ala	Val	Val	Glu	Tyr	His	Asp
1310						1315						1320		

Gly	Ser	His	Ala	Tyr	Ile	Gly	Leu	Lys	Asp	Arg	Lys	Arg	Pro	Ser
1325						1330						1335		

Glu	Leu	Arg	Arg	Ile	Ala	Ser	Gln	Val	Lys	Tyr	Ala	Gly	Ser	Gln
1340						1345						1350		

Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile
1355 1360 1365

Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu
1370 1375 1380

Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val
1385 1390 1395

Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro
1400 1405 1410

Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile
1415 1420 1425

Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val
1430 1435 1440

Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys
1445 1450 1455

Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro Asp Met
1460 1465 1470

Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu
1475 1480 1485

Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu
1490 1495 1500

Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn Arg Ser Lys
1505 1510 1515

Glu Phe	Met Glu Glu Val	Ile Gln Arg Met Asp Val	Gly Gln Asp
1520		1525	1530

Ser Ile	His Val Thr Val	Leu Gln Tyr Ser Tyr Met	Val Thr Val
1535		1540	1545

Glu Tyr	Pro Phe Ser Glu Ala	Gln Ser Lys Gly Asp	Ile Leu Gln
1550		1555	1560

Arg Val	Arg Glu Ile Arg Tyr	Gln Gly Gly Asn Arg	Thr Asn Thr
1565		1570	1575

Gly Leu	Ala Leu Arg Tyr Leu	Ser Asp His Ser Phe	Leu Val Ser
1580		1585	1590

Gln Gly	Asp Arg Glu Gln Ala	Pro Asn Leu Val Tyr	Met Val Thr
1595		1600	1605

Gly Asn	Pro Ala Ser Asp Glu	Ile Lys Arg Leu Pro	Gly Asp Ile
1610		1615	1620

Gln Val	Val Pro Ile Gly Val	Gly Pro Asn Ala Asn	Val Gln Glu
1625		1630	1635

Leu Glu	Arg Ile Gly Trp Pro	Asn Ala Pro Ile Leu	Ile Gln Asp
1640		1645	1650

Phe Glu	Thr Leu Pro Arg Glu	Ala Pro Asp Leu Val	Leu Gln Arg
1655		1660	1665

Cys Cys	Ser Gly Glu Gly Leu	Gln Ile Pro Thr Leu	Ser Pro Ala
1670		1675	1680

Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly
1685 1690 1695

Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe
1700 1705 1710

Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr
1715 1720 1725

Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val
1730 1735 1740

Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val
1745 1750 1755

Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala
1760 1765 1770

Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His Gly Ala
1775 1780 1785

Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr Asp Val
1790 1795 1800

Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg Ser Asn
1805 1810 1815

Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr Asp Ala
1820 1825 1830

Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser Asn Val
1835 1840 1845

Val	Lys	Leu	Gln	Arg	Ile	Glu	Asp	Leu	Pro	Thr	Met	Val	Thr	Leu
1850						1855						1860		

Gly	Asn	Ser	Phe	Leu	His	Lys	Leu	Cys	Ser	Gly	Phe	Val	Arg	Ile
1865						1870						1875		

Cys	Met	Asp	Glu	Asp	Gly	Asn	Glu	Lys	Arg	Pro	Gly	Asp	Val	Trp
1880						1885						1890		

Thr	Leu	Pro	Asp	Gln	Cys	His	Thr	Val	Thr	Cys	Gln	Pro	Asp	Gly
1895						1900						1905		

Gln	Thr	Leu	Leu	Lys	Ser	His	Arg	Val	Asn	Cys	Asp	Arg	Gly	Leu
1910						1915						1920		

Arg	Pro	Ser	Cys	Pro	Asn	Ser	Gln	Ser	Pro	Val	Lys	Val	Glu	Glu
1925						1930						1935		

Thr	Cys	Gly	Cys	Arg	Trp	Thr	Cys	Pro	Cys	Val	Cys	Thr	Gly	Ser
1940						1945						1950		

Ser	Thr	Arg	His	Ile	Val	Thr	Phe	Asp	Gly	Gln	Asn	Phe	Lys	Leu
1955						1960						1965		

Thr	Gly	Ser	Cys	Ser	Tyr	Val	Leu	Phe	Gln	Asn	Lys	Glu	Gln	Asp
1970						1975						1980		

Leu	Glu	Val	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Cys	Ser	Pro	Gly	Ala	Arg
1985						1990						1995		

Gln	Gly	Cys	Met	Lys	Ser	Ile	Glu	Val	Lys	His	Ser	Ala	Leu	Ser
2000						2005						2010		

Val Glu Xaa His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly Arg Leu
2015 2020 2025

Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn Val Tyr
2030 2035 2040

Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly His Ile
2045 2050 2055

Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln Leu Ser
2060 2065 2070

Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly Ile Cys
2075 2080 2085

Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly Thr Val
2090 2095 2100

Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val Gln Arg
2105 2110 2115

Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys Leu Val
2120 2125 2130

Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu Phe Ala
2135 2140 2145

Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr Ala Ile Cys
2150 2155 2160

Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val Ile Ala
2165 2170 2175

Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val Asp Trp
2180 2185 2190

Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser Leu Val
2195 2200 2205

Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp Gly Asn
2210 2215 2220

Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe Cys Pro
2225 2230 2235

Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu Glu Ala
2240 2245 2250

Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln Phe Leu
2255 2260 2265

Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys Thr Cys
2270 2275 2280

Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys Pro Thr
2285 2290 2295

Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg Leu Arg
2300 2305 2310

Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val Cys Asp
2315 2320 2325

Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu Arg Gly
2330 2335 2340

Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro Asn Phe
2345 2350 2355

Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser Pro Pro
2360 2365 2370

Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr Gln Cys
2375 2380 2385

Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser Thr Val
2390 2395 2400

Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn Asp Cys
2405 2410 2415

Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys Val His
2420 2425 2430

Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu Gly Cys
2435 2440 2445

Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met Gly Leu
2450 2455 2460

Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser Cys Arg
2465 2470 2475

Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys Gly Arg
2480 2485 2490

Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val Thr Gly Ser Pro Arg Gly
2495 2500 2505

Asp	Ser	Gln	Ser	Ser	Trp	Lys	Ser	Val	Gly	Ser	Gln	Trp	Ala	Ser
2510						2515					2520			

Pro	Glu	Asn	Pro	Cys	Leu	Ile	Asn	Glu	Cys	Val	Arg	Val	Lys	Glu
2525						2530					2535			

Glu	Val	Phe	Ile	Gln	Gln	Arg	Asn	Val	Ser	Cys	Pro	Gln	Leu	Glu
2540						2545					2550			

Val	Pro	Val	Cys	Pro	Ser	Gly	Phe	Gln	Leu	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser
2555						2560					2565			

Ala	Cys	Cys	Pro	Ser	Cys	Arg	Cys	Glu	Arg	Met	Glu	Ala	Cys	Met
2570						2575					2580			

Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Ile	Gly	Pro	Gly	Lys	Thr	Val	Met	Ile	Asp
2585						2590					2595			

Val	Cys	Thr	Thr	Cys	Arg	Cys	Met	Val	Gln	Val	Gly	Val	Ile	Ser
2600						2605					2610			

Gly	Phe	Lys	Leu	Glu	Cys	Arg	Lys	Thr	Thr	Cys	Asn	Pro	Cys	Pro
2615						2620					2625			

Leu	Gly	Tyr	Lys	Glu	Glu	Asn	Asn	Thr	Gly	Glu	Cys	Cys	Gly	Arg
2630						2635					2640			

Cys	Leu	Pro	Thr	Ala	Cys	Thr	Ile	Gln	Leu	Arg	Gly	Gly	Gln	Ile
2645						2650					2655			

Met	Thr	Leu	Lys	Arg	Asp	Glu	Thr	Leu	Gln	Asp	Gly	Cys	Asp	Thr
2660						2665					2670			

His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp Glu Lys
 2675 2680 2685

Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys Cys Leu Ala
 2690 2695 2700

Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys Cys Asp Thr
 2705 2710 2715

Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu Gln Tyr
 2720 2725 2730

Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp Ile His
 2735 2740 2745

Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser Ile Asp
 2750 2755 2760

Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro Thr Arg
 2765 2770 2775

Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly Ser Val
 2780 2785 2790

Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro
 2795 2800 2805

Arg Lys Cys Ser Lys
 2810

<210> 3
 <211> 19

<212> PRT
<213> 智人

<400> 3

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser

<210> 4
<211> 2332
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4

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
 225 230 235 240

Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
 245 250 255

Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu
 260 265 270

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

Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
 290 295 300

Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met
 305 310 315 320

Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg
 325 330 335

Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp
 340 345 350

Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe
 355 360 365

Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His
 370 375 380

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

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

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

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

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

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 Pro Ser Thr Arg
740 745 750

Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys
755 760 765

Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn
770 775 780

Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro
785 790 795 800

His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe
805 810 815

Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser
820 825 830

Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val
835 840 845

Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly
850 855 860

Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser
865 870 875 880

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

Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr Val Thr
1205 1210 1215

Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg
1220 1225 1230

Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu
1235 1240 1245

Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys
1250 1255 1260

His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu
1265 1270 1275

Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys
1280 1285 1290

Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr
1295 1300 1305

Gln Arg	Ser Lys Arg Ala Leu	Lys Gln Phe Arg Leu	Pro Leu Glu
1310	1315	1320	

Glu Thr	Glu Leu Glu Lys Arg	Ile Ile Val Asp Asp	Thr Ser Thr
1325	1330	1335	

Gln Trp	Ser Lys Asn Met Lys	His Leu Thr Pro Ser	Thr Leu Thr
1340	1345	1350	

Gln Ile	Asp Tyr Asn Glu Lys	Glu Lys Gly Ala Ile	Thr Gln Ser
1355	1360	1365	

Pro Leu	Ser Asp Cys Leu Thr	Arg Ser His Ser Ile	Pro Gln Ala
1370	1375	1380	

Asn Arg	Ser Pro Leu Pro Ile	Ala Lys Val Ser Ser	Phe Pro Ser
1385	1390	1395	

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

Ser His	Leu Pro Ala Ala Ser	Tyr Arg Lys Lys Asp	Ser Gly Val
1415	1420	1425	

Gln Glu	Ser Ser His Phe Leu	Gln Gly Ala Lys Lys	Asn Asn Leu
1430	1435	1440	

Ser Leu	Ala Ile Leu Thr Leu	Glu Met Thr Gly Asp	Gln Arg Glu
1445	1450	1455	

Val Gly	Ser Leu Gly Thr Ser	Ala Thr Asn Ser Val	Thr Tyr Lys
1460	1465	1470	

Lys Val	Glu Asn Thr Val Leu	Pro Lys Pro Asp Leu	Pro Lys Thr
1475	1480	1485	

Ser Gly	Lys Val Glu Leu Leu	Pro Lys Val His Ile	Tyr Gln Lys
1490	1495	1500	

Asp Leu	Phe Pro Thr Glu Thr	Ser Asn Gly Ser Pro	Gly His Leu
1505	1510	1515	

Asp Leu	Val Glu Gly Ser Leu	Leu Gln Gly Thr Glu	Gly Ala Ile
1520	1525	1530	

Lys Trp	Asn Glu Ala Asn Arg	Pro Gly Lys Val Pro	Phe Leu Arg
1535	1540	1545	

Val Ala	Thr Glu Ser Ser Ala	Lys Thr Pro Ser Lys	Leu Leu Asp
1550	1555	1560	

Pro Leu	Ala Trp Asp Asn His	Tyr Gly Thr Gln Ile	Pro Lys Glu
1565	1570	1575	

Glu Trp	Lys Ser Gln Glu Lys	Ser Pro Glu Lys Thr	Ala Phe Lys
1580	1585	1590	

Lys Lys	Asp Thr Ile Leu Ser	Leu Asn Ala Cys Glu	Ser Asn His
1595	1600	1605	

Ala Ile	Ala Ala Ile Asn Glu	Gly Gln Asn Lys Pro	Glu Ile Glu
1610	1615	1620	

Val Thr	Trp Ala Lys Gln Gly	Arg Thr Glu Arg Leu	Cys Ser Gln
1625	1630	1635	

Asn Pro	Pro Val	Leu Lys	Arg His	Gln Arg	Glu Ile	Thr Arg	Thr
1640			1645			1650	

Thr Leu	Gln Ser	Asp Gln	Glu Glu	Ile Asp	Tyr Asp	Asp Thr	Ile
1655			1660			1665	

Ser Val	Glu Met	Lys Lys	Glu Asp	Phe Asp	Ile Tyr	Asp Glu	Asp
1670			1675			1680	

Glu Asn	Gln Ser	Pro Arg	Ser Phe	Gln Lys	Lys Thr	Arg His	Tyr
1685			1690			1695	

Phe Ile	Ala Ala	Val Glu	Arg Leu	Trp Asp	Tyr Gly	Met Ser	Ser
1700			1705			1710	

Ser Pro	His Val	Leu Arg	Asn Arg	Ala Gln	Ser Gly	Ser Val	Pro
1715			1720			1725	

Gln Phe	Lys Lys	Val Val	Phe Gln	Glu Phe	Thr Asp	Gly Ser	Phe
1730			1735			1740	

Thr Gln	Pro Leu	Tyr Arg	Gly Glu	Leu Asn	Glu His	Leu Gly	Leu
1745			1750			1755	

Leu Gly	Pro Tyr	Ile Arg	Ala Glu	Val Glu	Asp Asn	Ile Met	Val
1760			1765			1770	

Thr Phe	Arg Asn	Gln Ala	Ser Arg	Pro Tyr	Ser Phe	Tyr Ser	Ser
1775			1780			1785	

Leu Ile	Ser Tyr	Glu Glu	Asp Gln	Arg Gln	Gly Ala	Glu Pro	Arg
1790			1795			1800	

Lys	Asn	Phe	Val	Lys	Pro	Asn	Glu	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Trp	Lys
1805						1810					1815			

Val	Gln	His	His	Met	Ala	Pro	Thr	Lys	Asp	Glu	Phe	Asp	Cys	Lys
1820						1825					1830			

Ala	Trp	Ala	Tyr	Phe	Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Glu	Lys	Asp	Val	His
1835						1840					1845			

Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Cys	His	Thr	Asn	Thr	Leu
1850						1855					1860			

Asn	Pro	Ala	His	Gly	Arg	Gln	Val	Thr	Val	Gln	Glu	Phe	Ala	Leu
1865						1870					1875			

Phe	Phe	Thr	Ile	Phe	Asp	Glu	Thr	Lys	Ser	Trp	Tyr	Phe	Thr	Glu
1880						1885					1890			

Asn	Met	Glu	Arg	Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Cys	Asn	Ile	Gln	Met	Glu
1895						1900					1905			

Asp	Pro	Thr	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Ile	Asn	Gly
1910						1915					1920			

Tyr	Ile	Met	Asp	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Met	Ala	Gln	Asp	Gln
1925						1930					1935			

Arg	Ile	Arg	Trp	Tyr	Leu	Leu	Ser	Met	Gly	Ser	Asn	Glu	Asn	Ile
1940						1945					1950			

His	Ser	Ile	His	Phe	Ser	Gly	His	Val	Phe	Thr	Val	Arg	Lys	Lys
1955						1960					1965			

Glu Glu	Tyr Lys	Met Ala	Leu Tyr	Asn Leu	Tyr Pro	Gly Val	Phe
1970			1975		1980		

Glu Thr	Val Glu	Met Leu	Pro Ser	Lys Ala	Gly Ile	Trp Arg	Val
1985			1990		1995		

Glu Cys	Leu Ile	Gly Glu	His Leu	His Ala	Gly Met	Ser Thr	Leu
2000			2005		2010		

Phe Leu	Val Tyr	Ser Asn	Lys Cys	Gln Thr	Pro Leu	Gly Met	Ala
2015			2020		2025		

Ser Gly	His Ile	Arg Asp	Phe Gln	Ile Thr	Ala Ser	Gly Gln	Tyr
2030			2035		2040		

Gly Gln	Trp Ala	Pro Lys	Leu Ala	Arg Leu	His Tyr	Ser Gly	Ser
2045			2050		2055		

Ile Asn	Ala Trp	Ser Thr	Lys Glu	Pro Phe	Ser Trp	Ile Lys	Val
2060			2065		2070		

Asp Leu	Leu Ala	Pro Met	Ile Ile	His Gly	Ile Lys	Thr Gln	Gly
2075			2080		2085		

Ala Arg	Gln Lys	Phe Ser	Ser Leu	Tyr Ile	Ser Gln	Phe Ile	Ile
2090			2095		2100		

Met Tyr	Ser Leu	Asp Gly	Lys Lys	Trp Gln	Thr Tyr	Arg Gly	Asn
2105			2110		2115		

Ser Thr	Gly Thr	Leu Met	Val Phe	Phe Gly	Asn Val	Asp Ser	Ser
2120			2125		2130		

Gly Ile	Lys His Asn Ile Phe	Asn Pro Pro Ile Ile	Ala Arg Tyr
2135	2140	2145	

Ile Arg	Leu His Pro Thr His	Tyr Ser Ile Arg Ser	Thr Leu Arg
2150	2155	2160	

Met Glu	Leu Met Gly Cys Asp	Leu Asn Ser Cys Ser	Met Pro Leu
2165	2170	2175	

Gly Met	Glu Ser Lys Ala Ile	Ser Asp Ala Gln Ile	Thr Ala Ser
2180	2185	2190	

Ser Tyr	Phe Thr Asn Met Phe	Ala Thr Trp Ser Pro	Ser Lys Ala
2195	2200	2205	

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Asp Leu Tyr
2330

<210> 5
<211> 7053
<212> DNA
<213> 智人

<400> 5
atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc 60
accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc 120
ggtagagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac 180
acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct ttccaacatc 240
gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat 300
gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct tcatgctgtt 360
gggtgtatcct actggaaagc ttctgaggga gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg 420
gagaaagaag atgataaagt cttccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggtcctg 480
aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540
gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa 600
gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta 660
tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat 720
gtgtcatctg ctggggcctg gcctaaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggtct 780

ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc	840
accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacat	900
cgccaggcgt ccttggaat ctcgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg	960
gaccttggac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacaatga tggcatggaa	1020
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaacccaac tacgaatgaa aaataatgaa	1080
gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat	1140
gatgacaact ctccttcctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact	1200
tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc	1260
cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg	1320
aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct	1380
attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaaagtgg agacacactg	1440
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact	1500
gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta caaaagggtg taaaacattt gaaggatttt	1560
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca	1620
actaaatcag atcctcggtg cctgaccgcg tattactcta gtttcgttaa tatggagaga	1680
gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa	1740
agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag	1800
aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgcttc tcccaatcc agctggagtg	1860
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtt	1920
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgagggtg catactggta cattctaagc	1980
attggagcac agactgactt cttttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa	2040
atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg	2100

atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc	2160
atgaccgcct tactgaaggt ttctagtgtg gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac	2220
agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc	2280
ttctcccaga attcaagaca ccctagcact aggcaaaagc aatttaatgc caccacaatt	2340
ccagaaaatg acatagagaa gactgaccct tggtttgac acagaacacc tatgcctaaa	2400
atacaaaatg tctcctctag tgatttgtg atgctcttgc gacagagtcc tactccacat	2460
gggctatcct tatctgatct ccaagaagcc aaatatgaga ctttttctga tgatccatca	2520
cctggagcaa tagacagtaa taacagcctg tctgaaatga cacacttcag gccacagctc	2580
catcacagtg gggacatggg atttaccctt gagtcaggcc tccaattaag attaaatgag	2640
aaactgggga caactgcagc aacagagttg aagaaacttg atttcaaagt ttctagtaca	2700
tcaaataatc tgatttcaac aattccatca gacaatttgg cagcaggtac tgataataca	2760
agttccttag gacccccaa g tatgccagtt cattatgata gtcaattaga taccactcta	2820
tttgcaaaa agtcatctcc ctttactgag tctggtggac ctctgagctt gagtgaagaa	2880
aataatgatt caaagttgtt agaatcaggt ttaatgaata gccaaagaa gttcatgggga	2940
aaaaatgtat cgtcaacaga gagtggtagg ttatttaaag ggaaaagagc tcatggacct	3000
gctttgttga ctaaagataa tgccttattc aaagttagca tctctttgtt aaagacaaac	3060
aaaacttcca ataattcagc aactaataga aagactcaca ttgatggccc atcattatta	3120
attgagaata gtccatcagt ctggcaaaat atattagaaa gtgacactga gtttaaaaaa	3180
gtgacacctt tgattcatga cagaatgctt atggacaaaa atgctacagc tttgaggcta	3240
aatcatatgt caaataaaac tacttcatca aaaaacatgg aaatgggtcca acagaaaaaa	3300
gaggggccca ttccaccaga tgcacaaaat ccagatatgt cgttctttaa gatgctattc	3360
ttgccagaat cagcaagggt gatacaaagg actcatggaa agaactctct gaactctggg	3420

caaggcccca gtccaaagca attagtatcc ttaggaccag aaaaatctgt ggaaggtcag	3480
aatttcttgt ctgagaaaaa caaagtggta gtaggaaagg gtgaatttac aaaggacgta	3540
ggactcaaag agatggtttt tccaagcagc agaaacctat ttcttactaa ctggataat	3600
ttacatgaaa ataatacaca caatcaagaa aaaaaaattc aggaagaaat agaaaagaag	3660
gaaacattaa tccaagagaa tgtagttttg cctcagatac atacagtgcac tggcactaag	3720
aatttcattga agaacctttt cttactgagc actaggcaaa atgtagaagg ttcattatgc	3780
ggggcatatg ctccagtact tcaagatttt aggtcattaa atgattcaac aaatagaaca	3840
aagaaacaca cagctcattt ctcaaaaaaa ggggaggaag aaaacttgga aggcttgga	3900
aatcaaacca agcaaattgt agagaaatat gcatgcacca caaggatatc tcctaataca	3960
agccagcaga attttgtcac gcaacgtagt aagagagctt tgaaacaatt cagactccca	4020
ctagaagaaa cagaacttga aaaaaggata attgtggatg acacctcaac ccagtggctc	4080
aaaaacatga aacatttgac cccgagcacc ctcacacaga tagactacaa tgagaaggag	4140
aaaggggcca ttactcagtc tcccttatca gattgcctta cgaggagtca tagcatccct	4200
caagcaaata gatctccatt acccattgca aaggtatcat catttccatc tattagacct	4260
atatatctga ccagggtcct attccaagac aactcttctc atcttccagc agcatcttat	4320
agaaagaaag attctggggt ccaagaaagc agtcatttct tacaaggagc caaaaaaat	4380
aacctttctt tagccattct aaccttggag atgactggtg atcaaagaga ggttggtctc	4440
ctggggacaa gtgccacaaa ttcagtcaca tacaagaaag ttgagaacac tgttctcccg	4500
aaaccagact tgcccaaac atctggcaaa gttgaattgc ttccaaaagt tcacatttat	4560
cagaaggacc tattccctac ggaaactagc aatgggtctc ctggccatct ggatctcgtg	4620
gaagggagcc ttcttcaggg aacagaggga gcgattaagt ggaatgaagc aaacagacct	4680
ggaaaagtgc cttttctgag agtagcaaca gaaagctctg caaagactcc ctccaagcta	4740

ttggatcctc ttgcttgga taaccactat ggtactcaga taccaaaaga agagtggaaa	4800
tccaagaga agtcaccaga aaaaacagct tttaagaaaa aggataccat ttgtccctg	4860
aacgcttggtg aaagcaatca tgcaatagca gcaataaatg agggacaaaa taagcccgaa	4920
atagaagtca cctgggcaaa gcaaggtagg actgaaaggc tgtgctctca aaaccaccca	4980
gtcttgaaac gccatcaacg ggaaataact cgtactactc ttcagtcaga tcaagaggaa	5040
attgactatg atgataccat atcagttgaa atgaagaagg aagattttga catttatgat	5100
gaggatgaaa atcagagccc ccgcagcttt caaaagaaaa cacgacacta ttttattgct	5160
gcagtggaga ggctctggga ttatgggatg agtagctccc cacatgttct aagaacagg	5220
gctcagagtg gcagtgtccc tcagttcaag aaagtgttt tccaggaatt tactgatggc	5280
tcctttactc agcccttata ccgtggagaa ctaaataaac atttgggact cctggggcca	5340
tatataagag cagaagtga agataatc atggttaact tcagaaatca ggccctctgt	5400
ccctattcct tctattctag ccttatttct tatgaggaag atcagaggca aggagcagaa	5460
cctagaaaaa actttgtcaa gcctaataaa accaaaactt acttttgga agtgcaacat	5520
catatggcac ccactaaaga tgagtttgac tgcaaagcct gggcttattt ctctgatgtt	5580
gacctggaaa aagatgtgca ctcaggcctg attggacccc ttctggtctg ccactaac	5640
acactgaacc ctgctcatgg gagacaagt acagtacagg aatttgcct gttttcacc	5700
atctttgatg agacaaaaag ctggtacttc actgaaaata tggaaagaaa ctgcagggt	5760
ccctgcaata tccagatgga agatcccact tttaagaga attatcgctt ccatgcaatc	5820
aatggctaca taatggatac actacctggc ttagtaatgg ctcaggatca aaggattcga	5880
tggtatctgc tcagcatggg cagcaatgaa aacatccatt ctattcattt cagtggacat	5940
gtgttcactg tacgaaaaa agaggagtat aaaatggcac tgtacaatct ctatccaggt	6000
gtttttgaga cagtggaaat gttacatcc aaagctggaa ttggcgggt ggaatgcctt	6060

attggcgagc atctacatgc tgggatgagc acactttttc tgggtgtacag caataagtgt	6120
cagactcccc tgggaatggc ttctggacac attagagatt ttcagattac agcttcagga	6180
caatatggac agtgggcccc aaagctggcc agacttcatt attccggatc aatcaatgcc	6240
tggagcacca aggagccctt ttcttgatc aaggtggatc tgttggcacc aatgattatt	6300
cacggcatca agaccaggg tggcgtcag aagtctcca gcctctacat ctctcagttt	6360
atcatcatgt atagtcttga tgggaagaag tggcagactt atcgaggaaa ttccactgga	6420
accttaatgg tcttctttgg caatgtggat tcctctggga taaaacacaa tatttttaac	6480
cctccaatta ttgctcgata catccgtttg cacccaactc attatagcat tcgcagcact	6540
cttcgcatgg agttgatggg ctgtgattta aatagttgca gcatgccatt gggaatggag	6600
agtaaagcaa tatcagatgc acagattact gcttcacct actttaccaa tatgtttgcc	6660
acctggtctc cttcaaaagc tcgacttcac ctccaaggga ggagtaatgc ctggagacct	6720
caggngaata atccaaaaga gtggctgcaa gtggacttcc agaagacaat gaaagtcaca	6780
ggagtaacta ctcagggagt aaaatctctg cttaccagca tgtatgtgaa ggagttcctc	6840
atctccagca gtcaagatgg ccatcagtgg actctctttt ttcagaatgg caaagtaaag	6900
gtttttcagg gaaatcaaga ctccctcaca cctgtggtga actctctaga cccaccgtta	6960
ctgactcgct accttcgaat tcacccccag agttgggtgc accagattgc cctgaggatg	7020
gaggttctgg gctgcgaggc acaggacctc tac	7053

- <210> 6
- <211> 1438
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> BDDD FVIII

- <400> 6

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
 225 230 235 240

Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
 245 250 255

Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu
 260 265 270

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

Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
 290 295 300

Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met
 305 310 315 320

Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg
 325 330 335

Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp
 340 345 350

Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe
355 360 365

Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His
370 375 380

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

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

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

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

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

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 Pro Pro Val Leu Lys Arg His
740 745 750

Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile
755 760 765

Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp
770 775 780

Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys
785 790 795 800

Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly
805 810 815

Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser
820 825 830

Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser
835 840 845

Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu
850 855 860

Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr
865 870 875 880

Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile
885 890 895

Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe
900 905 910

Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His
915 920 925

Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe
930 935 940

Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro
945 950 955 960

Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln
965 970 975

Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr
980 985 990

Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro
995 1000 1005

Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg
1010 1015 1020

Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu
1025 1030 1035

Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met
1040 1045 1050

Gly Ser	Asn Glu Asn Ile His	Ser Ile His Phe Ser	Gly His Val
1055	1060	1065	

Phe Thr	Val Arg Lys Lys Glu	Glu Tyr Lys Met Ala	Leu Tyr Asn
1070	1075	1080	

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

Ala Gly	Ile Trp Arg Val Glu	Cys Leu Ile Gly Glu	His Leu His
1100	1105	1110	

Ala Gly	Met Ser Thr Leu Phe	Leu Val Tyr Ser Asn	Lys Cys Gln
1115	1120	1125	

Thr Pro	Leu Gly Met Ala Ser	Gly His Ile Arg Asp	Phe Gln Ile
1130	1135	1140	

Thr Ala	Ser Gly Gln Tyr Gly	Gln Trp Ala Pro Lys	Leu Ala Arg
1145	1150	1155	

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

Phe Ser	Trp Ile Lys Val Asp	Leu Leu Ala Pro Met	Ile Ile His
1175	1180	1185	

Gly Ile	Lys Thr Gln Gly Ala	Arg Gln Lys Phe Ser	Ser Leu Tyr
1190	1195	1200	

Ile Ser	Gln Phe Ile Ile Met	Tyr Ser Leu Asp Gly	Lys Lys Trp
1205	1210	1215	

Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe
1220 1225 1230

Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro
1235 1240 1245

Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser
1250 1255 1260

Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn
1265 1270 1275

Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp
1280 1285 1290

Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr
1295 1300 1305

Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn
1310 1315 1320

Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val
1325 1330 1335

Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly
1340 1345 1350

Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile
1355 1360 1365

Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn
1370 1375 1380

Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro
1385 1390 1395

Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg
1400 1405 1410

Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu
1415 1420 1425

Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
1430 1435

<210> 7
<211> 4371
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> BDDD FVIII

<400> 7
atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc 60

accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc 120

ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac 180

acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct ttccaacatc 240

gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat 300

gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct tcatgctgtt 360

ggtgtatcct actggaaagc ttctgaggga gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg 420

gagaaagaag atgataaagt cttccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggtcctg 480

aaagagaatg gtccaatggc ctctgacca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540

gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa	600
gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta	660
tttgaatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat	720
gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggtct	780
ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc	840
accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaaccat	900
cgccaggcgt ccttggaat ctcgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg	960
gaccttggac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacaatga tggcatggaa	1020
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaacccaac tacgaatgaa aaataatgaa	1080
gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat	1140
gatgacaact ctcttccctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact	1200
tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc	1260
cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg	1320
aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct	1380
attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaagttgg agacacactg	1440
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact	1500
gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaaagggtg taaaacattt gaaggatttt	1560
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca	1620
actaaatcag atcctcggtg cctgaccgcg tattactcta gtttcgttaa tatggagaga	1680
gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa	1740
agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag	1800
aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgcttcc tccccaatcc agctggagtg	1860

cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtt	1920
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggtgg catactggta cattctaagc	1980
attggagcac agactgactt cttttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa	2040
atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg	2100
atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc	2160
atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca ctggtgatta ttacaggagc	2220
agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc	2280
ttctctcaaa acccaccagt ctgaaacgc catcaacggg aaataactcg tactactctt	2340
cagtcagatc aagaggaaat tgactatgat gataccatat cagttgaaat gaagaaggaa	2400
gattttgaca tttatgatga ggatgaaaat cagagccccc gcagctttca aaagaaaaca	2460
cgacactatt ttattgctgc agtggagagg ctctgggatt atgggatgag tagctcccca	2520
catgttctaa gaaacagggc tcagagtggc agtgtccctc agttcaagaa agttgttttc	2580
caggaattta ctgatggctc ctttactcag cccttatacc gtggagaact aaatgaacat	2640
ttgggactcc tggggccata tataagagca gaagttgaag ataatatcat ggtaactttc	2700
agaaatcagg cctctcgtcc ctattccttc tattctagcc ttatttctta tgaggaagat	2760
cagaggcaag gagcagaacc tagaaaaaac ttgtcaagc ctaatgaaac caaaacttac	2820
ttttggaaag tgcaacatca tatggcacc ctaaaagatg agtttgactg caaagcctgg	2880
gcttatttct ctgatgttga cctggaaaaa gatgtgcact caggcctgat tggaccctt	2940
ctggtctgcc acactaacac actgaaccct gctcatggga gacaagtgac agtacaggaa	3000
tttgctctgt tttcaccat ctttgatgag accaaaagct ggtacttcac tgaaaatag	3060
gaaagaaact gcagggtcc ctgcaatatc cagatggaag atcccacttt taaagagaat	3120
tatcgcttcc atgcaatcaa tggctacata atggatacac tacctggctt agtaatggct	3180

caggatcaaa ggattcgatg gtatctgctc agcatgggca gcaatgaaa catccattct	3240
attcatttca gtggacatgt gttcactgta cgaaaaaag aggagtataa aatggcactg	3300
tacaatctct atccagggtg ttttgagaca gtggaaatgt taccatccaa agctggaatt	3360
tggcgggtgg aatgccttat tggcgagcat ctacatgctg ggatgagcac actttttctg	3420
gtgtacagca ataagtgtca gactcccctg ggaatggctt ctggacacat tagagatttt	3480
cagattacag cttcaggaca atatggacag tgggccccaa agctggccag acttcattat	3540
tccggatcaa tcaatgcctg gagcaccaag gagccctttt cttggatcaa ggtggatctg	3600
ttggcaccaa tgattattca cggcataag acccagggtg cccgtcagaa gttctccagc	3660
ctctacatct ctcagtttat catcatgtat agtcttgatg ggaagaagtg gcagacttat	3720
cgaggaaatt ccactggaac cttaatggtc ttctttggca atgtggattc atctgggata	3780
aaacacaata tttttaacct tccaattatt gctcgataca tccgtttgca cccaactcat	3840
tatagcattc gcagcactct tcgcatggag ttgatgggct gtgatttaaa tagttgcagc	3900
atgccattgg gaatggagag taaagcaata tcagatgcac agattactgc ttcacctac	3960
tttaccaata tgtttgccac ctggtctcct tcaaaagctc gacttcacct ccaagggagg	4020
agtaatgcct ggagacctca ggtgaataat ccaaaagagt ggctgcaagt ggacttccag	4080
aagacaatga aagtcacagg agtaactact cagggagtaa aatctctgct taccagcatg	4140
tatgtgaagg agttcctcat ctccagcagt caagatggcc atcagtggac tctctttttt	4200
cagaatggca aagtaaaggt ttttcaggga aatcaagact cttcacacc tgtggtgaac	4260
tctctagacc caccgttact gactcgctac cttcgaattc acccccagag ttgggtgcac	4320
cagattgccc tgaggatgga ggttctgggc tgcgaggcac aggacctcta c	4371

<210> 8
 <211> 25
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 裂解位點

<400> 8

Thr Leu Asp Pro Arg Ser Phe Leu Leu Arg Asn Pro Asn Asp Lys Tyr
1 5 10 15

Glu Pro Phe Trp Glu Asp Glu Glu Lys
20 25

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 裂解位點

<400> 9

Arg Arg Arg Arg
1

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 裂解位點

<400> 10

Arg Lys Arg Arg Lys Arg
1 5

<210> 11

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 11

Arg Arg Arg Arg Ser
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 12

Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg
1 5

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 13

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg
1 5 10

<210> 14
<211> 10
<212> PRT



〈223〉 裂解位點

<400> 14

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

〈213〉 人工序列

$\langle 220 \rangle$

<223> 裂解位點

<400> 15

Thr Thr Lys Ile Lys Pro Arg
1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

〈213〉 人工序列

$\langle 220 \rangle$

〈223〉 裂解位點

<400> 16

Leu Val Pro Arg Gly
1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

〈213〉 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 17

Ala Leu Arg Pro Arg
1 5

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 18

Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr
1 5

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 19

Asp Phe Thr Arg Val Val Gly
1 5

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 20

Thr Met Thr Arg Ile Val Gly Gly
1 5

<210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 21

Ser Pro Phe Arg Ser Thr Gly Gly
1 5

<210> 22
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 22

Leu Gln Val Arg Ile Val Gly Gly
1 5

<210> 23
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 23

Pro Leu Gly Arg Ile Val Gly Gly
1 5

<210> 24
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 24

Ile Glu Gly Arg Thr Val Gly Gly
1 5

<210> 25
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 25

Leu Thr Pro Arg Ser Leu Leu Val
1 5

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 26

Leu Gly Pro Val Ser Gly Val Pro

1 5

<210> 27
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 27

Val Ala Gly Asp Ser Leu Glu Glu
1 5

<210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 28

Gly Pro Ala Gly Leu Gly Gly Ala
1 5

<210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 29

Gly Pro Ala Gly Leu Arg Gly Ala
1 5

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 30

Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Arg
1 5

<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 31

Pro Ala Leu Pro Leu Val Ala Gln
1 5

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 32

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
1 5

<210> 33

<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 33

Asp Asp Asp Lys Ile Val Gly Gly
1 5

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 34

Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
1 5

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 35

Leu Pro Lys Thr Gly Ser Glu Ser
1 5

<210> 36
<211> 42
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AE42

<400> 36

Gly Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly
1 5 10 15

Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala
 20 25 30

Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Ala Ser Ser
 35 40

<210> 37

<211> 143

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AE144

<400> 37

Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu
1 5 10 15

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly
 20 25 30

Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
 35 40 45

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Glu Pro
 50 55 60

50

55

60

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

65707580

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

859095

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

100105110

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

115120125

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

130135140

<210> 39

<211> 288

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AE288

<400> 39

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

151015

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

202530

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

354045

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr
50 55 60

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
65 70 75 80

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
85 90 95

Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu
100 105 110

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
115 120 125

Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
130 135 140

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu
145 150 155 160

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
165 170 175

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
180 185 190

Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Glu Pro
195 200 205

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
210 215 220

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
225 230 235 240

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Glu Pro
245 250 255

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
260 265 270

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
275 280 285

- <210> 40
- <211> 288
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> AG288

- <400> 40

Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser
1 5 10 15

Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr
20 25 30

Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser
35 40 45

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ser Ser
50 55 60

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

245 250 255
Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr
260 265 270

Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser
275 280 285

<210> 41
<211> 576
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AE576

<400> 41

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu
1 5 10 15

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
20 25 30

Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
35 40 45

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
50 55 60

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
65 70 75 80

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
85 90 95

Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala
100 105 110

Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
115 120 125

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
130 135 140

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala
145 150 155 160

Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
165 170 175

Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
180 185 190

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr
195 200 205

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
210 215 220

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
225 230 235 240

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
245 250 255

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
260 265 270

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
 275 280 285

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu
 290 295 300

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly
 305 310 315 320

Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
 325 330 335

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
 340 345 350

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
 355 360 365

Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
 370 375 380

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
 385 390 395 400

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
 405 410 415

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
 420 425 430

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
 435 440 445

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
450 455 460

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
465 470 475 480

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr
485 490 495

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
500 505 510

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
515 520 525

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala
530 535 540

Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
545 550 555 560

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
565 570 575

- <210> 42
- <211> 576
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> AG576

<400> 42

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

1 5 10 15

Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser
 20 25 30

Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly
 35 40 45

Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser
 50 55 60

Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser
65 70 75 80

Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser
 85 90 95

Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Thr Pro
 100 105 110

Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser
 115 120 125

Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser
130 135 140

Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser
145 150 155 160

Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr
 165 170 175

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

180 185 190

Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser
195 200 205

Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly
210 215 220

Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser
225 230 235 240

Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Thr Pro
245 250 255

Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly
260 265 270

Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser
275 280 285

Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser
290 295 300

Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser
305 310 315 320

Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser
325 330 335

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ala Ser
340 345 350

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

355 360 365

Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser
370 375 380

Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Thr Pro
385 390 395 400

Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly
405 410 415

Ala Thr Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser
420 425 430

Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Thr Pro
435 440 445

Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly
450 455 460

Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser
465 470 475 480

Pro Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ser Ser
485 490 495

Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser
500 505 510

Ser Thr Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser
515 520 525

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

530

535

540

Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser
545 550 555 560

Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser
565 570 575

<210> 43
<211> 864
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AE864

<400> 43

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu
1 5 10 15

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
20 25 30

Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
35 40 45

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
50 55 60

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
65 70 75 80

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
85 90 95

Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala
100 105 110

Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
115 120 125

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
130 135 140

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala
145 150 155 160

Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
165 170 175

Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
180 185 190

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr
195 200 205

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
210 215 220

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
225 230 235 240

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
245 250 255

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
260 265 270

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
 275 280 285

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu
 290 295 300

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly
 305 310 315 320

Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
 325 330 335

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
 340 345 350

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
 355 360 365

Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
 370 375 380

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
 385 390 395 400

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
 405 410 415

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
 420 425 430

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
 435 440 445

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
450 455 460

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
465 470 475 480

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Gly Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr
485 490 495

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
500 505 510

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
515 520 525

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala
530 535 540

Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
545 550 555 560

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
565 570 575

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Gly Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
580 585 590

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
595 600 605

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
610 615 620

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
805 810 815

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Glu Pro
820 825 830

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
835 840 845

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
850 855 860

- <210> 44
- <211> 864
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>
<223> AG864

<400> 44

Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Pro
1 5 10 15

Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr
20 25 30

Gly Thr Gly Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro
35 40 45

Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Pro
50 55 60

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



245

250

255

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

260265270

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

275280285

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

290295300

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

305310315320

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

325330335

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

340345350

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

355360365

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

370375380

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

385390395400

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

405410415

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

	420		425		430
Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ser Ser Thr					
435		440		445	
Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala					
450		455		460	
Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro					
465		470		475	480
Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ala Ser Pro					
	485		490		495
Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser					
	500		505		510
Thr Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro					
	515		520		525
Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro					
	530		535		540
Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser					
545		550		555	560
Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro					
	565		570		575
Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ser Ser Thr					
	580		585		590
Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala					

595 600 605

Ser Ser Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro
610 615 620

Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ser Ser Thr
625 630 635 640

Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala
645 650 655

Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro
660 665 670

Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ala Ser Pro
675 680 685

Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala
690 695 700

Ser Ser Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro
705 710 715 720

Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ser Ser Pro
725 730 735

Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
740 745 750

Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro
755 760 765

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

770	775	780
Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser		
785	790	795 800
Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro		
	805	810 815
Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ser Ser Thr		
	820	825 830
Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala		
	835	840 845
Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro		
	850	855 860

<210> 45
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 45

Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg
1 5

<210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 46

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg
1 5 10

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 47

Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg
1 5 10

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 48

Thr Thr Lys Ile Lys Pro Arg
1 5

<210> 49
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 49

Leu Val Pro Arg Gly
1 5

- <210> 50
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 裂解位點

<400> 50

Ala Leu Arg Pro Arg
1 5

- <210> 51
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 分選酶識別基元

- <220>
- <221> misc_feature
- <222> (3)..(3)
- <223> Xaa 可為任何天然存在之胺基酸

<400> 51

Leu Pro Xaa Thr Gly
1 5

- <210> 52
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<223> 多肽

<400> 55

His Gln Asn Ile Ser Asp Gly Lys
1 5

<210> 56
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 多肽

<400> 56

Val Ile Ser Ser His Leu Gly Gln
1 5

<210> 57
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<220>
<221> REPEAT
<222> (1).. (4)
<223> 重複 1 至 100 次

<400> 57

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 58
<211> 8
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<220>

<221> REPEAT

<222> (1).. (3)

<223> 可重複 1 至 100 次

<220>

<221> REPEAT

<222> (4).. (8)

<223> 可重複 1 至 100 次

<400> 58

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 59

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 60

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly
1 5 10 15

<210> 61

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 61

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 62

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 62

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Ser

<210> 63

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<400> 63

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<220>

<221> REPEAT

<222> (1).. (5)

<223> 可重複 1-20 次

<400> 64

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 裂解位點

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4).. (5)

<223> 裂解位點

<400> 65

Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr
1 5

<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(5)
<223> 裂解位點

<400> 66

Asp Phe Thr Arg Val Val Gly
1 5

<210> 67
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(5)
<223> 裂解位點

<400> 67

Thr Met Thr Arg Ile Val Gly Gly
1 5

<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4).. (5)
<223> 裂解位點

<400> 68

Ser Pro Phe Arg Ser Thr Gly Gly
1 5

<210> 69
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4).. (5)
<223> 裂解位點

<400> 69

Leu Gln Val Arg Ile Val Gly Gly
1 5

<210> 70
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4).. (5)
<223> 裂解位點

<400> 70

Pro Leu Gly Arg Ile Val Gly Gly
1 5

<210> 71
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4).. (5)
<223> 裂解位點

<400> 71

Ile Glu Gly Arg Thr Val Gly Gly
1 5

<210> 72
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4).. (5)
<223> 裂解位點

<400> 72

Leu Thr Pro Arg Ser Leu Leu Val
1 5

<210> 73
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4).. (5)
<223> 裂解位點

<400> 73

Leu Gly Pro Val Ser Gly Val Pro
1 5

<210> 74
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4).. (5)

<223> 裂解位點

<400> 74

Val Ala Gly Asp Ser Leu Glu Glu
1 5

<210> 75

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 裂解位點

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> 裂解位點

<400> 75

Gly Pro Ala Gly Leu Gly Gly Ala
1 5

<210> 76

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 裂解位點

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> 裂解位點

<400> 76

Gly Pro Ala Gly Leu Arg Gly Ala
1 5

<210> 77
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4).. (5)
<223> 裂解位點

<400> 77

Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Arg
1 5

<210> 78
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4).. (5)
<223> 裂解位點

<400> 78

Pro Ala Leu Pro Leu Val Ala Gln
1 5

<210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6).. (7)
<223> 裂解位點

<400> 79

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
1 5

<210> 80
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4).. (5)
<223> 裂解位點

<400> 80

Asp Asp Asp Lys Ile Val Gly Gly
1 5

<210> 81
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6).. (7)
<223> 裂解位點

<400> 81

Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro
1 5

<210> 82
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4).. (5)
<223> 裂解位點

<400> 82

Leu Pro Lys Thr Gly Ser Glu Ser
1 5

<210> 83
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 83

Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg
1 5

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 裂解位點

<400> 84

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg
1 5 10

<210> 85

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 裂解位點

<400> 85

Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg
1 5 10

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 裂解位點

<400> 86

Thr Thr Lys Ile Lys Pro Arg
1 5

<210> 87
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 87

Leu Val Pro Arg Gly
1 5

<210> 88
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 裂解位點

<400> 88

Ala Leu Arg Pro Arg Val Val Gly Gly Ala
1 5 10

<210> 89
<211> 1896
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FVIII 198

<400> 89

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
85 90 95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
100 105 110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
115 120 125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
130 135 140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
145 150 155 160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
180 185 190

Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
 195 200 205

Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
 210 215 220

Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
 225 230 235 240

Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
 245 250 255

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
 260 265 270

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
 275 280 285

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
 290 295 300

Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
 305 310 315 320

Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
 325 330 335

Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
 340 345 350

Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
 355 360 365

Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
370 375 380

Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
385 390 395 400

Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
405 410 415

Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
420 425 430

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
435 440 445

Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
450 455 460

Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
465 470 475 480

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
485 490 495

His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
500 505 510

Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
515 520 525

Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
530 535 540

Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
545 550 555 560

Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
565 570 575

Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
580 585 590

Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
595 600 605

Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
610 615 620

Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
625 630 635 640

Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
645 650 655

Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
660 665 670

Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
675 680 685

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
690 695 700

Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
705 710 715 720

Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
725 730 735

Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
740 745 750

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro
755 760 765

Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp
770 775 780

Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys
785 790 795 800

Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser
805 810 815

Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr
820 825 830

Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn
835 840 845

Ser Leu Ser Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly
850 855 860

Asp Met Val Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu
865 870 875 880

Lys Leu Gly Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys
885 890 895

Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn
 900 905 910

Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met
 915 920 925

Pro Val His Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys
 930 935 940

Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu
 945 950 955 960

Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu
 965 970 975

Ser Ser Trp Gly Lys Asn Val Ser Ser Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu
 980 985 990

Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu
 995 1000 1005

Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln
 1010 1015 1020

Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala
 1025 1030 1035

Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His
 1040 1045 1050

Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys
 1055 1060 1065

Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro
1070 1075 1080

Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro
1085 1090 1095

Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg
1100 1105 1110

Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser
1115 1120 1125

Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe
1130 1135 1140

Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln His
1145 1150 1155

His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala
1160 1165 1170

Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu
1175 1180 1185

Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala
1190 1195 1200

His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr
1205 1210 1215

Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu
1220 1225 1230

Arg	Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Cys	Asn	Ile	Gln	Met	Glu	Asp	Pro	Thr
1235						1240					1245			

Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ile	Met
1250						1255					1260			

Asp	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Met	Ala	Gln	Asp	Gln	Arg	Ile	Arg
1265						1270					1275			

Trp	Tyr	Leu	Leu	Ser	Met	Gly	Ser	Asn	Glu	Asn	Ile	His	Ser	Ile
1280						1285					1290			

His	Phe	Ser	Gly	His	Val	Phe	Thr	Val	Arg	Lys	Lys	Glu	Glu	Tyr
1295						1300					1305			

Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Pro	Gly	Val	Phe	Glu	Thr	Val
1310						1315					1320			

Glu	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ala	Gly	Ile	Trp	Arg	Val	Glu	Cys	Leu
1325						1330					1335			

Ile	Gly	Glu	His	Leu	His	Ala	Gly	Met	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	Val
1340						1345					1350			

Tyr	Ser	Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Met	Ala	Ser	Gly	His
1355						1360					1365			

Ile	Arg	Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Gln	Trp
1370						1375					1380			

Ala	Pro	Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His	Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala
1385						1390					1395			

Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu
1400 1405 1410

Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln
1415 1420 1425

Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser
1430 1435 1440

Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly
1445 1450 1455

Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys
1460 1465 1470

His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu
1475 1480 1485

His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu
1490 1495 1500

Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu
1505 1510 1515

Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe
1520 1525 1530

Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His
1535 1540 1545

Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro
1550 1555 1560

Lys	Glu	Trp	Leu	Gln	Val	Asp	Phe	Gln	Lys	Thr	Met	Lys	Val	Thr
1565						1570					1575			

Gly	Val	Thr	Thr	Gln	Gly	Val	Lys	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr
1580						1585					1590			

Val	Lys	Glu	Phe	Leu	Ile	Ser	Ser	Ser	Gln	Asp	Gly	His	Gln	Trp
1595						1600					1605			

Thr	Leu	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys	Val	Lys	Val	Phe	Gln	Gly	Asn
1610						1615					1620			

Gln	Asp	Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Val	Asn	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu
1625						1630					1635			

Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln
1640						1645					1650			

Ile	Ala	Leu	Arg	Met	Glu	Val	Leu	Gly	Cys	Glu	Ala	Gln	Asp	Leu
1655						1660					1665			

Tyr	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
1670						1675					1680			

Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
1685						1690					1695			

Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val
1700						1705					1710			

Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val
1715						1720					1725			

Asp Gly	Val Glu Val His Asn	Ala Lys Thr Lys Pro	Arg Glu Glu
1730	1735	1740	

Gln Tyr	Asn Ser Thr Tyr Arg	Val Val Ser Val Leu	Thr Val Leu
1745	1750	1755	

His Gln	Asp Trp Leu Asn Gly	Lys Glu Tyr Lys Cys	Lys Val Ser
1760	1765	1770	

Asn Lys	Ala Leu Pro Ala Pro	Ile Glu Lys Thr Ile	Ser Lys Ala
1775	1780	1785	

Lys Gly	Gln Pro Arg Glu Pro	Gln Val Tyr Thr Leu	Pro Pro Ser
1790	1795	1800	

Arg Asp	Glu Leu Thr Lys Asn	Gln Val Ser Leu Thr	Cys Leu Val
1805	1810	1815	

Lys Gly	Phe Tyr Pro Ser Asp	Ile Ala Val Glu Trp	Glu Ser Asn
1820	1825	1830	

Gly Gln	Pro Glu Asn Asn Tyr	Lys Thr Thr Pro Pro	Val Leu Asp
1835	1840	1845	

Ser Asp	Gly Ser Phe Phe Leu	Tyr Ser Lys Leu Thr	Val Asp Lys
1850	1855	1860	

Ser Arg	Trp Gln Gln Gly Asn	Val Phe Ser Cys Ser	Val Met His
1865	1870	1875	

Glu Ala	Leu His Asn His Tyr	Thr Gln Lys Ser Leu	Ser Leu Ser
1880	1885	1890	

Pro Gly Lys
1895

- <210> 90
- <211> 99
- <212> DNA
- <213> 人工序列

<220>
<223> ESC48- Fwd - VWF-D' D3, 具有 VIII 信號及 BsiW1 位點

<400> 90
tcgcgacgta cggccgccac catgcaaata gagctctcca cctgcttctt tctgtgcctt 60

ttgcgattct gctttagcct atcctgtcgg ccccccattg 99

- <210> 91
- <211> 74
- <212> DNA
- <213> 人工序列

<220>
<223> ESC51- Rev- VWF D' D3 (1-477 胺基酸) , 具有 6His 及 Not 1 位點

<400> 91
tgacctcgag cggccgctca gtggtgatgg tgatgatgcg gctcctggca ggcttcacag 60

gtgaggttga caac 74

- <210> 92
- <211> 32
- <212> DNA
- <213> 人工序列

<220>
<223> ESC 89-fwd, 具有 Nhe1 位點

<400> 92
ctcactatag ggagacccaa gctggctagc cg 32

<210> 93
<211> 43
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> ESC 91-rev, 具有 SalI

<400> 93
ctggatcccg ggagtcgact cgtcagtggt gatggtgatg atg 43

<210> 94
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 連接子

<400> 94

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40

<210> 95
<211> 92
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LW 22-FWD-VWF-D' D3, 具有 FVIII 信號序列及 BsiW1 位點

<400> 95
gcgccggccg tacgatgcaa atagagctct ccacctgctt cttctgtgc cttttgcgat 60

tctgcttttag cctatcctgt cggcccccca tg 92

<210> 96
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LW 23-Rev- Fc, 具有終止密碼子及 Not1 位點

<400> 96
tcatcaatgt atcttatcat gtctgaattc gcggccgctc atttacc 47

<210> 97
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LW24- Fwd- VWF D1D2D' D3 選殖寡聚物, 具有 BsiW1 位點

<400> 97
gcgccggccg tacgatgatt cctgccagat ttgccgggt g 41

<210> 98
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> LW27-Rev-VWF D' D3 寡聚物, 具有 EcoRV

<400> 98
ccaccgccag atatcggtc ctggcaggct tcacaggtga g 41

<210> 99
<211> 1240

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VWF-D1D2D' D3 蛋白質序列 1

<400> 99

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
20 25 30

Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
35 40 45

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
50 55 60

Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
65 70 75 80

Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu
85 90 95

Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
100 105 110

Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys
115 120 125

Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
130 135 140

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
145 150 155 160

Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln
165 170 175

Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala
180 185 190

Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser
195 200 205

Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln
210 215 220

Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu
225 230 235 240

Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu
245 250 255

Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala
260 265 270

Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His
275 280 285

Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys
290 295 300

Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met
305 310 315 320

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu
 325 330 335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His
 340 345 350

Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn
 355 360 365

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys
 370 375 380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp
 385 390 395 400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg
 405 410 415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys
 420 425 430

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu
 435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val
 450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Ile Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu
 465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu
 485 490 495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu
500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn
515 520 525

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro
530 535 540

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln
545 550 555 560

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met
565 570 575

Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe
580 585 590

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
595 600 605

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly
610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu
660 665 670

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe
675 680 685

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys
690 695 700

Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp
705 710 715 720

Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met
725 730 735

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val
740 745 750

Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg
755 760 765

Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu
770 775 780

Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met
785 790 795 800

Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg
805 810 815

His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln
820 825 830

Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr
835 840 845

Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp
850 855 860

Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly
865 870 875 880

Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp
885 890 895

Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys
900 905 910

Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu
915 920 925

Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys
930 935 940

Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg
945 950 955 960

Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg
965 970 975

His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val
980 985 990

Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr
995 1000 1005

Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn
1010 1015 1020

Ser Trp	Lys Val	Ser Ser	Gln	Cys Ala	Asp Thr	Arg	Lys Val	Pro
1025			1030			1035		

Leu Asp	Ser Ser	Pro Ala	Thr	Cys His	Asn Asn	Ile	Met Lys	Gln
1040			1045			1050		

Thr Met	Val Asp	Ser Ser	Cys	Arg Ile	Leu Thr	Ser	Asp Val	Phe
1055			1060			1065		

Gln Asp	Cys Asn	Lys Leu	Val	Asp Pro	Glu Pro	Tyr	Leu Asp	Val
1070			1075			1080		

Cys Ile	Tyr Asp	Thr Cys	Ser	Cys Glu	Ser Ile	Gly	Asp Cys	Ala
1085			1090			1095		

Cys Phe	Cys Asp	Thr Ile	Ala	Ala Tyr	Ala His	Val	Cys Ala	Gln
1100			1105			1110		

His Gly	Lys Val	Val Thr	Trp	Arg Thr	Ala Thr	Leu	Cys Pro	Gln
1115			1120			1125		

Ser Cys	Glu Glu	Arg Asn	Leu	Arg Glu	Asn Gly	Tyr	Glu Cys	Glu
1130			1135			1140		

Trp Arg	Tyr Asn	Ser Cys	Ala	Pro Ala	Cys Gln	Val	Thr Cys	Gln
1145			1150			1155		

His Pro	Glu Pro	Leu Ala	Cys	Pro Val	Gln Cys	Val	Glu Gly	Cys
1160			1165			1170		

His Ala	His Cys	Pro Pro	Gly	Lys Ile	Leu Asp	Glu	Leu Leu	Gln
1175			1180			1185		

Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly
1190 1195 1200

Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp
1205 1210 1215

Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr
1220 1225 1230

Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro
1235 1240

<210> 100

<211> 477

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VWF-D' D3 蛋白質序列 2

<400> 100

Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp
1 5 10 15

Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr
20 25 30

Asp Leu Glu Cys Met Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro
35 40 45

Pro Gly Met Val Arg His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys
50 55 60

Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys
65 70 75 80

Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr
85 90 95

Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr
100 105 110

Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr
115 120 125

Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile
130 135 140

Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys
145 150 155 160

Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly
165 170 175

Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val
180 185 190

Val Glu Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser
195 200 205

Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr
210 215 220

Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln
225 230 235 240

Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val
245 250 255

Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg
 260 265 270

Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met
 275 280 285

Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val
 290 295 300

Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val
 305 310 315 320

Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Cys
 325 330 335

Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly
 340 345 350

Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu
 355 360 365

Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn
 370 375 380

Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu
 385 390 395 400

Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro
 405 410 415

Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp
 420 425 430

Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys
435 440 445

Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys
450 455 460

Asp Val Val Asn Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro
465 470 475

<210> 101
<211> 2754
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> pSYN-FVIII-161

<400> 101

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
85 90 95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
100 105 110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
115 120 125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
130 135 140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
145 150 155 160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
180 185 190

Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
195 200 205

Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
210 215 220

Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
225 230 235 240

Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
245 250 255

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
 260 265 270

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
 275 280 285

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
 290 295 300

Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
 305 310 315 320

Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
 325 330 335

Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
 340 345 350

Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
 355 360 365

Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
 370 375 380

Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
 385 390 395 400

Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415

Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
 420 425 430

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
435 440 445

Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
450 455 460

Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
465 470 475 480

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
485 490 495

His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
500 505 510

Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
515 520 525

Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
530 535 540

Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
545 550 555 560

Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
565 570 575

Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
580 585 590

Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
595 600 605

Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
610 615 620

Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
625 630 635 640

Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
645 650 655

Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
660 665 670

Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
675 680 685

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
690 695 700

Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
705 710 715 720

Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
725 730 735

Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
740 745 750

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu
755 760 765

Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln
770 775 780

Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu
785 790 795 800

Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe
805 810 815

Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp
820 825 830

Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln
835 840 845

Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr
850 855 860

Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His
865 870 875 880

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile
885 890 895

Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser
900 905 910

Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg
915 920 925

Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val
930 935 940

Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp
945 950 955 960

Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu
965 970 975

Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His
980 985 990

Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe
995 1000 1005

Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn
1010 1015 1020

Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys
1025 1030 1035

Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr
1040 1045 1050

Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr
1055 1060 1065

Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe
1070 1075 1080

Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met
1085 1090 1095

Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met
1100 1105 1110

Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly
1115 1120 1125

Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser
1130 1135 1140

Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg
1145 1150 1155

Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro
1160 1165 1170

Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser
1175 1180 1185

Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro
1190 1195 1200

Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe
1205 1210 1215

Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp
1220 1225 1230

Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu
1235 1240 1245

Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn
1250 1255 1260

Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro
1265 1270 1275

Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly
1280 1285 1290

Cys	Asp	Leu	Asn	Ser	Cys	Ser	Met	Pro	Leu	Gly	Met	Glu	Ser	Lys
1295						1300					1305			

Ala	Ile	Ser	Asp	Ala	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Thr	Asn
1310						1315					1320			

Met	Phe	Ala	Thr	Trp	Ser	Pro	Ser	Lys	Ala	Arg	Leu	His	Leu	Gln
1325						1330					1335			

Gly	Arg	Ser	Asn	Ala	Trp	Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Glu
1340						1345					1350			

Trp	Leu	Gln	Val	Asp	Phe	Gln	Lys	Thr	Met	Lys	Val	Thr	Gly	Val
1355						1360					1365			

Thr	Thr	Gln	Gly	Val	Lys	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys
1370						1375					1380			

Glu	Phe	Leu	Ile	Ser	Ser	Ser	Gln	Asp	Gly	His	Gln	Trp	Thr	Leu
1385						1390					1395			

Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys	Val	Lys	Val	Phe	Gln	Gly	Asn	Gln	Asp
1400						1405					1410			

Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Val	Asn	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr
1415						1420					1425			

Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala
1430						1435					1440			

Leu	Arg	Met	Glu	Val	Leu	Gly	Cys	Glu	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr	Asp
1445						1450					1455			

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1460 1465 1470

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
1475 1480 1485

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
1490 1495 1500

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
1505 1510 1515

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
1520 1525 1530

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
1535 1540 1545

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
1550 1555 1560

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
1565 1570 1575

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1580 1585 1590

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
1595 1600 1605

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
1610 1615 1620

Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
1625						1630					1635			

Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
1640						1645					1650			

Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
1655						1660					1665			

Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1670						1675					1680			

Lys	Arg	Arg	Arg	Arg	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
1685						1690					1695			

Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly
1700						1705					1710			

Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Arg	Lys	Arg	Arg	Lys	Arg	Ser	Leu	Ser
1715						1720					1725			

Cys	Arg	Pro	Pro	Met	Val	Lys	Leu	Val	Cys	Pro	Ala	Asp	Asn	Leu
1730						1735					1740			

Arg	Ala	Glu	Gly	Leu	Glu	Cys	Thr	Lys	Thr	Cys	Gln	Asn	Tyr	Asp
1745						1750					1755			

Leu	Glu	Cys	Met	Ser	Met	Gly	Cys	Val	Ser	Gly	Cys	Leu	Cys	Pro
1760						1765					1770			

Pro	Gly	Met	Val	Arg	His	Glu	Asn	Arg	Cys	Val	Ala	Leu	Glu	Arg
1775						1780					1785			

Cys Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr
1790 1795 1800

Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp
1805 1810 1815

Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly
1820 1825 1830

Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe Pro
1835 1840 1845

Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn
1850 1855 1860

Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His
1865 1870 1875

Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly
1880 1885 1890

Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys Arg Pro
1895 1900 1905

Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg Tyr
1910 1915 1920

Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg
1925 1930 1935

His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys
1940 1945 1950

Val	Cys	Gly	Leu	Cys	Gly	Asn	Phe	Asp	Gly	Ile	Gln	Asn	Asn	Asp
1955						1960					1965			

Leu	Thr	Ser	Ser	Asn	Leu	Gln	Val	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	Asp	Phe
1970						1975					1980			

Gly	Asn	Ser	Trp	Lys	Val	Ser	Ser	Gln	Cys	Ala	Asp	Thr	Arg	Lys
1985						1990					1995			

Val	Pro	Leu	Asp	Ser	Ser	Pro	Ala	Thr	Cys	His	Asn	Asn	Ile	Met
2000						2005					2010			

Lys	Gln	Thr	Met	Val	Asp	Ser	Ser	Cys	Arg	Ile	Leu	Thr	Ser	Asp
2015						2020					2025			

Val	Phe	Gln	Asp	Cys	Asn	Lys	Leu	Val	Asp	Pro	Glu	Pro	Tyr	Leu
2030						2035					2040			

Asp	Val	Cys	Ile	Tyr	Asp	Thr	Cys	Ser	Cys	Glu	Ser	Ile	Gly	Asp
2045						2050					2055			

Cys	Ala	Ala	Phe	Cys	Asp	Thr	Ile	Ala	Ala	Tyr	Ala	His	Val	Cys
2060						2065					2070			

Ala	Gln	His	Gly	Lys	Val	Val	Thr	Trp	Arg	Thr	Ala	Thr	Leu	Cys
2075						2080					2085			

Pro	Gln	Ser	Cys	Glu	Glu	Arg	Asn	Leu	Arg	Glu	Asn	Gly	Tyr	Glu
2090						2095					2100			

Ala	Glu	Trp	Arg	Tyr	Asn	Ser	Cys	Ala	Pro	Ala	Cys	Gln	Val	Thr
2105						2110					2115			

Cys Gln	His Pro Glu Pro Leu	Ala Cys Pro Val Gln	Cys Val Glu
2120	2125	2130	

Gly Cys	His Ala His Cys Pro	Pro Gly Lys Ile Leu	Asp Glu Leu
2135	2140	2145	

Leu Gln	Thr Cys Val Asp Pro	Glu Asp Cys Pro Val	Cys Glu Val
2150	2155	2160	

Ala Gly	Arg Arg Phe Ala Ser	Gly Lys Lys Val Thr	Leu Asn Pro
2165	2170	2175	

Ser Asp	Pro Glu His Cys Gln	Ile Cys His Cys Asp	Val Val Asn
2180	2185	2190	

Leu Thr	Cys Glu Ala Cys Gln	Glu Pro Ile Ser Gly	Thr Ser Glu
2195	2200	2205	

Ser Ala	Thr Pro Glu Ser Gly	Pro Gly Ser Glu Pro	Ala Thr Ser
2210	2215	2220	

Gly Ser	Glu Thr Pro Gly Thr	Ser Glu Ser Ala Thr	Pro Glu Ser
2225	2230	2235	

Gly Pro	Gly Ser Glu Pro Ala	Thr Ser Gly Ser Glu	Thr Pro Gly
2240	2245	2250	

Thr Ser	Glu Ser Ala Thr Pro	Glu Ser Gly Pro Gly	Thr Ser Thr
2255	2260	2265	

Glu Pro	Ser Glu Gly Ser Ala	Pro Gly Ser Pro Ala	Gly Ser Pro
2270	2275	2280	

Thr Ser	Thr Glu Glu Gly Thr	Ser Glu Ser Ala Thr	Pro Glu Ser
2285	2290	2295	

Gly Pro	Gly Ser Glu Pro Ala	Thr Ser Gly Ser Glu	Thr Pro Gly
2300	2305	2310	

Thr Ser	Glu Ser Ala Thr Pro	Glu Ser Gly Pro Gly	Ser Pro Ala
2315	2320	2325	

Gly Ser	Pro Thr Ser Thr Glu	Glu Gly Ser Pro Ala	Gly Ser Pro
2330	2335	2340	

Thr Ser	Thr Glu Glu Gly Thr	Ser Thr Glu Pro Ser	Glu Gly Ser
2345	2350	2355	

Ala Pro	Gly Thr Ser Glu Ser	Ala Thr Pro Glu Ser	Gly Pro Gly
2360	2365	2370	

Thr Ser	Glu Ser Ala Thr Pro	Glu Ser Gly Pro Gly	Thr Ser Glu
2375	2380	2385	

Ser Ala	Thr Pro Glu Ser Gly	Pro Gly Ser Glu Pro	Ala Thr Ser
2390	2395	2400	

Gly Ser	Glu Thr Pro Gly Ser	Glu Pro Ala Thr Ser	Gly Ser Glu
2405	2410	2415	

Thr Pro	Gly Ser Pro Ala Gly	Ser Pro Thr Ser Thr	Glu Glu Gly
2420	2425	2430	

Thr Ser	Thr Glu Pro Ser Glu	Gly Ser Ala Pro Gly	Thr Ser Thr
2435	2440	2445	

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser
2450 2455 2460

Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser
2465 2470 2475

Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Asp
2480 2485 2490

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
2495 2500 2505

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Val Pro Arg
2510 2515 2520

Gly Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
2525 2530 2535

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
2540 2545 2550

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
2555 2560 2565

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
2570 2575 2580

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
2585 2590 2595

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
2600 2605 2610

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
2615 2620 2625

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
2630 2635 2640

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
2645 2650 2655

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
2660 2665 2670

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
2675 2680 2685

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
2690 2695 2700

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
2705 2710 2715

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
2720 2725 2730

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
2735 2740 2745

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
2750

<210> 102
<211> 2242
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> pSYN-FVIII-170 蛋白質序列

<400> 102

Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp
1 5 10 15

Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr
20 25 30

Asp Leu Glu Cys Met Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro
35 40 45

Pro Gly Met Val Arg His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys
50 55 60

Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys
65 70 75 80

Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr
85 90 95

Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr
100 105 110

Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr
115 120 125

Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile
130 135 140

Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys
145 150 155 160

Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly
165 170 175

Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val
180 185 190

Val Glu Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser
195 200 205

Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr
210 215 220

Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln
225 230 235 240

Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val
245 250 255

Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg
260 265 270

Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met
275 280 285

Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val
290 295 300

Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val
305 310 315 320

Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Ala
325 330 335

Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly
 340 345 350

Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu
 355 360 365

Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Ala Glu Trp Arg Tyr Asn
 370 375 380

Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu
 385 390 395 400

Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro
 405 410 415

Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp
 420 425 430

Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys
 435 440 445

Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys
 450 455 460

Asp Val Val Asn Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Ile Ser Gly
 465 470 475 480

Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala
 485 490 495

Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu
 500 505 510

Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly
515 520 525

Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu
530 535 540

Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser
545 550 555 560

Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly
565 570 575

Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser
580 585 590

Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser
595 600 605

Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly
610 615 620

Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser
625 630 635 640

Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu
645 650 655

Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly
660 665 670

Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Glu Pro Ala
675 680 685

Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser
690 695 700

Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly
705 710 715 720

Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Glu Pro Ala
725 730 735

Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu
740 745 750

Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Asp
755 760 765

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
770 775 780

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Val Pro Arg Gly Ser
785 790 795 800

Gly Gly Ala Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu
805 810 815

Ser Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala
820 825 830

Arg Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val
835 840 845

Val Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn
850 855 860

Ile Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile
865 870 875 880

Gln Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala
885 890 895

Ser His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala
900 905 910

Ser Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu
915 920 925

Asp Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val
930 935 940

Leu Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr
945 950 955 960

Ser Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu
965 970 975

Ile Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys
980 985 990

Thr Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu
995 1000 1005

Gly Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp
1010 1015 1020

Arg Asp Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val
1025 1030 1035

Asn Gly	Tyr Val	Asn Arg	Ser	Leu Pro	Gly Leu	Ile	Gly Cys	His
1040			1045			1050		

Arg Lys	Ser Val	Tyr Trp	His	Val Ile	Gly Met	Gly	Thr Thr	Pro
1055			1060			1065		

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

Asn His	Arg Gln	Ala Ser	Leu	Glu Ile	Ser Pro	Ile	Thr Phe	Leu
1085			1090			1095		

Thr Ala	Gln Thr	Leu Leu	Met	Asp Leu	Gly Gln	Phe	Leu Leu	Phe
1100			1105			1110		

Cys His	Ile Ser	Ser His	Gln	His Asp	Gly Met	Glu	Ala Tyr	Val
1115			1120			1125		

Lys Val	Asp Ser	Cys Pro	Glu	Glu Pro	Gln Leu	Arg	Met Lys	Asn
1130			1135			1140		

Asn Glu	Glu Ala	Glu Asp	Tyr	Asp Asp	Asp Leu	Thr	Asp Ser	Glu
1145			1150			1155		

Met Asp	Val Val	Arg Phe	Asp	Asp Asp	Asn Ser	Pro	Ser Phe	Ile
1160			1165			1170		

Gln Ile	Arg Ser	Val Ala	Lys	Lys His	Pro Lys	Thr	Trp Val	His
1175			1180			1185		

Tyr Ile	Ala Ala	Glu Glu	Glu	Asp Trp	Asp Tyr	Ala	Pro Leu	Val
1190			1195			1200		

Leu	Ala	Pro	Asp	Asp	Arg	Ser	Tyr	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Asn	Asn
1205			1210					1215						

Gly	Pro	Gln	Arg	Ile	Gly	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys	Val	Arg	Phe	Met
1220			1225					1230						

Ala	Tyr	Thr	Asp	Glu	Thr	Phe	Lys	Thr	Arg	Glu	Ala	Ile	Gln	His
1235			1240					1245						

Glu	Ser	Gly	Ile	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	Gly	Asp
1250			1255					1260						

Thr	Leu	Leu	Ile	Ile	Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn
1265			1270					1275						

Ile	Tyr	Pro	His	Gly	Ile	Thr	Asp	Val	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ser	Arg
1280			1285					1290						

Arg	Leu	Pro	Lys	Gly	Val	Lys	His	Leu	Lys	Asp	Phe	Pro	Ile	Leu
1295			1300					1305						

Pro	Gly	Glu	Ile	Phe	Lys	Tyr	Lys	Trp	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Asp
1310			1315					1320						

Gly	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser
1325			1330					1335						

Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg	Asp	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly
1340			1345					1350						

Pro	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu	Ser	Val	Asp	Gln	Arg	Gly	Asn
1355			1360					1365						

Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe Ser Val Phe
1370 1375 1380

Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln Arg Phe
1385 1390 1395

Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe Gln
1400 1405 1410

Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
1415 1420 1425

Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile
1430 1435 1440

Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser
1445 1450 1455

Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
1460 1465 1470

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn
1475 1480 1485

Pro Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn
1490 1495 1500

Arg Gly Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn
1505 1510 1515

Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr
1520 1525 1530

Leu	Leu	Ser	Lys	Asn	Asn	Ala	Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln
1535						1540					1545			

Asn	Pro	Pro	Val	Leu	Lys	Arg	His	Gln	Arg	Glu	Ile	Thr	Arg	Thr
1550						1555					1560			

Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr	Asp	Asp	Thr	Ile
1565						1570					1575			

Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile	Tyr	Asp	Glu	Asp
1580						1585					1590			

Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe	Gln	Lys	Lys	Thr	Arg	His	Tyr
1595						1600					1605			

Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Trp	Asp	Tyr	Gly	Met	Ser	Ser
1610						1615					1620			

Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser	Gly	Ser	Val	Pro
1625						1630					1635			

Gln	Phe	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr	Asp	Gly	Ser	Phe
1640						1645					1650			

Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Asn	Glu	His	Leu	Gly	Leu
1655						1660					1665			

Leu	Gly	Pro	Tyr	Ile	Arg	Ala	Glu	Val	Glu	Asp	Asn	Ile	Met	Val
1670						1675					1680			

Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Ser	Ser
1685						1690					1695			

Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg
1700 1705 1710

Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys
1715 1720 1725

Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys
1730 1735 1740

Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His
1745 1750 1755

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu
1760 1765 1770

Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu
1775 1780 1785

Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu
1790 1795 1800

Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu
1805 1810 1815

Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly
1820 1825 1830

Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln
1835 1840 1845

Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile
1850 1855 1860

His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys
1865 1870 1875

Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe
1880 1885 1890

Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val
1895 1900 1905

Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu
1910 1915 1920

Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala
1925 1930 1935

Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr
1940 1945 1950

Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser
1955 1960 1965

Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val
1970 1975 1980

Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly
1985 1990 1995

Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile
2000 2005 2010

Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn
2015 2020 2025

Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser
2030 2035 2040

Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr
2045 2050 2055

Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg
2060 2065 2070

Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu
2075 2080 2085

Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser
2090 2095 2100

Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala
2105 2110 2115

Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val
2120 2125 2130

Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met
2135 2140 2145

Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr
2150 2155 2160

Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly
2165 2170 2175

His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe
2180 2185 2190

Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp
2195 2200 2205

Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp
2210 2215 2220

Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala
2225 2230 2235

Gln Asp Leu Tyr
2240

- <210> 103
- <211> 1959
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> pSYN-FVIII-169 成熟蛋白質序列

<400> 103

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
225 230 235 240

Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
245 250 255

Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu
260 265 270

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

Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
290 295 300

Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met
305 310 315 320

Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg
325 330 335

Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp
340 345 350

Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe
355 360 365

Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His
370 375 380

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

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

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

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

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

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 Gly Ala Pro Gly Thr Ser Glu
740 745 750

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly
755 760 765

Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
770 775 780

Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu
785 790 795 800

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
805 810 815

Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
820 825 830

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
835 840 845

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
850 855 860

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
865 870 875 880

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr
885 890 895

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
900 905 910

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
915 920 925

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
930 935 940

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly
945 950 955 960

Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
965 970 975

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
980 985 990

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly
995 1000 1005

Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly
1010 1015 1020

Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Ala Ser
1025 1030 1035

Ser Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Ala Glu Ile Thr Arg Thr
1040 1045 1050

Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile
1055 1060 1065

Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp
1070 1075 1080

Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr
1085 1090 1095

Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser
1100 1105 1110

Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro
1115 1120 1125

Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe
1130 1135 1140

Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu
1145 1150 1155

Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val
1160 1165 1170

Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser
1175 1180 1185

Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg
1190 1195 1200

Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys
1205 1210 1215

Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys
1220 1225 1230

Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His
1235 1240 1245

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu
1250 1255 1260

Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu
1265 1270 1275

Phe	Phe	Thr	Ile	Phe	Asp	Glu	Thr	Lys	Ser	Trp	Tyr	Phe	Thr	Glu
1280						1285					1290			

Asn	Met	Glu	Arg	Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Cys	Asn	Ile	Gln	Met	Glu
1295						1300					1305			

Asp	Pro	Thr	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Ile	Asn	Gly
1310						1315					1320			

Tyr	Ile	Met	Asp	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Met	Ala	Gln	Asp	Gln
1325						1330					1335			

Arg	Ile	Arg	Trp	Tyr	Leu	Leu	Ser	Met	Gly	Ser	Asn	Glu	Asn	Ile
1340						1345					1350			

His	Ser	Ile	His	Phe	Ser	Gly	His	Val	Phe	Thr	Val	Arg	Lys	Lys
1355						1360					1365			

Glu	Glu	Tyr	Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Pro	Gly	Val	Phe
1370						1375					1380			

Glu	Thr	Val	Glu	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ala	Gly	Ile	Trp	Arg	Val
1385						1390					1395			

Glu	Cys	Leu	Ile	Gly	Glu	His	Leu	His	Ala	Gly	Met	Ser	Thr	Leu
1400						1405					1410			

Phe	Leu	Val	Tyr	Ser	Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Met	Ala
1415						1420					1425			

Ser	Gly	His	Ile	Arg	Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Gly	Gln	Tyr
1430						1435					1440			

Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser
1445 1450 1455

Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val
1460 1465 1470

Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly
1475 1480 1485

Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile
1490 1495 1500

Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn
1505 1510 1515

Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser
1520 1525 1530

Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr
1535 1540 1545

Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg
1550 1555 1560

Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu
1565 1570 1575

Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser
1580 1585 1590

Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala
1595 1600 1605

Arg	Leu	His	Leu	Gln	Gly	Arg	Ser	Asn	Ala	Trp	Arg	Pro	Gln	Val
1610						1615						1620		

Asn	Asn	Pro	Lys	Glu	Trp	Leu	Gln	Val	Asp	Phe	Gln	Lys	Thr	Met
1625						1630					1635			

Lys	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Thr	Gln	Gly	Val	Lys	Ser	Leu	Leu	Thr
1640						1645					1650			

Ser	Met	Tyr	Val	Lys	Glu	Phe	Leu	Ile	Ser	Ser	Ser	Gln	Asp	Gly
1655						1660					1665			

His	Gln	Trp	Thr	Leu	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys	Val	Lys	Val	Phe
1670						1675					1680			

Gln	Gly	Asn	Gln	Asp	Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Val	Asn	Ser	Leu	Asp
1685						1690					1695			

Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp
1700						1705					1710			

Val	His	Gln	Ile	Ala	Leu	Arg	Met	Glu	Val	Leu	Gly	Cys	Glu	Ala
1715						1720					1725			

Gln	Asp	Leu	Tyr	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
1730						1735					1740			

Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
1745						1750					1755			

Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
1760						1765					1770			

Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn
1775						1780					1785			

Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro
1790						1795					1800			

Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
1805						1810					1815			

Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
1820						1825					1830			

Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
1835						1840					1845			

Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
1850						1855					1860			

Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
1865						1870					1875			

Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
1880						1885					1890			

Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
1895						1900					1905			

Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr
1910						1915					1920			

Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser
1925						1930					1935			

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
1940 1945 1950

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
1955

<210> 104
<211> 1959
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> pSYN-FVIII-173 成熟蛋白質

<400> 104

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
 225 230 235 240

Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
 245 250 255

Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu
 260 265 270

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

Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
290 295 300

Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met
305 310 315 320

Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg
325 330 335

Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp
340 345 350

Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe
355 360 365

Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His
370 375 380

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

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

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

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

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

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 Gly Ala Pro Gly Thr Ser Glu
740 745 750

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly
755 760 765

Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
770 775 780

Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu
785 790 795 800

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
805 810 815

Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
820 825 830

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
835 840 845

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
850 855 860

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
865 870 875 880

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr
885 890 895

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
900 905 910

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
915 920 925

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
930 935 940

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly
945 950 955 960

Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
965 970 975

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
980 985 990

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly
 995 1000 1005

Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly
 1010 1015 1020

Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Ala Ser
 1025 1030 1035

Ser Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr
 1040 1045 1050

Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile
 1055 1060 1065

Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp
 1070 1075 1080

Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr
 1085 1090 1095

Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser
 1100 1105 1110

Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro
 1115 1120 1125

Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe
 1130 1135 1140

Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu
 1145 1150 1155

Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val
1160 1165 1170

Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser
1175 1180 1185

Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg
1190 1195 1200

Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys
1205 1210 1215

Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys
1220 1225 1230

Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His
1235 1240 1245

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu
1250 1255 1260

Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu
1265 1270 1275

Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu
1280 1285 1290

Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu
1295 1300 1305

Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly
1310 1315 1320

Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln
1325 1330 1335

Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile
1340 1345 1350

His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys
1355 1360 1365

Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe
1370 1375 1380

Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val
1385 1390 1395

Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu
1400 1405 1410

Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala
1415 1420 1425

Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr
1430 1435 1440

Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser
1445 1450 1455

Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val
1460 1465 1470

Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly
1475 1480 1485

Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile
1490 1495 1500

Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn
1505 1510 1515

Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser
1520 1525 1530

Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr
1535 1540 1545

Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg
1550 1555 1560

Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu
1565 1570 1575

Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser
1580 1585 1590

Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala
1595 1600 1605

Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val
1610 1615 1620

Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met
1625 1630 1635

Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr
1640 1645 1650

Ser	Met	Tyr	Val	Lys	Glu	Phe	Leu	Ile	Ser	Ser	Ser	Gln	Asp	Gly
1655							1660					1665		

His	Gln	Trp	Thr	Leu	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys	Val	Lys	Val	Phe
1670							1675					1680		

Gln	Gly	Asn	Gln	Asp	Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Val	Asn	Ser	Leu	Asp
1685							1690					1695		

Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp
1700							1705					1710		

Val	His	Gln	Ile	Ala	Leu	Arg	Met	Glu	Val	Leu	Gly	Cys	Glu	Ala
1715							1720					1725		

Gln	Asp	Leu	Tyr	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala
1730							1735					1740		

Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
1745							1750					1755		

Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
1760							1765					1770		

Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn
1775							1780					1785		

Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro
1790							1795					1800		

Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu
1805							1810					1815		

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
1820 1825 1830

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
1835 1840 1845

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
1850 1855 1860

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
1865 1870 1875

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
1880 1885 1890

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
1895 1900 1905

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
1910 1915 1920

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
1925 1930 1935

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
1940 1945 1950

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
1955

<210> 105
<211> 1984

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FVIII 195 蛋白質序列

<400> 105

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
85 90 95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
100 105 110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
115 120 125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
130 135 140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
145 150 155 160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
180 185 190

Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
195 200 205

Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
210 215 220

Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
225 230 235 240

Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
245 250 255

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
260 265 270

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
275 280 285

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
290 295 300

Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
305 310 315 320

Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
 325 330 335

Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
 340 345 350

Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
 355 360 365

Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
 370 375 380

Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
 385 390 395 400

Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415

Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
 420 425 430

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445

Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460

Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495

His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
500 505 510

Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
515 520 525

Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
530 535 540

Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
545 550 555 560

Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
565 570 575

Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
580 585 590

Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
595 600 605

Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
610 615 620

Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
625 630 635 640

Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
645 650 655

Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
660 665 670

Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
675 680 685

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
690 695 700

Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
705 710 715 720

Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
725 730 735

Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
740 745 750

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu
755 760 765

Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Gly Ala Pro
770 775 780

Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ala Ser Pro
785 790 795 800

Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
805 810 815

Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro
820 825 830

Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Thr Pro Gly
835 840 845

Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
850 855 860

Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro
865 870 875 880

Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr
885 890 895

Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala
900 905 910

Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro
915 920 925

Ala Ser Ser Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser
930 935 940

Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn
945 950 955 960

Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala
965 970 975

Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val
980 985 990

Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val
995 1000 1005

Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr
1010 1015 1020

Arg Gly	Glu Leu Asn Glu His	Leu Gly Leu Leu Gly	Pro Tyr Ile
1025	1030	1035	

Arg Ala	Glu Val Glu Asp Asn	Ile Met Val Thr Phe	Arg Asn Gln
1040	1045	1050	

Ala Ser	Arg Pro Tyr Ser Phe	Tyr Ser Ser Leu Ile	Ser Tyr Glu
1055	1060	1065	

Glu Asp	Gln Arg Gln Gly Ala	Glu Pro Arg Lys Asn	Phe Val Lys
1070	1075	1080	

Pro Asn	Glu Thr Lys Thr Tyr	Phe Trp Lys Val Gln	His His Met
1085	1090	1095	

Ala Pro	Thr Lys Asp Glu Phe	Asp Cys Lys Ala Trp	Ala Tyr Phe
1100	1105	1110	

Ser Asp	Val Asp Leu Glu Lys	Asp Val His Ser Gly	Leu Ile Gly
1115	1120	1125	

Pro Leu	Leu Val Cys His Thr	Asn Thr Leu Asn Pro	Ala His Gly
1130	1135	1140	

Arg Gln	Val Thr Val Gln Glu	Phe Ala Leu Phe Phe	Thr Ile Phe
1145	1150	1155	

Asp Glu	Thr Lys Ser Trp Tyr	Phe Thr Glu Asn Met	Glu Arg Asn
1160	1165	1170	

Cys Arg	Gly Ala Pro Thr Ser	Glu Ser Ala Thr Pro	Glu Ser Gly
1175	1180	1185	

Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr
1190 1195 1200

Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala
1205 1210 1215

Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
1220 1225 1230

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala
1235 1240 1245

Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser
1250 1255 1260

Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly
1265 1270 1275

Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
1280 1285 1290

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly
1295 1300 1305

Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ala
1310 1315 1320

Ser Ser Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys
1325 1330 1335

Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr
1340 1345 1350

Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr
1355 1360 1365

Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe
1370 1375 1380

Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met
1385 1390 1395

Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met
1400 1405 1410

Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly
1415 1420 1425

Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser
1430 1435 1440

Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg
1445 1450 1455

Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro
1460 1465 1470

Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser
1475 1480 1485

Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro
1490 1495 1500

Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe
1505 1510 1515

Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp
1520						1525					1530			

Gly	Lys	Lys	Trp	Gln	Thr	Tyr	Arg	Gly	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Leu
1535						1540					1545			

Met	Val	Phe	Phe	Gly	Asn	Val	Asp	Ser	Ser	Gly	Ile	Lys	His	Asn
1550						1555					1560			

Ile	Phe	Asn	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro
1565						1570					1575			

Thr	His	Tyr	Ser	Ile	Arg	Ser	Thr	Leu	Arg	Met	Glu	Leu	Met	Gly
1580						1585					1590			

Cys	Asp	Leu	Asn	Ser	Cys	Ser	Met	Pro	Leu	Gly	Met	Glu	Ser	Lys
1595						1600					1605			

Ala	Ile	Ser	Asp	Ala	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Thr	Asn
1610						1615					1620			

Met	Phe	Ala	Thr	Trp	Ser	Pro	Ser	Lys	Ala	Arg	Leu	His	Leu	Gln
1625						1630					1635			

Gly	Arg	Ser	Asn	Ala	Trp	Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Glu
1640						1645					1650			

Trp	Leu	Gln	Val	Asp	Phe	Gln	Lys	Thr	Met	Lys	Val	Thr	Gly	Val
1655						1660					1665			

Thr	Thr	Gln	Gly	Val	Lys	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys
1670						1675					1680			

Glu	Phe	Leu	Ile	Ser	Ser	Ser	Gln	Asp	Gly	His	Gln	Trp	Thr	Leu
1685							1690				1695			

Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys	Val	Lys	Val	Phe	Gln	Gly	Asn	Gln	Asp
1700							1705				1710			

Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Val	Asn	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr
1715							1720				1725			

Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala
1730							1735				1740			

Leu	Arg	Met	Glu	Val	Leu	Gly	Cys	Glu	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr	Asp
1745							1750				1755			

Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
1760							1765				1770			

Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
1775							1780				1785			

Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
1790							1795				1800			

Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
1805							1810				1815			

Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
1820							1825				1830			

Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
1835							1840				1845			

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
1850 1855 1860

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
1865 1870 1875

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1880 1885 1890

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
1895 1900 1905

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
1910 1915 1920

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
1925 1930 1935

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
1940 1945 1950

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
1955 1960 1965

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1970 1975 1980

Lys

- <210> 106
- <211> 2134
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>

<223> FVIII 196 蛋白質序列

<400> 106

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Gly Ala Pro
35 40 45

Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ser Ser Pro
50 55 60

Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
65 70 75 80

Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro
85 90 95

Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Pro
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
115 120 125

Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro
130 135 140

Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ser Ser Thr
145 150 155 160

Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala
 165 170 175

Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro
 180 185 190

Ala Ser Ser Asp Ala Arg Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro
 195 200 205

Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr
 210 215 220

Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr
 245 250 255

Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val
 260 265 270

Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser
 275 280 285

Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr
 290 295 300

Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro
 305 310 315 320

Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp
 325 330 335

Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser
 340 345 350

Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe
 355 360 365

Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser
 370 375 380

Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met
 385 390 395 400

His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly
 405 410 415

Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr
 420 425 430

Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg
 435 440 445

Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr
 450 455 460

Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His
 465 470 475 480

Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp
 485 490 495

Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala
 500 505 510

Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg
515 520 525

Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala
530 535 540

Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu
545 550 555 560

Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr
565 570 575

Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr
580 585 590

Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg
595 600 605

Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly
610 615 620

Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg
625 630 635 640

Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr
645 650 655

Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile
660 665 670

Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp
675 680 685

Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser
690 695 700

Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu
705 710 715 720

Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met
725 730 735

Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg
740 745 750

Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala
755 760 765

Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His
770 775 780

Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu
785 790 795 800

His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp
805 810 815

Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val
820 825 830

Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe
835 840 845

Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser
850 855 860

Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys
865 870 875 880

Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser
885 890 895

Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser
900 905 910

Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr
915 920 925

Thr Leu Gln Gly Ala Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser
930 935 940

Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala
945 950 955 960

Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr
965 970 975

Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr
980 985 990

Gly Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ala
995 1000 1005

Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly
1010 1015 1020

Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
1025 1030 1035

Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser
1040 1045 1050

Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ala
1055 1060 1065

Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Ala Ser Ser Ser Asp
1070 1075 1080

Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys
1085 1090 1095

Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro
1100 1105 1110

Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val
1115 1120 1125

Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu
1130 1135 1140

Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val
1145 1150 1155

Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr
1160 1165 1170

Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile
1175 1180 1185

Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln
1190 1195 1200

Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Ser	Ser	Leu	Ile	Ser	Tyr	Glu
1205						1210					1215			

Glu	Asp	Gln	Arg	Gln	Gly	Ala	Glu	Pro	Arg	Lys	Asn	Phe	Val	Lys
1220						1225					1230			

Pro	Asn	Glu	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Trp	Lys	Val	Gln	His	His	Met
1235						1240					1245			

Ala	Pro	Thr	Lys	Asp	Glu	Phe	Asp	Cys	Lys	Ala	Trp	Ala	Tyr	Phe
1250						1255					1260			

Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Glu	Lys	Asp	Val	His	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly
1265						1270					1275			

Pro	Leu	Leu	Val	Cys	His	Thr	Asn	Thr	Leu	Asn	Pro	Ala	His	Gly
1280						1285					1290			

Arg	Gln	Val	Thr	Val	Gln	Glu	Phe	Ala	Leu	Phe	Phe	Thr	Ile	Phe
1295						1300					1305			

Asp	Glu	Thr	Lys	Ser	Trp	Tyr	Phe	Thr	Glu	Asn	Met	Glu	Arg	Asn
1310						1315					1320			

Cys	Arg	Gly	Ala	Pro	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly
1325						1330					1335			

Pro	Gly	Ser	Glu	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Pro	Gly	Thr
1340						1345					1350			

Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Glu	Pro	Ala
1355						1360					1365			

Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
1370 1375 1380

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala
1385 1390 1395

Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser
1400 1405 1410

Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly
1415 1420 1425

Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
1430 1435 1440

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly
1445 1450 1455

Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ala
1460 1465 1470

Ser Ser Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys
1475 1480 1485

Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr
1490 1495 1500

Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr
1505 1510 1515

Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe
1520 1525 1530

Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met
1535 1540 1545

Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met
1550 1555 1560

Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly
1565 1570 1575

Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser
1580 1585 1590

Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg
1595 1600 1605

Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro
1610 1615 1620

Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser
1625 1630 1635

Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro
1640 1645 1650

Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe
1655 1660 1665

Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp
1670 1675 1680

Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu
1685 1690 1695

Met Val	Phe Phe Gly Asn Val	Asp Ser Ser Gly Ile	Lys His Asn
1700	1705	1710	

Ile Phe	Asn Pro Pro Ile Ile	Ala Arg Tyr Ile Arg	Leu His Pro
1715	1720	1725	

Thr His	Tyr Ser Ile Arg Ser	Thr Leu Arg Met Glu	Leu Met Gly
1730	1735	1740	

Cys Asp	Leu Asn Ser Cys Ser	Met Pro Leu Gly Met	Glu Ser Lys
1745	1750	1755	

Ala Ile	Ser Asp Ala Gln Ile	Thr Ala Ser Ser Tyr	Phe Thr Asn
1760	1765	1770	

Met Phe	Ala Thr Trp Ser Pro	Ser Lys Ala Arg Leu	His Leu Gln
1775	1780	1785	

Gly Arg	Ser Asn Ala Trp Arg	Pro Gln Val Asn Asn	Pro Lys Glu
1790	1795	1800	

Trp Leu	Gln Val Asp Phe Gln	Lys Thr Met Lys Val	Thr Gly Val
1805	1810	1815	

Thr Thr	Gln Gly Val Lys Ser	Leu Leu Thr Ser Met	Tyr Val Lys
1820	1825	1830	

Glu Phe	Leu Ile Ser Ser Ser	Gln Asp Gly His Gln	Trp Thr Leu
1835	1840	1845	

Phe Phe	Gln Asn Gly Lys Val	Lys Val Phe Gln Gly	Asn Gln Asp
1850	1855	1860	

Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Val	Asn	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr
1865						1870					1875			

Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala
1880						1885					1890			

Leu	Arg	Met	Glu	Val	Leu	Gly	Cys	Glu	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr	Asp
1895						1900					1905			

Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
1910						1915					1920			

Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
1925						1930					1935			

Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
1940						1945					1950			

Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
1955						1960					1965			

Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
1970						1975					1980			

Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
1985						1990					1995			

Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
2000						2005					2010			

Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
2015						2020					2025			

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
2030 2035 2040

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
2045 2050 2055

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
2060 2065 2070

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
2075 2080 2085

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
2090 2095 2100

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
2105 2110 2115

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
2120 2125 2130

Lys

- <210> 107
- <211> 1984
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> FVIII 199 蛋白質序列

- <400> 107

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
85 90 95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
100 105 110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
115 120 125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
130 135 140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
145 150 155 160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
180 185 190

Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
195 200 205

Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
210 215 220

Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
225 230 235 240

Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
245 250 255

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
260 265 270

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
275 280 285

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
290 295 300

Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
305 310 315 320

Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
325 330 335

Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
340 345 350

Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
355 360 365

Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
370 375 380

Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
385 390 395 400

Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
405 410 415

Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
420 425 430

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
435 440 445

Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
450 455 460

Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
465 470 475 480

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
485 490 495

His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
500 505 510

Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
515 520 525

Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
530 535 540

Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
545 550 555 560

Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
565 570 575

Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
580 585 590

Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
595 600 605

Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
610 615 620

Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
625 630 635 640

Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
645 650 655

Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
660 665 670

Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
675 680 685

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
690 695 700

Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
705 710 715 720

Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
725 730 735

Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
740 745 750

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu
755 760 765

Lys Arg His Gln Ala Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Gly Ala Pro
770 775 780

Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ala Ser Pro
785 790 795 800

Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
805 810 815

Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro
820 825 830

Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Thr Pro Gly
835 840 845

Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
850 855 860

Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro
865 870 875 880

Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr
885 890 895

Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala
900 905 910

Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro
915 920 925

Ala Ser Ser Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser
930 935 940

Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn
945 950 955 960

Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala
965 970 975

Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val
980 985 990

Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val
995 1000 1005

Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr
1010 1015 1020

Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile
1025 1030 1035

Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln
1040 1045 1050

Ala Ser	Arg Pro Tyr Ser Phe	Tyr Ser Ser Leu Ile	Ser Tyr Glu
1055	1060	1065	

Glu Asp	Gln Arg Gln Gly Ala	Glu Pro Arg Lys Asn	Phe Val Lys
1070	1075	1080	

Pro Asn	Glu Thr Lys Thr Tyr	Phe Trp Lys Val Gln	His His Met
1085	1090	1095	

Ala Pro	Thr Lys Asp Glu Phe	Asp Cys Lys Ala Trp	Ala Tyr Phe
1100	1105	1110	

Ser Asp	Val Asp Leu Glu Lys	Asp Val His Ser Gly	Leu Ile Gly
1115	1120	1125	

Pro Leu	Leu Val Cys His Thr	Asn Thr Leu Asn Pro	Ala His Gly
1130	1135	1140	

Arg Gln	Val Thr Val Gln Glu	Phe Ala Leu Phe Phe	Thr Ile Phe
1145	1150	1155	

Asp Glu	Thr Lys Ser Trp Tyr	Phe Thr Glu Asn Met	Glu Arg Asn
1160	1165	1170	

Cys Arg	Gly Ala Pro Thr Ser	Glu Ser Ala Thr Pro	Glu Ser Gly
1175	1180	1185	

Pro Gly	Ser Glu Pro Ala Thr	Ser Gly Ser Glu Thr	Pro Gly Thr
1190	1195	1200	

Ser Glu	Ser Ala Thr Pro Glu	Ser Gly Pro Gly Ser	Glu Pro Ala
1205	1210	1215	

Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
1220 1225 1230

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala
1235 1240 1245

Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser
1250 1255 1260

Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly
1265 1270 1275

Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
1280 1285 1290

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly
1295 1300 1305

Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ala
1310 1315 1320

Ser Ser Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys
1325 1330 1335

Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr
1340 1345 1350

Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr
1355 1360 1365

Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe
1370 1375 1380

Ser	Gly	His	Val	Phe	Thr	Val	Arg	Lys	Lys	Glu	Glu	Tyr	Lys	Met
1385						1390					1395			

Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Pro	Gly	Val	Phe	Glu	Thr	Val	Glu	Met
1400						1405					1410			

Leu	Pro	Ser	Lys	Ala	Gly	Ile	Trp	Arg	Val	Glu	Cys	Leu	Ile	Gly
1415						1420					1425			

Glu	His	Leu	His	Ala	Gly	Met	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	Val	Tyr	Ser
1430						1435					1440			

Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Met	Ala	Ser	Gly	His	Ile	Arg
1445						1450					1455			

Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Gln	Trp	Ala	Pro
1460						1465					1470			

Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His	Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	Trp	Ser
1475						1480					1485			

Thr	Lys	Glu	Pro	Phe	Ser	Trp	Ile	Lys	Val	Asp	Leu	Leu	Ala	Pro
1490						1495					1500			

Met	Ile	Ile	His	Gly	Ile	Lys	Thr	Gln	Gly	Ala	Arg	Gln	Lys	Phe
1505						1510					1515			

Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp
1520						1525					1530			

Gly	Lys	Lys	Trp	Gln	Thr	Tyr	Arg	Gly	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Leu
1535						1540					1545			

Met	Val	Phe	Phe	Gly	Asn	Val	Asp	Ser	Ser	Gly	Ile	Lys	His	Asn
1550						1555					1560			

Ile	Phe	Asn	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro
1565						1570					1575			

Thr	His	Tyr	Ser	Ile	Arg	Ser	Thr	Leu	Arg	Met	Glu	Leu	Met	Gly
1580						1585					1590			

Cys	Asp	Leu	Asn	Ser	Cys	Ser	Met	Pro	Leu	Gly	Met	Glu	Ser	Lys
1595						1600					1605			

Ala	Ile	Ser	Asp	Ala	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Thr	Asn
1610						1615					1620			

Met	Phe	Ala	Thr	Trp	Ser	Pro	Ser	Lys	Ala	Arg	Leu	His	Leu	Gln
1625						1630					1635			

Gly	Arg	Ser	Asn	Ala	Trp	Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Glu
1640						1645					1650			

Trp	Leu	Gln	Val	Asp	Phe	Gln	Lys	Thr	Met	Lys	Val	Thr	Gly	Val
1655						1660					1665			

Thr	Thr	Gln	Gly	Val	Lys	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys
1670						1675					1680			

Glu	Phe	Leu	Ile	Ser	Ser	Ser	Gln	Asp	Gly	His	Gln	Trp	Thr	Leu
1685						1690					1695			

Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys	Val	Lys	Val	Phe	Gln	Gly	Asn	Gln	Asp
1700						1705					1710			

Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr
1715 1720 1725

Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala
1730 1735 1740

Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr Asp
1745 1750 1755

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1760 1765 1770

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
1775 1780 1785

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
1790 1795 1800

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
1805 1810 1815

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
1820 1825 1830

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
1835 1840 1845

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
1850 1855 1860

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
1865 1870 1875

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1880 1885 1890

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
1895 1900 1905

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
1910 1915 1920

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
1925 1930 1935

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
1940 1945 1950

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
1955 1960 1965

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1970 1975 1980

Lys

- <210> 108
- <211> 2134
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> FVIII 201 蛋白質序列

<400> 108

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Gly Ala Pro
35 40 45

Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ser Ser Pro
50 55 60

Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
65 70 75 80

Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro
85 90 95

Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Pro
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
115 120 125

Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro
130 135 140

Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ser Ser Thr
145 150 155 160

Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala
165 170 175

Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro
180 185 190

Ala Ser Ser Asp Ala Arg Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro
 195 200 205

Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr
 210 215 220

Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu
 225 230 235 240

Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr
 245 250 255

Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val
 260 265 270

Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser
 275 280 285

Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr
 290 295 300

Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro
 305 310 315 320

Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp
 325 330 335

Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser
 340 345 350

Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe
 355 360 365

Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser
370 375 380

Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met
385 390 395 400

His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly
405 410 415

Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr
420 425 430

Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg
435 440 445

Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr
450 455 460

Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His
465 470 475 480

Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp
485 490 495

Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala
500 505 510

Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg
515 520 525

Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala
530 535 540

Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu
545 550 555 560

Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr
565 570 575

Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr
580 585 590

Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg
595 600 605

Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly
610 615 620

Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg
625 630 635 640

Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr
645 650 655

Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile
660 665 670

Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp
675 680 685

Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser
690 695 700

Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu
705 710 715 720

Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met
725 730 735

Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg
740 745 750

Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala
755 760 765

Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His
770 775 780

Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu
785 790 795 800

His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp
805 810 815

Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val
820 825 830

Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe
835 840 845

Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser
850 855 860

Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys
865 870 875 880

Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser
885 890 895

Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser
 900 905 910

Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Ala Glu Ile Thr Arg Thr
 915 920 925

Thr Leu Gln Gly Ala Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser
 930 935 940

Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala
 945 950 955 960

Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr
 965 970 975

Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr
 980 985 990

Gly Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ala
 995 1000 1005

Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly
 1010 1015 1020

Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
 1025 1030 1035

Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser
 1040 1045 1050

Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ala
 1055 1060 1065

Ser	Pro	Gly	Thr	Ser	Ser	Thr	Gly	Ser	Pro	Ala	Ser	Ser	Ser	Asp
1070						1075					1080			

Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr	Asp	Asp	Thr	Ile	Ser	Val	Glu	Met	Lys
1085						1090					1095			

Lys	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile	Tyr	Asp	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln	Ser	Pro
1100						1105					1110			

Arg	Ser	Phe	Gln	Lys	Lys	Thr	Arg	His	Tyr	Phe	Ile	Ala	Ala	Val
1115						1120					1125			

Glu	Arg	Leu	Trp	Asp	Tyr	Gly	Met	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Val	Leu
1130						1135					1140			

Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser	Gly	Ser	Val	Pro	Gln	Phe	Lys	Lys	Val
1145						1150					1155			

Val	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr	Asp	Gly	Ser	Phe	Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr
1160						1165					1170			

Arg	Gly	Glu	Leu	Asn	Glu	His	Leu	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Ile
1175						1180					1185			

Arg	Ala	Glu	Val	Glu	Asp	Asn	Ile	Met	Val	Thr	Phe	Arg	Asn	Gln
1190						1195					1200			

Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Ser	Ser	Leu	Ile	Ser	Tyr	Glu
1205						1210					1215			

Glu	Asp	Gln	Arg	Gln	Gly	Ala	Glu	Pro	Arg	Lys	Asn	Phe	Val	Lys
1220						1225					1230			

Pro	Asn	Glu	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Trp	Lys	Val	Gln	His	His	Met
1235							1240				1245			

Ala	Pro	Thr	Lys	Asp	Glu	Phe	Asp	Cys	Lys	Ala	Trp	Ala	Tyr	Phe
1250						1255					1260			

Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Glu	Lys	Asp	Val	His	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly
1265						1270					1275			

Pro	Leu	Leu	Val	Cys	His	Thr	Asn	Thr	Leu	Asn	Pro	Ala	His	Gly
1280						1285					1290			

Arg	Gln	Val	Thr	Val	Gln	Glu	Phe	Ala	Leu	Phe	Phe	Thr	Ile	Phe
1295						1300					1305			

Asp	Glu	Thr	Lys	Ser	Trp	Tyr	Phe	Thr	Glu	Asn	Met	Glu	Arg	Asn
1310						1315					1320			

Cys	Arg	Gly	Ala	Pro	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly
1325						1330					1335			

Pro	Gly	Ser	Glu	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Pro	Gly	Thr
1340						1345					1350			

Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Glu	Pro	Ala
1355						1360					1365			

Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro
1370						1375					1380			

Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala
1385						1390					1395			

Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser
1400 1405 1410

Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly
1415 1420 1425

Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
1430 1435 1440

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly
1445 1450 1455

Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ala
1460 1465 1470

Ser Ser Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys
1475 1480 1485

Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr
1490 1495 1500

Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr
1505 1510 1515

Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe
1520 1525 1530

Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met
1535 1540 1545

Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met
1550 1555 1560

Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly
1565 1570 1575

Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser
1580 1585 1590

Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg
1595 1600 1605

Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro
1610 1615 1620

Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser
1625 1630 1635

Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro
1640 1645 1650

Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe
1655 1660 1665

Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp
1670 1675 1680

Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu
1685 1690 1695

Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn
1700 1705 1710

Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro
1715 1720 1725

Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly
1730 1735 1740

Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys
1745 1750 1755

Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn
1760 1765 1770

Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln
1775 1780 1785

Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu
1790 1795 1800

Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val
1805 1810 1815

Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys
1820 1825 1830

Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu
1835 1840 1845

Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp
1850 1855 1860

Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr
1865 1870 1875

Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala
1880 1885 1890

Leu Arg	Met Glu Val	Leu Gly	Cys Glu Ala Gln Asp	Leu Tyr Asp
1895		1900		1905

Lys Thr	His Thr Cys	Pro Pro	Cys Pro Ala Pro Glu	Leu Leu Gly
1910		1915		1920

Gly Pro	Ser Val Phe	Leu Phe	Pro Pro Lys Pro Lys	Asp Thr Leu
1925		1930		1935

Met Ile	Ser Arg Thr	Pro Glu	Val Thr Cys Val Val	Val Asp Val
1940		1945		1950

Ser His	Glu Asp Pro	Glu Val	Lys Phe Asn Trp Tyr	Val Asp Gly
1955		1960		1965

Val Glu	Val His Asn	Ala Lys	Thr Lys Pro Arg Glu	Glu Gln Tyr
1970		1975		1980

Asn Ser	Thr Tyr Arg	Val Val	Ser Val Leu Thr Val	Leu His Gln
1985		1990		1995

Asp Trp	Leu Asn Gly	Lys Glu	Tyr Lys Cys Lys Val	Ser Asn Lys
2000		2005		2010

Ala Leu	Pro Ala Pro	Ile Glu	Lys Thr Ile Ser Lys	Ala Lys Gly
2015		2020		2025

Gln Pro	Arg Glu Pro	Gln Val	Tyr Thr Leu Pro Pro	Ser Arg Asp
2030		2035		2040

Glu Leu	Thr Lys Asn	Gln Val	Ser Leu Thr Cys Leu	Val Lys Gly
2045		2050		2055

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
2060 2065 2070

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
2075 2080 2085

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
2090 2095 2100

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
2105 2110 2115

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
2120 2125 2130

Lys

- <210> 109
- <211> 2128
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> FVIII 203 蛋白質序列

<400> 109

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
85 90 95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
100 105 110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
115 120 125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
130 135 140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
145 150 155 160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
180 185 190

Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
195 200 205

Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
210 215 220

Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
225 230 235 240

Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
245 250 255

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
260 265 270

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
275 280 285

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
290 295 300

Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
305 310 315 320

Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
325 330 335

Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
340 345 350

Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
355 360 365

Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
370 375 380

Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
385 390 395 400

Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
405 410 415

Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
420 425 430

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
435 440 445

Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
450 455 460

Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
465 470 475 480

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
485 490 495

His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
500 505 510

Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
515 520 525

Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
530 535 540

Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
545 550 555 560

Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
565 570 575

Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
580 585 590

Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
595 600 605

Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
610 615 620

Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
625 630 635 640

Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
645 650 655

Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
660 665 670

Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
675 680 685

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
690 695 700

Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
705 710 715 720

Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
725 730 735

Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
740 745 750

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Gly Ala Pro Gly
755 760 765

Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala
770 775 780

Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu
785 790 795 800

Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly
805 810 815

Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu
820 825 830

Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser
835 840 845

Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly
850 855 860

Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser
865 870 875 880

Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser
885 890 895

Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly
900 905 910

Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser
915 920 925

Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu
930 935 940

Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly
945 950 955 960

Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Glu Pro Ala
965 970 975

Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser
980 985 990

Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly
995 1000 1005

Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Glu Pro
1010 1015 1020

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr
1025 1030 1035

Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser
1040 1045 1050

Ala Pro Ala Ser Ser Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Ala Glu
1055 1060 1065

Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr
1070 1075 1080

Asp	Asp	Thr	Ile	Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile
1085						1090					1095			

Tyr	Asp	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe	Gln	Lys	Lys
1100						1105					1110			

Thr	Arg	His	Tyr	Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Trp	Asp	Tyr
1115						1120					1125			

Gly	Met	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser
1130						1135					1140			

Gly	Ser	Val	Pro	Gln	Phe	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr
1145						1150					1155			

Asp	Gly	Ser	Phe	Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Asn	Glu
1160						1165					1170			

His	Leu	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Ile	Arg	Ala	Glu	Val	Glu	Asp
1175						1180					1185			

Asn	Ile	Met	Val	Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Ser
1190						1195					1200			

Phe	Tyr	Ser	Ser	Leu	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Asp	Gln	Arg	Gln	Gly
1205						1210					1215			

Ala	Glu	Pro	Arg	Lys	Asn	Phe	Val	Lys	Pro	Asn	Glu	Thr	Lys	Thr
1220						1225					1230			

Tyr	Phe	Trp	Lys	Val	Gln	His	His	Met	Ala	Pro	Thr	Lys	Asp	Glu
1235						1240					1245			

Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu
1250 1255 1260

Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His
1265 1270 1275

Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln
1280 1285 1290

Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp
1295 1300 1305

Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Gly Ala Pro Thr
1310 1315 1320

Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala
1325 1330 1335

Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
1340 1345 1350

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr
1355 1360 1365

Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr
1370 1375 1380

Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser
1385 1390 1395

Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
1400 1405 1410

Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu
1415 1420 1425

Glu Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr
1430 1435 1440

Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu
1445 1450 1455

Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ala Ser Ser Ala Pro Cys Asn
1460 1465 1470

Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His
1475 1480 1485

Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met
1490 1495 1500

Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser
1505 1510 1515

Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr
1520 1525 1530

Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr
1535 1540 1545

Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly
1550 1555 1560

Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly
1565 1570 1575

Met	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	Val	Tyr	Ser	Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro
1580						1585					1590			

Leu	Gly	Met	Ala	Ser	Gly	His	Ile	Arg	Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala
1595						1600					1605			

Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Gln	Trp	Ala	Pro	Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His
1610						1615					1620			

Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	Trp	Ser	Thr	Lys	Glu	Pro	Phe	Ser
1625						1630					1635			

Trp	Ile	Lys	Val	Asp	Leu	Leu	Ala	Pro	Met	Ile	Ile	His	Gly	Ile
1640						1645					1650			

Lys	Thr	Gln	Gly	Ala	Arg	Gln	Lys	Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser
1655						1660					1665			

Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Lys	Trp	Gln	Thr
1670						1675					1680			

Tyr	Arg	Gly	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Leu	Met	Val	Phe	Phe	Gly	Asn
1685						1690					1695			

Val	Asp	Ser	Ser	Gly	Ile	Lys	His	Asn	Ile	Phe	Asn	Pro	Pro	Ile
1700						1705					1710			

Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro	Thr	His	Tyr	Ser	Ile	Arg
1715						1720					1725			

Ser	Thr	Leu	Arg	Met	Glu	Leu	Met	Gly	Cys	Asp	Leu	Asn	Ser	Cys
1730						1735					1740			

Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln
1745 1750 1755

Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser
1760 1765 1770

Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp
1775 1780 1785

Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe
1790 1795 1800

Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys
1805 1810 1815

Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser
1820 1825 1830

Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys
1835 1840 1845

Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val
1850 1855 1860

Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His
1865 1870 1875

Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu
1880 1885 1890

Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
1895 1900 1905

Pro Cys	Pro Ala	Pro Glu	Leu	Leu Gly	Gly Pro	Ser	Val Phe	Leu
1910			1915			1920		

Phe Pro	Pro Lys	Pro Lys	Asp	Thr Leu	Met Ile	Ser	Arg Thr	Pro
1925			1930			1935		

Glu Val	Thr Cys	Val Val	Val	Asp Val	Ser His	Glu	Asp Pro	Glu
1940			1945			1950		

Val Lys	Phe Asn	Trp Tyr	Val	Asp Gly	Val Glu	Val	His Asn	Ala
1955			1960			1965		

Lys Thr	Lys Pro	Arg Glu	Glu	Gln Tyr	Asn Ser	Thr	Tyr Arg	Val
1970			1975			1980		

Val Ser	Val Leu	Thr Val	Leu	His Gln	Asp Trp	Leu	Asn Gly	Lys
1985			1990			1995		

Glu Tyr	Lys Cys	Lys Val	Ser	Asn Lys	Ala Leu	Pro	Ala Pro	Ile
2000			2005			2010		

Glu Lys	Thr Ile	Ser Lys	Ala	Lys Gly	Gln Pro	Arg	Glu Pro	Gln
2015			2020			2025		

Val Tyr	Thr Leu	Pro Pro	Ser	Arg Asp	Glu Leu	Thr	Lys Asn	Gln
2030			2035			2040		

Val Ser	Leu Thr	Cys Leu	Val	Lys Gly	Phe Tyr	Pro	Ser Asp	Ile
2045			2050			2055		

Ala Val	Glu Trp	Glu Ser	Asn	Gly Gln	Pro Glu	Asn	Asn Tyr	Lys
2060			2065			2070		

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
2075 2080 2085

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
2090 2095 2100

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
2105 2110 2115

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
2120 2125

<210> 110
<211> 2128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FVIII 204 蛋白質序列

<400> 110

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
85 90 95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
100 105 110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
115 120 125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
130 135 140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
145 150 155 160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
180 185 190

Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
195 200 205

Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
210 215 220

Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
225 230 235 240

Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
245 250 255

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
260 265 270

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
275 280 285

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
290 295 300

Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
305 310 315 320

Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
325 330 335

Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
340 345 350

Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
355 360 365

Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
370 375 380

Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
385 390 395 400

Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
405 410 415

Leu Val Leu Ala Pro Asp Gly Ala Pro Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
420 425 430

Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
435 440 445

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
450 455 460

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
465 470 475 480

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
485 490 495

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
500 505 510

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
515 520 525

Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
530 535 540

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu
545 550 555 560

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ala Ser Ser Asp Arg Ser Tyr
565 570 575

Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr
580 585 590

Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg
595 600 605

Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly
610 615 620

Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg
625 630 635 640

Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr
645 650 655

Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile
660 665 670

Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp
675 680 685

Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser
690 695 700

Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu
705 710 715 720

Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met
725 730 735

Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg
740 745 750

Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala
755 760 765

Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His
770 775 780

Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu
785 790 795 800

His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp
805 810 815

Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val
820 825 830

Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe
835 840 845

Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser
850 855 860

Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys
865 870 875 880

Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser
885 890 895

Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser
900 905 910

Gln Asn Gly Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly
915 920 925

Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser
930 935 940

Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser
945 950 955 960

Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly
 965 970 975

Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro
 980 985 990

Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr
 995 1000 1005

Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu
 1010 1015 1020

Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly
 1025 1030 1035

Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala
 1040 1045 1050

Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser
 1055 1060 1065

Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser
 1070 1075 1080

Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly
 1085 1090 1095

Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
 1100 1105 1110

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser
 1115 1120 1125

Gly Ser	Glu Thr	Pro Gly	Ser	Pro Ala	Gly Ser	Pro	Thr Ser	Thr
1130			1135				1140	

Glu Glu	Gly Thr	Ser Thr	Glu	Pro Ser	Glu Gly	Ser	Ala Pro	Gly
1145			1150				1155	

Thr Ser	Thr Glu	Pro Ser	Glu	Gly Ser	Ala Pro	Gly	Ser Glu	Pro
1160			1165				1170	

Ala Thr	Ser Gly	Ser Glu	Thr	Pro Gly	Thr Ser	Glu	Ser Ala	Thr
1175			1180				1185	

Pro Glu	Ser Gly	Pro Gly	Thr	Ser Thr	Glu Pro	Ser	Glu Gly	Ser
1190			1195				1200	

Ala Pro	Ala Ser	Ser Pro	Pro	Val Leu	Lys Arg	His	Gln Ala	Glu
1205			1210				1215	

Ile Thr	Arg Thr	Thr Leu	Gln	Ser Asp	Gln Glu	Glu	Ile Asp	Tyr
1220			1225				1230	

Asp Asp	Thr Ile	Ser Val	Glu	Met Lys	Lys Glu	Asp	Phe Asp	Ile
1235			1240				1245	

Tyr Asp	Glu Asp	Glu Asn	Gln	Ser Pro	Arg Ser	Phe	Gln Lys	Lys
1250			1255				1260	

Thr Arg	His Tyr	Phe Ile	Ala	Ala Val	Glu Arg	Leu	Trp Asp	Tyr
1265			1270				1275	

Gly Met	Ser Ser	Ser Pro	His	Val Leu	Arg Asn	Arg	Ala Gln	Ser
1280			1285				1290	

Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr
1295 1300 1305

Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu
1310 1315 1320

His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp
1325 1330 1335

Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser
1340 1345 1350

Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly
1355 1360 1365

Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr
1370 1375 1380

Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu
1385 1390 1395

Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu
1400 1405 1410

Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His
1415 1420 1425

Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln
1430 1435 1440

Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp
1445 1450 1455

Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu	Arg Asn Cys Arg Ala	Pro Cys Asn
1460	1465	1470

Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr	Phe Lys Glu Asn Tyr	Arg Phe His
1475	1480	1485

Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met	Asp Thr Leu Pro Gly	Leu Val Met
1490	1495	1500

Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg	Trp Tyr Leu Leu Ser	Met Gly Ser
1505	1510	1515

Asn Glu Asn Ile His Ser Ile	His Phe Ser Gly His	Val Phe Thr
1520	1525	1530

Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr	Lys Met Ala Leu Tyr	Asn Leu Tyr
1535	1540	1545

Pro Gly Val Phe Glu Thr Val	Glu Met Leu Pro Ser	Lys Ala Gly
1550	1555	1560

Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu	Ile Gly Glu His Leu	His Ala Gly
1565	1570	1575

Met Ser Thr Leu Phe Leu Val	Tyr Ser Asn Lys Cys	Gln Thr Pro
1580	1585	1590

Leu Gly Met Ala Ser Gly His	Ile Arg Asp Phe Gln	Ile Thr Ala
1595	1600	1605

Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp	Ala Pro Lys Leu Ala	Arg Leu His
1610	1615	1620

Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser
1625 1630 1635

Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile
1640 1645 1650

Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser
1655 1660 1665

Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr
1670 1675 1680

Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn
1685 1690 1695

Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile
1700 1705 1710

Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg
1715 1720 1725

Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys
1730 1735 1740

Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln
1745 1750 1755

Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser
1760 1765 1770

Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp
1775 1780 1785

Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe
1790 1795 1800

Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys
1805 1810 1815

Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser
1820 1825 1830

Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys
1835 1840 1845

Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val
1850 1855 1860

Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His
1865 1870 1875

Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu
1880 1885 1890

Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
1895 1900 1905

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
1910 1915 1920

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
1925 1930 1935

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
1940 1945 1950

Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
1955			1960			1965								

Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
1970			1975			1980								

Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
1985			1990			1995								

Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
2000			2005			2010								

Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
2015			2020			2025								

Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln
2030			2035			2040								

Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
2045			2050			2055								

Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
2060			2065			2070								

Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr
2075			2080			2085								

Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val
2090			2095			2100								

Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
2105			2110			2115								

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
2120 2125

<210> 111
<211> 2128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FVIII 205 蛋白質序列

<400> 111

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Gly Ala Pro Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu
35 40 45

Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly
50 55 60

Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala
65 70 75 80

Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu
85 90 95

Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly
100 105 110

Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser
115 120 125

Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser
130 135 140

Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly
145 150 155 160

Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly
165 170 175

Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ala Ser Ser Ser Asp Leu Gly Glu
180 185 190

Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro
195 200 205

Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr
210 215 220

Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu
225 230 235 240

Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr
245 250 255

Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val
260 265 270

Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser
275 280 285

Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr
290 295 300

Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro
305 310 315 320

Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp
325 330 335

Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser
340 345 350

Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe
355 360 365

Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser
370 375 380

Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met
385 390 395 400

His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly
405 410 415

Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr
420 425 430

Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg
435 440 445

Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr
450 455 460

Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His
465 470 475 480

Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp
485 490 495

Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala
500 505 510

Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg
515 520 525

Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala
530 535 540

Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu
545 550 555 560

Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr
565 570 575

Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr
580 585 590

Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg
595 600 605

Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly
610 615 620

Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg
625 630 635 640

Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr
645 650 655

Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile
660 665 670

Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp
675 680 685

Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser
690 695 700

Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu
705 710 715 720

Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met
725 730 735

Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg
740 745 750

Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala
755 760 765

Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His
770 775 780

Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu
785 790 795 800

His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp
805 810 815

Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val
820 825 830

Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe
835 840 845

Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser
850 855 860

Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys
865 870 875 880

Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser
885 890 895

Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser
900 905 910

Gln Asn Gly Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly
915 920 925

Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser
930 935 940

Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser
945 950 955 960

Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly
965 970 975

Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro
980 985 990

Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr
 995 1000 1005

Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu
 1010 1015 1020

Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly
 1025 1030 1035

Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala
 1040 1045 1050

Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser
 1055 1060 1065

Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser
 1070 1075 1080

Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly
 1085 1090 1095

Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
 1100 1105 1110

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser
 1115 1120 1125

Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr
 1130 1135 1140

Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly
 1145 1150 1155

Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Glu	Pro
1160						1165					1170			

Ala	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr
1175						1180					1185			

Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser
1190						1195					1200			

Ala	Pro	Ala	Ser	Ser	Pro	Pro	Val	Leu	Lys	Arg	His	Gln	Ala	Glu
1205						1210					1215			

Ile	Thr	Arg	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr
1220						1225					1230			

Asp	Asp	Thr	Ile	Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile
1235						1240					1245			

Tyr	Asp	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe	Gln	Lys	Lys
1250						1255					1260			

Thr	Arg	His	Tyr	Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Trp	Asp	Tyr
1265						1270					1275			

Gly	Met	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser
1280						1285					1290			

Gly	Ser	Val	Pro	Gln	Phe	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr
1295						1300					1305			

Asp	Gly	Ser	Phe	Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Asn	Glu
1310						1315					1320			

His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp
1325 1330 1335

Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser
1340 1345 1350

Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly
1355 1360 1365

Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr
1370 1375 1380

Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu
1385 1390 1395

Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu
1400 1405 1410

Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His
1415 1420 1425

Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln
1430 1435 1440

Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp
1445 1450 1455

Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn
1460 1465 1470

Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His
1475 1480 1485

Ala Ile	Asn Gly Tyr Ile Met	Asp Thr Leu Pro Gly	Leu Val Met
1490	1495	1500	

Ala Gln	Asp Gln Arg Ile Arg	Trp Tyr Leu Leu Ser	Met Gly Ser
1505	1510	1515	

Asn Glu	Asn Ile His Ser Ile	His Phe Ser Gly His	Val Phe Thr
1520	1525	1530	

Val Arg	Lys Lys Glu Glu Tyr	Lys Met Ala Leu Tyr	Asn Leu Tyr
1535	1540	1545	

Pro Gly	Val Phe Glu Thr Val	Glu Met Leu Pro Ser	Lys Ala Gly
1550	1555	1560	

Ile Trp	Arg Val Glu Cys Leu	Ile Gly Glu His Leu	His Ala Gly
1565	1570	1575	

Met Ser	Thr Leu Phe Leu Val	Tyr Ser Asn Lys Cys	Gln Thr Pro
1580	1585	1590	

Leu Gly	Met Ala Ser Gly His	Ile Arg Asp Phe Gln	Ile Thr Ala
1595	1600	1605	

Ser Gly	Gln Tyr Gly Gln Trp	Ala Pro Lys Leu Ala	Arg Leu His
1610	1615	1620	

Tyr Ser	Gly Ser Ile Asn Ala	Trp Ser Thr Lys Glu	Pro Phe Ser
1625	1630	1635	

Trp Ile	Lys Val Asp Leu Leu	Ala Pro Met Ile Ile	His Gly Ile
1640	1645	1650	

Lys Thr	Gln Gly	Ala Arg	Gln	Lys Phe	Ser Ser	Leu	Tyr Ile	Ser
1655			1660			1665		

Gln Phe	Ile Ile	Met Tyr	Ser	Leu Asp	Gly Lys	Lys	Trp Gln	Thr
1670			1675			1680		

Tyr Arg	Gly Asn	Ser Thr	Gly	Thr Leu	Met Val	Phe	Phe Gly	Asn
1685			1690			1695		

Val Asp	Ser Ser	Gly Ile	Lys	His Asn	Ile Phe	Asn	Pro Pro	Ile
1700			1705			1710		

Ile Ala	Arg Tyr	Ile Arg	Leu	His Pro	Thr His	Tyr	Ser Ile	Arg
1715			1720			1725		

Ser Thr	Leu Arg	Met Glu	Leu	Met Gly	Cys Asp	Leu	Asn Ser	Cys
1730			1735			1740		

Ser Met	Pro Leu	Gly Met	Glu	Ser Lys	Ala Ile	Ser	Asp Ala	Gln
1745			1750			1755		

Ile Thr	Ala Ser	Ser Tyr	Phe	Thr Asn	Met Phe	Ala	Thr Trp	Ser
1760			1765			1770		

Pro Ser	Lys Ala	Arg Leu	His	Leu Gln	Gly Arg	Ser	Asn Ala	Trp
1775			1780			1785		

Arg Pro	Gln Val	Asn Asn	Pro	Lys Glu	Trp Leu	Gln	Val Asp	Phe
1790			1795			1800		

Gln Lys	Thr Met	Lys Val	Thr	Gly Val	Thr Thr	Gln	Gly Val	Lys
1805			1810			1815		

Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys	Glu	Phe	Leu	Ile	Ser	Ser
1820						1825						1830		

Ser	Gln	Asp	Gly	His	Gln	Trp	Thr	Leu	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys
1835						1840						1845		

Val	Lys	Val	Phe	Gln	Gly	Asn	Gln	Asp	Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Val
1850						1855						1860		

Asn	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His
1865						1870						1875		

Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala	Leu	Arg	Met	Glu	Val	Leu
1880						1885						1890		

Gly	Cys	Glu	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro
1895						1900						1905		

Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
1910						1915						1920		

Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
1925						1930						1935		

Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
1940							1945					1950		

Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
1955							1960					1965		

Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
1970							1975					1980		

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
1985 1990 1995

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
2000 2005 2010

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
2015 2020 2025

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
2030 2035 2040

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
2045 2050 2055

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
2060 2065 2070

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
2075 2080 2085

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
2090 2095 2100

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
2105 2110 2115

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
2120 2125

- <210> 112
- <211> 2020
- <212> PRT
- <213> 人工序列

<220>

<223> pSYN FVIII 266 蛋白質序列

<400> 112

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Gly Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
35 40 45

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
50 55 60

Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Ala Ser Ser Ser
65 70 75 80

Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro Arg Val Pro
85 90 95

Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys Thr Leu Phe
100 105 110

Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro Arg Pro Pro
115 120 125

Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val Tyr Asp Thr
130 135 140

Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val Ser Leu His
145 150 155 160

Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala Glu Tyr Asp
165 170 175

Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val Phe Pro Gly
180 185 190

Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn Gly Pro Met
195 200 205

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

Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu Leu Val Cys
225 230 235 240

Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu His Lys Phe
245 250 255

Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp His Ser Glu
260 265 270

Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser Ala Arg Ala
275 280 285

Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro
290 295 300

Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His Val Ile Gly
305 310 315 320

Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu Gly His Thr
325 330 335

Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile Ser Pro Ile
 340 345 350

Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly Gln Phe Leu
 355 360 365

Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met Glu Ala Tyr
 370 375 380

Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn
 385 390 395 400

Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met
 405 410 415

Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe Ile Gln Ile
 420 425 430

Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His Tyr Ile Ala
 435 440 445

Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu Ala Pro Asp
 450 455 460

Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro Gln Arg Ile
 465 470 475 480

Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr Asp Glu Thr
 485 490 495

Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile Leu Gly Pro
 500 505 510

Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn
515 520 525

Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile Thr Asp Val
530 535 540

Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys His Leu Lys
545 550 555 560

Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys Trp Thr Val
565 570 575

Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys Leu Thr Arg
580 585 590

Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala Ser Gly Leu
595 600 605

Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp Gln Arg Gly
610 615 620

Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe Ser Val Phe
625 630 635 640

Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln Arg Phe Leu
645 650 655

Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe Gln Ala Ser
660 665 670

Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser Leu Gln Leu
675 680 685

Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu Ser Ile Gly
690 695 700

Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr Thr Phe Lys
705 710 715 720

His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro Phe Ser Gly
725 730 735

Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp Ile Leu Gly
740 745 750

Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala Leu Leu Lys
755 760 765

Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr
770 775 780

Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala Ile Glu Pro
785 790 795 800

Arg Ser Phe Ser Gln Asn Gly Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr
805 810 815

Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr
820 825 830

Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu
835 840 845

Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr
850 855 860

Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala
865 870 875 880

Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser
885 890 895

Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser
900 905 910

Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly
915 920 925

Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro
930 935 940

Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser
945 950 955 960

Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly
965 970 975

Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser
980 985 990

Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser
995 1000 1005

Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu
1010 1015 1020

Thr Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly
1025 1030 1035

Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
1040 1045 1050

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser
1055 1060 1065

Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser
1070 1075 1080

Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Ala
1085 1090 1095

Ser Ser Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Ala Glu Ile Thr Arg
1100 1105 1110

Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr
1115 1120 1125

Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu
1130 1135 1140

Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His
1145 1150 1155

Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser
1160 1165 1170

Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val
1175 1180 1185

Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser
1190 1195 1200

Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly
1205 1210 1215

Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met
1220 1225 1230

Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser
1235 1240 1245

Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro
1250 1255 1260

Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp
1265 1270 1275

Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys
1280 1285 1290

Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val
1295 1300 1305

His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr
1310 1315 1320

Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala
1325 1330 1335

Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr
1340 1345 1350

Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met
1355 1360 1365

Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn
1370 1375 1380

Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp
1385 1390 1395

Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn
1400 1405 1410

Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys
1415 1420 1425

Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val
1430 1435 1440

Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg
1445 1450 1455

Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr
1460 1465 1470

Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met
1475 1480 1485

Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln
1490 1495 1500

Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly
1505 1510 1515

Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys
1520 1525 1530

Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln
1535 1540 1545

Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile
1550 1555 1560

Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly
1565 1570 1575

Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser
1580 1585 1590

Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg
1595 1600 1605

Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu
1610 1615 1620

Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro
1625 1630 1635

Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala
1640 1645 1650

Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys
1655 1660 1665

Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln
1670 1675 1680

Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr
1685 1690 1695

Met	Lys	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Thr	Gln	Gly	Val	Lys	Ser	Leu	Leu
1700			1705			1710								

Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys	Glu	Phe	Leu	Ile	Ser	Ser	Ser	Gln	Asp
1715			1720			1725								

Gly	His	Gln	Trp	Thr	Leu	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys	Val	Lys	Val
1730			1735			1740								

Phe	Gln	Gly	Asn	Gln	Asp	Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Val	Asn	Ser	Leu
1745			1750			1755								

Asp	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser
1760			1765			1770								

Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala	Leu	Arg	Met	Glu	Val	Leu	Gly	Cys	Glu
1775			1780			1785								

Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
1790			1795			1800								

Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
1805			1810			1815								

Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
1820			1825			1830								

Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
1835			1840			1845								

Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys
1850			1855			1860								

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
1865 1870 1875

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
1880 1885 1890

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
1895 1900 1905

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
1910 1915 1920

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
1925 1930 1935

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
1940 1945 1950

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
1955 1960 1965

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
1970 1975 1980

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
1985 1990 1995

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
2000 2005 2010

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
2015 2020

<210> 113
<211> 2056
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> pSYN FVIII 267 蛋白質序列

<400> 113

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
 20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Gly Ala Pro Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu
 35 40 45

Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly
 50 55 60

Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala
65 70 75 80

Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu
 85 90 95

Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly
 100 105 110

Ala Ser Ser Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro
 115 120 125

Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys
130 135 140

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

Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu
165 170 175

Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro
180 185 190

Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly
195 200 205

Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys
210 215 220

Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu
225 230 235 240

Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu
245 250 255

Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala
260 265 270

Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr
275 280 285

Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser
290 295 300

Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala
305 310 315 320

Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn
325 330 335

Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp
340 345 350

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

Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu
370 375 380

Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu
385 390 395 400

Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly
405 410 415

Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu
420 425 430

Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr
435 440 445

Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser
450 455 460

Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val
465 470 475 480

His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val
 485 490 495

Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly
 500 505 510

Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr
 515 520 525

Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly
 530 535 540

Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile
 545 550 555 560

Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly
 565 570 575

Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val
 580 585 590

Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr
 595 600 605

Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg
 610 615 620

Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu
 625 630 635 640

Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val
 645 650 655

Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu
660 665 670

Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile
675 680 685

Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu
690 695 700

Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp
705 710 715 720

Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile
725 730 735

Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly
740 745 750

Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe
755 760 765

Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu
770 775 780

Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr
785 790 795 800

Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr
805 810 815

Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn
820 825 830

Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Gly Ala Pro Gly Thr Ser
835 840 845

Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser
850 855 860

Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly
865 870 875 880

Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser
885 890 895

Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser
900 905 910

Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu
915 920 925

Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu
930 935 940

Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr
945 950 955 960

Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu
965 970 975

Glu Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser
980 985 990

Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr
995 1000 1005

Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser
1010			1015			1020								

Gly	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly
1025			1030			1035								

Ser	Glu	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Pro	Gly	Ser	Glu	Pro
1040			1045			1050								

Ala	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Pro	Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Pro
1055			1060			1065								

Thr	Ser	Thr	Glu	Glu	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser
1070			1075			1080								

Ala	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly
1085			1090			1095								

Ser	Glu	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu
1100			1105			1110								

Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser
1115			1120			1125								

Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Ala	Ser	Ser	Pro	Pro	Val	Leu	Lys	Arg	His
1130			1135			1140								

Gln	Ala	Glu	Ile	Thr	Arg	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu
1145			1150			1155								

Ile	Asp	Tyr	Asp	Asp	Thr	Ile	Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp
1160			1165			1170								

Phe	Asp	Ile	Tyr	Asp	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe
1175						1180					1185			

Gln	Lys	Lys	Thr	Arg	His	Tyr	Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu
1190						1195					1200			

Trp	Asp	Tyr	Gly	Met	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn	Arg
1205						1210					1215			

Ala	Gln	Ser	Gly	Ser	Val	Pro	Gln	Phe	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Gln
1220						1225					1230			

Glu	Phe	Thr	Asp	Gly	Ser	Phe	Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr	Arg	Gly	Glu
1235						1240					1245			

Leu	Asn	Glu	His	Leu	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Ile	Arg	Ala	Glu
1250						1255					1260			

Val	Glu	Asp	Asn	Ile	Met	Val	Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg
1265						1270					1275			

Pro	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Ser	Ser	Leu	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Asp	Gln
1280						1285					1290			

Arg	Gln	Gly	Ala	Glu	Pro	Arg	Lys	Asn	Phe	Val	Lys	Pro	Asn	Glu
1295						1300					1305			

Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Trp	Lys	Val	Gln	His	His	Met	Ala	Pro	Thr
1310						1315					1320			

Lys	Asp	Glu	Phe	Asp	Cys	Lys	Ala	Trp	Ala	Tyr	Phe	Ser	Asp	Val
1325						1330					1335			

Asp	Leu	Glu	Lys	Asp	Val	His	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu
1340						1345					1350			

Val	Cys	His	Thr	Asn	Thr	Leu	Asn	Pro	Ala	His	Gly	Arg	Gln	Val
1355						1360					1365			

Thr	Val	Gln	Glu	Phe	Ala	Leu	Phe	Phe	Thr	Ile	Phe	Asp	Glu	Thr
1370						1375					1380			

Lys	Ser	Trp	Tyr	Phe	Thr	Glu	Asn	Met	Glu	Arg	Asn	Cys	Arg	Ala
1385						1390					1395			

Pro	Cys	Asn	Ile	Gln	Met	Glu	Asp	Pro	Thr	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr
1400						1405					1410			

Arg	Phe	His	Ala	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ile	Met	Asp	Thr	Leu	Pro	Gly
1415						1420					1425			

Leu	Val	Met	Ala	Gln	Asp	Gln	Arg	Ile	Arg	Trp	Tyr	Leu	Leu	Ser
1430						1435					1440			

Met	Gly	Ser	Asn	Glu	Asn	Ile	His	Ser	Ile	His	Phe	Ser	Gly	His
1445						1450					1455			

Val	Phe	Thr	Val	Arg	Lys	Lys	Glu	Glu	Tyr	Lys	Met	Ala	Leu	Tyr
1460						1465					1470			

Asn	Leu	Tyr	Pro	Gly	Val	Phe	Glu	Thr	Val	Glu	Met	Leu	Pro	Ser
1475						1480					1485			

Lys	Ala	Gly	Ile	Trp	Arg	Val	Glu	Cys	Leu	Ile	Gly	Glu	His	Leu
1490						1495					1500			

His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys
 1505 1510 1515

Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln
 1520 1525 1530

Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala
 1535 1540 1545

Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu
 1550 1555 1560

Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile
 1565 1570 1575

His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu
 1580 1585 1590

Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys
 1595 1600 1605

Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe
 1610 1615 1620

Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn
 1625 1630 1635

Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr
 1640 1645 1650

Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu
 1655 1660 1665

Asn	Ser	Cys	Ser	Met	Pro	Leu	Gly	Met	Glu	Ser	Lys	Ala	Ile	Ser
1670						1675					1680			

Asp	Ala	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Thr	Asn	Met	Phe	Ala
1685						1690					1695			

Thr	Trp	Ser	Pro	Ser	Lys	Ala	Arg	Leu	His	Leu	Gln	Gly	Arg	Ser
1700						1705					1710			

Asn	Ala	Trp	Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Glu	Trp	Leu	Gln
1715						1720					1725			

Val	Asp	Phe	Gln	Lys	Thr	Met	Lys	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Thr	Gln
1730						1735					1740			

Gly	Val	Lys	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys	Glu	Phe	Leu
1745						1750					1755			

Ile	Ser	Ser	Ser	Gln	Asp	Gly	His	Gln	Trp	Thr	Leu	Phe	Phe	Gln
1760						1765					1770			

Asn	Gly	Lys	Val	Lys	Val	Phe	Gln	Gly	Asn	Gln	Asp	Ser	Phe	Thr
1775						1780					1785			

Pro	Val	Val	Asn	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu
1790						1795					1800			

Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala	Leu	Arg	Met
1805						1810					1815			

Glu	Val	Leu	Gly	Cys	Glu	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr	Asp	Lys	Thr	His
1820						1825					1830			

Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
1835						1840					1845			

Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
1850						1855					1860			

Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
1865						1870					1875			

Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
1880						1885					1890			

His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
1895						1900					1905			

Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
1910						1915					1920			

Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
1925						1930					1935			

Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
1940						1945					1950			

Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr
1955						1960					1965			

Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro
1970						1975					1980			

Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
1985						1990					1995			

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
2000 2005 2010

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
2015 2020 2025

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
2030 2035 2040

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
2045 2050 2055

<210> 114
<211> 1834
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> pSYN FVIII 268 蛋白質序列

<400> 114

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Gly Ala Pro Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu
35 40 45

Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly
50 55 60

Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala
65 70 75 80

Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu
85 90 95

Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly
100 105 110

Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser
115 120 125

Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser
130 135 140

Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly
145 150 155 160

Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly
165 170 175

Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ala Ser Ser Ser Asp Leu Gly Glu
180 185 190

Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro
195 200 205

Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr
210 215 220

Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu
225 230 235 240

Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr
245 250 255

Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val
 260 265 270

Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser
 275 280 285

Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr
 290 295 300

Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro
 305 310 315 320

Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp
 325 330 335

Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser
 340 345 350

Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe
 355 360 365

Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser
 370 375 380

Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met
 385 390 395 400

His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly
 405 410 415

Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr
 420 425 430

Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg
 435 440 445

Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr
 450 455 460

Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His
 465 470 475 480

Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp
 485 490 495

Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala
 500 505 510

Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg
 515 520 525

Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala
 530 535 540

Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu
 545 550 555 560

Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr
 565 570 575

Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr
 580 585 590

Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg
 595 600 605

Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly
610 615 620

Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg
625 630 635 640

Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr
645 650 655

Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile
660 665 670

Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp
675 680 685

Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser
690 695 700

Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu
705 710 715 720

Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met
725 730 735

Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg
740 745 750

Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala
755 760 765

Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His
770 775 780

Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu
785 790 795 800

His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp
805 810 815

Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val
820 825 830

Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe
835 840 845

Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser
850 855 860

Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys
865 870 875 880

Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser
885 890 895

Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser
900 905 910

Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Ala Glu Ile Thr Arg Thr
915 920 925

Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser
930 935 940

Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn
945 950 955 960

Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala
 965 970 975

Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val
 980 985 990

Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val
 995 1000 1005

Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr
 1010 1015 1020

Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile
 1025 1030 1035

Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln
 1040 1045 1050

Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu
 1055 1060 1065

Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys
 1070 1075 1080

Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met
 1085 1090 1095

Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe
 1100 1105 1110

Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly
 1115 1120 1125

Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly
1130 1135 1140

Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe
1145 1150 1155

Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn
1160 1165 1170

Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys
1175 1180 1185

Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr
1190 1195 1200

Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr
1205 1210 1215

Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe
1220 1225 1230

Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met
1235 1240 1245

Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met
1250 1255 1260

Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly
1265 1270 1275

Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser
1280 1285 1290

Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Met	Ala	Ser	Gly	His	Ile	Arg
1295						1300					1305			

Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Gln	Trp	Ala	Pro
1310						1315					1320			

Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His	Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	Trp	Ser
1325						1330					1335			

Thr	Lys	Glu	Pro	Phe	Ser	Trp	Ile	Lys	Val	Asp	Leu	Leu	Ala	Pro
1340						1345					1350			

Met	Ile	Ile	His	Gly	Ile	Lys	Thr	Gln	Gly	Ala	Arg	Gln	Lys	Phe
1355						1360					1365			

Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp
1370						1375					1380			

Gly	Lys	Lys	Trp	Gln	Thr	Tyr	Arg	Gly	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Leu
1385						1390					1395			

Met	Val	Phe	Phe	Gly	Asn	Val	Asp	Ser	Ser	Gly	Ile	Lys	His	Asn
1400						1405					1410			

Ile	Phe	Asn	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro
1415						1420					1425			

Thr	His	Tyr	Ser	Ile	Arg	Ser	Thr	Leu	Arg	Met	Glu	Leu	Met	Gly
1430						1435					1440			

Cys	Asp	Leu	Asn	Ser	Cys	Ser	Met	Pro	Leu	Gly	Met	Glu	Ser	Lys
1445						1450					1455			

Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn
1460 1465 1470

Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln
1475 1480 1485

Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu
1490 1495 1500

Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val
1505 1510 1515

Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys
1520 1525 1530

Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu
1535 1540 1545

Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp
1550 1555 1560

Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr
1565 1570 1575

Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala
1580 1585 1590

Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr Asp
1595 1600 1605

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1610 1615 1620

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
1625 1630 1635

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
1640 1645 1650

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
1655 1660 1665

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
1670 1675 1680

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
1685 1690 1695

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
1700 1705 1710

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
1715 1720 1725

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
1730 1735 1740

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
1745 1750 1755

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
1760 1765 1770

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
1775 1780 1785

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
1790 1795 1800

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
1805 1810 1815

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1820 1825 1830

Lys

- <210> 115
- <211> 1762
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> pSYN FVIII 269 蛋白質序列

<400> 115

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Gly Ala Pro Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu
35 40 45

Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly
50 55 60

Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala
65 70 75 80

Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu
85 90 95

Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly
100 105 110

Ala Ser Ser Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro
115 120 125

Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys
130 135 140

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

Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu
165 170 175

Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro
180 185 190

Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly
195 200 205

Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys
210 215 220

Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu
225 230 235 240

Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu
245 250 255

Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala
260 265 270

Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr
275 280 285

Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser
290 295 300

Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala
305 310 315 320

Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn
325 330 335

Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp
340 345 350

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

Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu
370 375 380

Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu
385 390 395 400

Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly
405 410 415

Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu
420 425 430

Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr
435 440 445

Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser
450 455 460

Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val
465 470 475 480

His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val
485 490 495

Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly
500 505 510

Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr
515 520 525

Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly
530 535 540

Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile
545 550 555 560

Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly
565 570 575

Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val
580 585 590

Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr
595 600 605

Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg
610 615 620

Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu
625 630 635 640

Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val
645 650 655

Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu
660 665 670

Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile
675 680 685

Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu
690 695 700

Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp
705 710 715 720

Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile
725 730 735

Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly
740 745 750

Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe
755 760 765

Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu
770 775 780

Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr
785 790 795 800

Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr
805 810 815

Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn
820 825 830

Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg
835 840 845

His Gln Ala Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu
850 855 860

Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe
865 870 875 880

Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys
885 890 895

Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr
900 905 910

Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly
915 920 925

Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly
930 935 940

Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly
945 950 955 960

Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val
965 970 975

Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu
980 985 990

Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn
995 1000 1005

Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln
1010 1015 1020

His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp
1025 1030 1035

Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly
1040 1045 1050

Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro
1055 1060 1065

Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe
1070 1075 1080

Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met
1085 1090 1095

Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro
1100 1105 1110

Thr	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ile
1115						1120					1125			

Met	Asp	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Met	Ala	Gln	Asp	Gln	Arg	Ile
1130						1135					1140			

Arg	Trp	Tyr	Leu	Leu	Ser	Met	Gly	Ser	Asn	Glu	Asn	Ile	His	Ser
1145						1150					1155			

Ile	His	Phe	Ser	Gly	His	Val	Phe	Thr	Val	Arg	Lys	Lys	Glu	Glu
1160						1165					1170			

Tyr	Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Pro	Gly	Val	Phe	Glu	Thr
1175						1180					1185			

Val	Glu	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ala	Gly	Ile	Trp	Arg	Val	Glu	Cys
1190						1195					1200			

Leu	Ile	Gly	Glu	His	Leu	His	Ala	Gly	Met	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu
1205						1210					1215			

Val	Tyr	Ser	Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Met	Ala	Ser	Gly
1220						1225					1230			

His	Ile	Arg	Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Gln
1235						1240					1245			

Trp	Ala	Pro	Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His	Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile	Asn
1250						1255					1260			

Ala	Trp	Ser	Thr	Lys	Glu	Pro	Phe	Ser	Trp	Ile	Lys	Val	Asp	Leu
1265						1270					1275			

Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg
1280 1285 1290

Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr
1295 1300 1305

Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr
1310 1315 1320

Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile
1325 1330 1335

Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg
1340 1345 1350

Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu
1355 1360 1365

Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met
1370 1375 1380

Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr
1385 1390 1395

Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu
1400 1405 1410

His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn
1415 1420 1425

Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val
1430 1435 1440

Thr Gly	Val Thr Thr Gln Gly	Val Lys Ser Leu Leu	Thr Ser Met
1445	1450	1455	

Tyr Val	Lys Glu Phe Leu Ile	Ser Ser Ser Gln Asp	Gly His Gln
1460	1465	1470	

Trp Thr	Leu Phe Phe Gln Asn	Gly Lys Val Lys Val	Phe Gln Gly
1475	1480	1485	

Asn Gln	Asp Ser Phe Thr Pro	Val Val Asn Ser Leu	Asp Pro Pro
1490	1495	1500	

Leu Leu	Thr Arg Tyr Leu Arg	Ile His Pro Gln Ser	Trp Val His
1505	1510	1515	

Gln Ile	Ala Leu Arg Met Glu	Val Leu Gly Cys Glu	Ala Gln Asp
1520	1525	1530	

Leu Tyr	Asp Lys Thr His Thr	Cys Pro Pro Cys Pro	Ala Pro Glu
1535	1540	1545	

Leu Leu	Gly Gly Pro Ser Val	Phe Leu Phe Pro Pro	Lys Pro Lys
1550	1555	1560	

Asp Thr	Leu Met Ile Ser Arg	Thr Pro Glu Val Thr	Cys Val Val
1565	1570	1575	

Val Asp	Val Ser His Glu Asp	Pro Glu Val Lys Phe	Asn Trp Tyr
1580	1585	1590	

Val Asp	Gly Val Glu Val His	Asn Ala Lys Thr Lys	Pro Arg Glu
1595	1600	1605	

Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
1610						1615					1620			

Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val
1625						1630					1635			

Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys
1640						1645					1650			

Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
1655						1660					1665			

Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
1670						1675					1680			

Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
1685						1690					1695			

Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
1700						1705					1710			

Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
1715						1720					1725			

Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
1730						1735					1740			

His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu
1745						1750					1755			

Ser	Pro	Gly	Lys
1760			

<210> 116
<211> 1726
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> pSYNFVIII 271 蛋白質序列

<400> 116

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

Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val Ser Leu His
145 150 155 160

Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala Glu Tyr Asp
165 170 175

Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val Phe Pro Gly
180 185 190

Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn Gly Pro Met
195 200 205

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

Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu Leu Val Cys
225 230 235 240

Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu His Lys Phe
245 250 255

Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp His Ser Glu
260 265 270

Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser Ala Arg Ala
275 280 285

Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro
290 295 300

Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His Val Ile Gly
305 310 315 320

Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu Gly His Thr
325 330 335

Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile Ser Pro Ile
340 345 350

Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly Gln Phe Leu
355 360 365

Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met Glu Ala Tyr
370 375 380

Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn
385 390 395 400

Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met
405 410 415

Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe Ile Gln Ile
420 425 430

Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His Tyr Ile Ala
435 440 445

Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu Ala Pro Asp
450 455 460

Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro Gln Arg Ile
465 470 475 480

Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr Asp Glu Thr
485 490 495

Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile Leu Gly Pro
500 505 510

Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn
515 520 525

Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile Thr Asp Val
530 535 540

Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys His Leu Lys
545 550 555 560

Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys Trp Thr Val
565 570 575

Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys Leu Thr Arg
580 585 590

Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala Ser Gly Leu
595 600 605

Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp Gln Arg Gly
610 615 620

Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe Ser Val Phe
625 630 635 640

Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln Arg Phe Leu
645 650 655

Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe Gln Ala Ser
660 665 670

Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser Leu Gln Leu
675 680 685

Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu Ser Ile Gly
690 695 700

Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr Thr Phe Lys
705 710 715 720

His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro Phe Ser Gly
725 730 735

Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp Ile Leu Gly
740 745 750

Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala Leu Leu Lys
755 760 765

Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr
770 775 780

Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala Ile Glu Pro
785 790 795 800

Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Ala Glu
805 810 815

Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp
820 825 830

Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp
835 840 845

Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His
850 855 860

Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser
865 870 875 880

Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln
885 890 895

Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln
900 905 910

Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro
915 920 925

Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn
930 935 940

Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu
945 950 955 960

Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro
965 970 975

Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro
980 985 990

Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val
995 1000 1005

Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu
1010 1015 1020

Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val
1025 1030 1035

Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr
1040 1045 1050

Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala
1055 1060 1065

Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr
1070 1075 1080

Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly
1085 1090 1095

Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser
1100 1105 1110

Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His
1115 1120 1125

Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr
1130 1135 1140

Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser
1145 1150 1155

Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu
1160 1165 1170

His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys
1175 1180 1185

Gln Thr	Pro Leu Gly Met Ala	Ser Gly His Ile Arg	Asp Phe Gln
1190	1195	1200	

Ile Thr	Ala Ser Gly Gln Tyr	Gly Gln Trp Ala Pro	Lys Leu Ala
1205	1210	1215	

Arg Leu	His Tyr Ser Gly Ser	Ile Asn Ala Trp Ser	Thr Lys Glu
1220	1225	1230	

Pro Phe	Ser Trp Ile Lys Val	Asp Leu Leu Ala Pro	Met Ile Ile
1235	1240	1245	

His Gly	Ile Lys Thr Gln Gly	Ala Arg Gln Lys Phe	Ser Ser Leu
1250	1255	1260	

Tyr Ile	Ser Gln Phe Ile Ile	Met Tyr Ser Leu Asp	Gly Lys Lys
1265	1270	1275	

Trp Gln	Thr Tyr Arg Gly Asn	Ser Thr Gly Thr Leu	Met Val Phe
1280	1285	1290	

Phe Gly	Asn Val Asp Ser Ser	Gly Ile Lys His Asn	Ile Phe Asn
1295	1300	1305	

Pro Pro	Ile Ile Ala Arg Tyr	Ile Arg Leu His Pro	Thr His Tyr
1310	1315	1320	

Ser Ile	Arg Ser Thr Leu Arg	Met Glu Leu Met Gly	Cys Asp Leu
1325	1330	1335	

Asn Ser	Cys Ser Met Pro Leu	Gly Met Glu Ser Lys	Ala Ile Ser
1340	1345	1350	

Asp	Ala	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Thr	Asn	Met	Phe	Ala
1355							1360				1365			

Thr	Trp	Ser	Pro	Ser	Lys	Ala	Arg	Leu	His	Leu	Gln	Gly	Arg	Ser
1370							1375				1380			

Asn	Ala	Trp	Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Glu	Trp	Leu	Gln
1385							1390				1395			

Val	Asp	Phe	Gln	Lys	Thr	Met	Lys	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Thr	Gln
1400							1405				1410			

Gly	Val	Lys	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys	Glu	Phe	Leu
1415							1420				1425			

Ile	Ser	Ser	Ser	Gln	Asp	Gly	His	Gln	Trp	Thr	Leu	Phe	Phe	Gln
1430							1435				1440			

Asn	Gly	Lys	Val	Lys	Val	Phe	Gln	Gly	Asn	Gln	Asp	Ser	Phe	Thr
1445							1450				1455			

Pro	Val	Val	Asn	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu
1460							1465				1470			

Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala	Leu	Arg	Met
1475							1480				1485			

Glu	Val	Leu	Gly	Cys	Glu	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr	Asp	Lys	Thr	His
1490							1495				1500			

Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
1505							1510				1515			

Val Phe	Leu Phe	Pro Pro	Lys	Pro Lys	Asp Thr	Leu	Met Ile	Ser
1520			1525			1530		

Arg Thr	Pro Glu	Val Thr	Cys	Val Val	Val Asp	Val	Ser His	Glu
1535			1540			1545		

Asp Pro	Glu Val	Lys Phe	Asn	Trp Tyr	Val Asp	Gly	Val Glu	Val
1550			1555			1560		

His Asn	Ala Lys	Thr Lys	Pro	Arg Glu	Glu Gln	Tyr	Asn Ser	Thr
1565			1570			1575		

Tyr Arg	Val Val	Ser Val	Leu	Thr Val	Leu His	Gln	Asp Trp	Leu
1580			1585			1590		

Asn Gly	Lys Glu	Tyr Lys	Cys	Lys Val	Ser Asn	Lys	Ala Leu	Pro
1595			1600			1605		

Ala Pro	Ile Glu	Lys Thr	Ile	Ser Lys	Ala Lys	Gly	Gln Pro	Arg
1610			1615			1620		

Glu Pro	Gln Val	Tyr Thr	Leu	Pro Pro	Ser Arg	Asp	Glu Leu	Thr
1625			1630			1635		

Lys Asn	Gln Val	Ser Leu	Thr	Cys Leu	Val Lys	Gly	Phe Tyr	Pro
1640			1645			1650		

Ser Asp	Ile Ala	Val Glu	Trp	Glu Ser	Asn Gly	Gln	Pro Glu	Asn
1655			1660			1665		

Asn Tyr	Lys Thr	Thr Pro	Pro	Val Leu	Asp Ser	Asp	Gly Ser	Phe
1670			1675			1680		

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
1685 1690 1695

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
1700 1705 1710

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
1715 1720 1725

- <210> 117
- <211> 1901
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> pSYN FVIII 蛋白質序列 272

<400> 117

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Gly Ala Pro Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu
35 40 45

Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly
50 55 60

Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala
65 70 75 80

Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu
85 90 95

Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly
100 105 110

Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser
115 120 125

Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser
130 135 140

Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly
145 150 155 160

Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly
165 170 175

Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ala Ser Ser Ser Asp Leu Gly Glu
180 185 190

Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro
195 200 205

Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr
210 215 220

Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu
225 230 235 240

Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr
245 250 255

Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val
260 265 270

Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser
275 280 285

Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr
290 295 300

Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro
305 310 315 320

Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp
325 330 335

Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser
340 345 350

Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe
355 360 365

Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser
370 375 380

Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met
385 390 395 400

His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly
405 410 415

Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr
420 425 430

Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg
435 440 445

Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr
450 455 460

Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His
465 470 475 480

Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp
485 490 495

Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala
500 505 510

Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg
515 520 525

Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala
530 535 540

Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu
545 550 555 560

Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr
565 570 575

Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr
580 585 590

Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg
595 600 605

Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly
610 615 620

Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg
625 630 635 640

Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr
645 650 655

Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile
660 665 670

Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp
675 680 685

Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser
690 695 700

Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu
705 710 715 720

Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met
725 730 735

Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg
740 745 750

Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala
755 760 765

Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His
770 775 780

Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu
785 790 795 800

His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp
805 810 815

Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val
820 825 830

Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe
835 840 845

Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser
850 855 860

Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys
865 870 875 880

Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser
885 890 895

Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser
900 905 910

Gln Asn Gly Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly
915 920 925

Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser
930 935 940

Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser
945 950 955 960

Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly
965 970 975

Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro
980 985 990

Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr
995 1000 1005

Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu
1010 1015 1020

Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly
1025 1030 1035

Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala
1040 1045 1050

Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser
1055 1060 1065

Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser
1070 1075 1080

Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly
1085 1090 1095

Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
1100 1105 1110

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser
1115 1120 1125

Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr
1130 1135 1140

Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly
1145 1150 1155

Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Glu Pro
1160 1165 1170

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr
1175 1180 1185

Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser
1190 1195 1200

Ala Pro Ala Ser Ser Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Ala Glu
1205 1210 1215

Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr
1220 1225 1230

Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile
1235 1240 1245

Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys
1250 1255 1260

Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr
1265 1270 1275

Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser
1280 1285 1290

Gly Ser	Val Pro Gln Phe Lys	Lys Val Val Phe Gln	Glu Phe Thr
1295	1300	1305	

Asp Gly	Ser Phe Thr Gln Pro	Leu Tyr Arg Gly Glu	Leu Asn Glu
1310	1315	1320	

His Leu	Gly Leu Leu Gly Pro	Tyr Ile Arg Ala Glu	Val Glu Asp
1325	1330	1335	

Asn Ile	Met Val Thr Phe Arg	Asn Gln Ala Ser Arg	Pro Tyr Ser
1340	1345	1350	

Phe Tyr	Ser Ser Leu Ile Ser	Tyr Glu Glu Asp Gln	Arg Gln Gly
1355	1360	1365	

Ala Glu	Pro Arg Lys Asn Phe	Val Lys Pro Asn Glu	Thr Lys Thr
1370	1375	1380	

Tyr Phe	Trp Lys Val Gln His	His Met Ala Pro Thr	Lys Asp Glu
1385	1390	1395	

Phe Asp	Cys Lys Ala Trp Ala	Tyr Phe Ser Asp Val	Asp Leu Glu
1400	1405	1410	

Lys Asp	Val His Ser Gly Leu	Ile Gly Pro Leu Leu	Val Cys His
1415	1420	1425	

Thr Asn	Thr Leu Asn Pro Ala	His Gly Arg Gln Val	Thr Val Gln
1430	1435	1440	

Glu Phe	Ala Leu Phe Phe Thr	Ile Phe Asp Glu Thr	Lys Ser Trp
1445	1450	1455	

Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn
1460 1465 1470

Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His
1475 1480 1485

Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met
1490 1495 1500

Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser
1505 1510 1515

Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr
1520 1525 1530

Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr
1535 1540 1545

Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly
1550 1555 1560

Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly
1565 1570 1575

Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro
1580 1585 1590

Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala
1595 1600 1605

Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His
1610 1615 1620

Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser
1625 1630 1635

Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile
1640 1645 1650

Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser
1655 1660 1665

Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr
1670 1675 1680

Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn
1685 1690 1695

Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile
1700 1705 1710

Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg
1715 1720 1725

Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys
1730 1735 1740

Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln
1745 1750 1755

Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser
1760 1765 1770

Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp
1775 1780 1785

Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe
1790 1795 1800

Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys
1805 1810 1815

Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser
1820 1825 1830

Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys
1835 1840 1845

Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val
1850 1855 1860

Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His
1865 1870 1875

Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu
1880 1885 1890

Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
1895 1900

<210> 118

<211> 1515

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pSYN VWF 031 蛋白質序列

<400> 118

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
20 25 30

Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
35 40 45

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
50 55 60

Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
65 70 75 80

Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu
85 90 95

Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
100 105 110

Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys
115 120 125

Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
130 135 140

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
145 150 155 160

Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln
165 170 175

Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala
180 185 190

Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser
195 200 205

Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln
210 215 220

Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu
225 230 235 240

Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu
245 250 255

Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala
260 265 270

Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His
275 280 285

Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys
290 295 300

Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met
305 310 315 320

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu
325 330 335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His
340 345 350

Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn
355 360 365

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys
 370 375 380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp
 385 390 395 400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg
 405 410 415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys
 420 425 430

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu
 435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val
 450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Ile Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu
 465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu
 485 490 495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu
 500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn
 515 520 525

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro
 530 535 540

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln
545 550 555 560

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met
565 570 575

Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe
580 585 590

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
595 600 605

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly
610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu
660 665 670

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe
675 680 685

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys
690 695 700

Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp
705 710 715 720

Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met
725 730 735

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val
740 745 750

Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg
755 760 765

Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu
770 775 780

Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met
785 790 795 800

Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg
805 810 815

His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln
820 825 830

Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr
835 840 845

Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp
850 855 860

Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly
865 870 875 880

Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp
885 890 895

Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys
 900 905 910

Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu
 915 920 925

Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys
 930 935 940

Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg
 945 950 955 960

Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg
 965 970 975

His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val
 980 985 990

Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr
 995 1000 1005

Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn
 1010 1015 1020

Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro
 1025 1030 1035

Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln
 1040 1045 1050

Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe
 1055 1060 1065

Gln Asp	Cys Asn Lys Leu Val	Asp Pro Glu Pro Tyr	Leu Asp Val
1070	1075	1080	

Cys Ile	Tyr Asp Thr Cys Ser	Cys Glu Ser Ile Gly	Asp Cys Ala
1085	1090	1095	

Ala Phe	Cys Asp Thr Ile Ala	Ala Tyr Ala His Val	Cys Ala Gln
1100	1105	1110	

His Gly	Lys Val Val Thr Trp	Arg Thr Ala Thr Leu	Cys Pro Gln
1115	1120	1125	

Ser Cys	Glu Glu Arg Asn Leu	Arg Glu Asn Gly Tyr	Glu Ala Glu
1130	1135	1140	

Trp Arg	Tyr Asn Ser Cys Ala	Pro Ala Cys Gln Val	Thr Cys Gln
1145	1150	1155	

His Pro	Glu Pro Leu Ala Cys	Pro Val Gln Cys Val	Glu Gly Cys
1160	1165	1170	

His Ala	His Cys Pro Pro Gly	Lys Ile Leu Asp Glu	Leu Leu Gln
1175	1180	1185	

Thr Cys	Val Asp Pro Glu Asp	Cys Pro Val Cys Glu	Val Ala Gly
1190	1195	1200	

Arg Arg	Phe Ala Ser Gly Lys	Lys Val Thr Leu Asn	Pro Ser Asp
1205	1210	1215	

Pro Glu	His Cys Gln Ile Cys	His Cys Asp Val Val	Asn Leu Thr
1220	1225	1230	

Cys	Glu	Ala	Cys	Gln	Glu	Pro	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
1235						1240					1245			

Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
1250						1255					1260			

Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Leu	Val	Pro	Arg	Gly	Ser
1265						1270					1275			

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr
1280						1285					1290			

Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
1295						1300					1305			

Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
1310						1315					1320			

Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
1325						1330					1335			

Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
1340						1345					1350			

Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
1355						1360					1365			

Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
1370						1375					1380			

Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
1385						1390					1395			

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
1400 1405 1410

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
1415 1420 1425

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
1430 1435 1440

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
1445 1450 1455

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
1460 1465 1470

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
1475 1480 1485

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
1490 1495 1500

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
1505 1510 1515

<210> 119

<211> 1778

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pSYN VWF 034 蛋白質序列

<400> 119

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
20 25 30

Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
35 40 45

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
50 55 60

Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
65 70 75 80

Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu
85 90 95

Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
100 105 110

Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys
115 120 125

Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
130 135 140

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
145 150 155 160

Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln
165 170 175

Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala
180 185 190

Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser
195 200 205

Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln
210 215 220

Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu
225 230 235 240

Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu
245 250 255

Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala
260 265 270

Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His
275 280 285

Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys
290 295 300

Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met
305 310 315 320

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu
325 330 335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His
340 345 350

Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn
355 360 365

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys
370 375 380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp
385 390 395 400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg
405 410 415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys
420 425 430

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu
435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val
450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Ile Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu
465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu
485 490 495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu
500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn
515 520 525

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro
530 535 540

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln
545 550 555 560

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met
565 570 575

Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe
580 585 590

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
595 600 605

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly
610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu
660 665 670

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe
675 680 685

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys
690 695 700

Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp
705 710 715 720

Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met
725 730 735

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val
740 745 750

Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg
755 760 765

Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu
770 775 780

Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met
785 790 795 800

Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg
805 810 815

His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln
820 825 830

Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr
835 840 845

Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp
850 855 860

Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly
865 870 875 880

Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp
885 890 895

Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys
900 905 910

Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu
915 920 925

Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys
930 935 940

Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg
945 950 955 960

Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg
965 970 975

His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val
980 985 990

Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr
995 1000 1005

Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn
1010 1015 1020

Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro
1025 1030 1035

Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln
1040 1045 1050

Thr Met	Val Asp Ser Ser Cys	Arg Ile Leu Thr Ser	Asp Val Phe
1055	1060	1065	

Gln Asp	Cys Asn Lys Leu Val	Asp Pro Glu Pro Tyr	Leu Asp Val
1070	1075	1080	

Cys Ile	Tyr Asp Thr Cys Ser	Cys Glu Ser Ile Gly	Asp Cys Ala
1085	1090	1095	

Ala Phe	Cys Asp Thr Ile Ala	Ala Tyr Ala His Val	Cys Ala Gln
1100	1105	1110	

His Gly	Lys Val Val Thr Trp	Arg Thr Ala Thr Leu	Cys Pro Gln
1115	1120	1125	

Ser Cys	Glu Glu Arg Asn Leu	Arg Glu Asn Gly Tyr	Glu Ala Glu
1130	1135	1140	

Trp Arg	Tyr Asn Ser Cys Ala	Pro Ala Cys Gln Val	Thr Cys Gln
1145	1150	1155	

His Pro	Glu Pro Leu Ala Cys	Pro Val Gln Cys Val	Glu Gly Cys
1160	1165	1170	

His Ala	His Cys Pro Pro Gly	Lys Ile Leu Asp Glu	Leu Leu Gln
1175	1180	1185	

Thr Cys	Val Asp Pro Glu Asp	Cys Pro Val Cys Glu	Val Ala Gly
1190	1195	1200	

Arg Arg	Phe Ala Ser Gly Lys	Lys Val Thr Leu Asn	Pro Ser Asp
1205	1210	1215	

Pro	Glu	His	Cys	Gln	Ile	Cys	His	Cys	Asp	Val	Val	Asn	Leu	Thr
1220						1225					1230			

Cys	Glu	Ala	Cys	Gln	Glu	Pro	Ile	Ser	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala
1235						1240					1245			

Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Glu	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser
1250						1255					1260			

Glu	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro
1265						1270					1275			

Gly	Ser	Glu	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser
1280						1285					1290			

Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro
1295						1300					1305			

Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser
1310						1315					1320			

Thr	Glu	Glu	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro
1325						1330					1335			

Gly	Ser	Glu	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser
1340						1345					1350			

Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser
1355						1360					1365			

Pro	Thr	Ser	Thr	Glu	Glu	Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser
1370						1375					1380			

Thr	Glu	Glu	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro
1385						1390					1395			

Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Ser
1400						1405					1410			

Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala
1415						1420					1425			

Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Ser	Glu	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser
1430						1435					1440			

Glu	Thr	Pro	Gly	Ser	Glu	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Thr	Pro
1445						1450					1455			

Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Ser	Pro	Thr	Ser	Thr	Glu	Glu	Gly	Thr	Ser
1460						1465					1470			

Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro
1475						1480					1485			

Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Gly	Ser	Glu	Pro	Ala	Thr	Ser	Gly	Ser
1490						1495					1500			

Glu	Thr	Pro	Gly	Thr	Ser	Glu	Ser	Ala	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Pro
1505						1510					1515			

Gly	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Glu	Gly	Ser	Ala	Pro	Asp	Ile	Gly
1520						1525					1530			

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Leu	Val	Pro	Arg	Gly
1535						1540					1545			

Ser Gly Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
1550 1555 1560

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
1565 1570 1575

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
1580 1585 1590

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
1595 1600 1605

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
1610 1615 1620

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
1625 1630 1635

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
1640 1645 1650

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
1655 1660 1665

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
1670 1675 1680

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
1685 1690 1695

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
1700 1705 1710

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
1715 1720 1725

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
1730 1735 1740

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
1745 1750 1755

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
1760 1765 1770

Leu Ser Pro Gly Lys
1775

<210> 120
<211> 1565
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> pSYN VWF 036 蛋白質序列

<400> 120

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
20 25 30

Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
35 40 45

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
50 55 60

Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
65 70 75 80

Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu
85 90 95

Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
100 105 110

Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys
115 120 125

Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
130 135 140

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
145 150 155 160

Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln
165 170 175

Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala
180 185 190

Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser
195 200 205

Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln
210 215 220

Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu
225 230 235 240

Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu
245 250 255

Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala
260 265 270

Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His
275 280 285

Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys
290 295 300

Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met
305 310 315 320

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu
325 330 335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His
340 345 350

Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn
355 360 365

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys
370 375 380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp
385 390 395 400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg
405 410 415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys
420 425 430

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu
435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val
450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Ile Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu
465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu
485 490 495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu
500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn
515 520 525

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro
530 535 540

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln
545 550 555 560

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met
565 570 575

Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe
580 585 590

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
595 600 605

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly
610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu
660 665 670

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe
675 680 685

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys
690 695 700

Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp
705 710 715 720

Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met
725 730 735

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val
740 745 750

Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg
755 760 765

Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu
770 775 780

Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met
785 790 795 800

Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg
805 810 815

His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln
820 825 830

Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr
835 840 845

Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp
850 855 860

Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly
865 870 875 880

Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp
885 890 895

Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys
900 905 910

Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu
915 920 925

Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys
930 935 940

Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg
945 950 955 960

Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg
965 970 975

His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val
980 985 990

Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr
995 1000 1005

Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn
1010 1015 1020

Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro
1025 1030 1035

Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln
1040 1045 1050

Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe
1055 1060 1065

Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val
1070 1075 1080

Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala
1085 1090 1095

Ala Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln
1100 1105 1110

His Gly Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln
1115 1120 1125

Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Ala Glu
1130 1135 1140

Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln
1145 1150 1155

His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys
1160 1165 1170

His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln
1175 1180 1185

Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly
1190 1195 1200

Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp
1205 1210 1215

Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr
1220 1225 1230

Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Ile Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1235 1240 1245

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1250 1255 1260

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1265 1270 1275

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1280 1285 1290

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1295 1300 1305

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu
1310 1315 1320

Val Pro Arg Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1325 1330 1335

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
1340 1345 1350

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
1355 1360 1365

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
1370 1375 1380

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
1385 1390 1395

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
1400 1405 1410

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
1415 1420 1425

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
1430 1435 1440

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
1445 1450 1455

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
1460 1465 1470

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
1475 1480 1485

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
1490 1495 1500

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
1505 1510 1515

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
1520 1525 1530

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
1535 1540 1545

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
1550 1555 1560

Gly Lys
1565

- <210> 121
- <211> 247
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>



Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
165 170 175

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
180 185 190

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
195 200 205

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
210 215 220

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
225 230 235 240

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

- <210> 122
- <211> 33
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 多肽

<400> 122

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly
20 25 30

Gly

<210> 123
<211> 1240
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VWF-D1D2D' D3

<400> 123

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
20 25 30

Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
35 40 45

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
50 55 60

Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
65 70 75 80

Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu
85 90 95

Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
100 105 110

Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys
115 120 125

Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
130 135 140

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
145 150 155 160

Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln
165 170 175

Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala
180 185 190

Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser
195 200 205

Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln
210 215 220

Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu
225 230 235 240

Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu
245 250 255

Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala
260 265 270

Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His
275 280 285

Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys
290 295 300

Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met
305 310 315 320

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu
325 330 335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His
340 345 350

Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn
355 360 365

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys
370 375 380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp
385 390 395 400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg
405 410 415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys
420 425 430

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu
435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val
450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Ile Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu
465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu
485 490 495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu
500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn
515 520 525

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro
530 535 540

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln
545 550 555 560

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met
565 570 575

Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe
580 585 590

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
595 600 605

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly
610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu
660 665 670

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe
675 680 685

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys
690 695 700

Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp
705 710 715 720

Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met
725 730 735

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val
740 745 750

Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg
755 760 765

Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu
770 775 780

Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met
785 790 795 800

Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg
805 810 815

His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln
820 825 830

Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr
835 840 845

Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp
850 855 860

Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly
865 870 875 880

Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp
885 890 895

Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys
900 905 910

Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu
915 920 925

Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys
930 935 940

Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg
945 950 955 960

Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg
965 970 975

His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val
980 985 990

Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr
995 1000 1005

Ser	Ser	Asn	Leu	Gln	Val	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	Asp	Phe	Gly	Asn
1010						1015					1020			

Ser	Trp	Lys	Val	Ser	Ser	Gln	Cys	Ala	Asp	Thr	Arg	Lys	Val	Pro
1025						1030					1035			

Leu	Asp	Ser	Ser	Pro	Ala	Thr	Cys	His	Asn	Asn	Ile	Met	Lys	Gln
1040						1045					1050			

Thr	Met	Val	Asp	Ser	Ser	Cys	Arg	Ile	Leu	Thr	Ser	Asp	Val	Phe
1055						1060					1065			

Gln	Asp	Cys	Asn	Lys	Leu	Val	Asp	Pro	Glu	Pro	Tyr	Leu	Asp	Val
1070						1075					1080			

Cys	Ile	Tyr	Asp	Thr	Cys	Ser	Cys	Glu	Ser	Ile	Gly	Asp	Cys	Ala
1085						1090					1095			

Cys	Phe	Cys	Asp	Thr	Ile	Ala	Ala	Tyr	Ala	His	Val	Cys	Ala	Gln
1100						1105					1110			

His	Gly	Lys	Val	Val	Thr	Trp	Arg	Thr	Ala	Thr	Leu	Cys	Pro	Gln
1115						1120					1125			

Ser	Cys	Glu	Glu	Arg	Asn	Leu	Arg	Glu	Asn	Gly	Tyr	Glu	Cys	Glu
1130						1135					1140			

Trp	Arg	Tyr	Asn	Ser	Cys	Ala	Pro	Ala	Cys	Gln	Val	Thr	Cys	Gln
1145						1150					1155			

His	Pro	Glu	Pro	Leu	Ala	Cys	Pro	Val	Gln	Cys	Val	Glu	Gly	Cys
1160						1165					1170			

His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln
1175 1180 1185

Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly
1190 1195 1200

Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp
1205 1210 1215

Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr
1220 1225 1230

Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro
1235 1240

<210> 124
<211> 477
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VWF-D' D3

<400> 124

Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp
1 5 10 15

Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr
20 25 30

Asp Leu Glu Cys Met Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro
35 40 45

Pro Gly Met Val Arg His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys
50 55 60

Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys
65 70 75 80

Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr
85 90 95

Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr
100 105 110

Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr
115 120 125

Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile
130 135 140

Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys
145 150 155 160

Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly
165 170 175

Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val
180 185 190

Val Glu Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser
195 200 205

Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr
210 215 220

Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln
225 230 235 240

Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val
245 250 255

Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg
260 265 270

Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met
275 280 285

Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val
290 295 300

Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val
305 310 315 320

Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Cys
325 330 335

Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly
340 345 350

Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu
355 360 365

Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn
370 375 380

Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu
385 390 395 400

Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro
405 410 415

Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp
420 425 430

Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys
435 440 445

Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys
450 455 460

Asp Val Val Asn Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro
465 470 475

- <210> 125
- <211> 5055
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> pSYNFVIII 010

<400> 125
atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc 60
accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc 120
ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttctt cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac 180
acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc 240
gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat 300
gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccata ctgtcagtct tcattgtgtt 360
ggtgtatcct actggaaagc ttctgaggga gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg 420
gagaaagaag atgataaagt ctccctgggt ggaagccata catatgtctg gcaggtcctg 480
aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540

gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa	600
gggagtcttg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttctgta	660
tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat	720
gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggtct	780
ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc	840
accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca ctttcttgt gaggaacct	900
cgccaggcgt ccttggaat ctgcccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg	960
gacctggac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacaatga tggcatggaa	1020
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaacccaac tacgaatgaa aaataatgaa	1080
gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat	1140
gatgacaact ctcttccctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact	1200
tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc	1260
cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg	1320
aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct	1380
attcagcatg aatcaggaat ctggggacct ttactttatg gggaagttgg agacacactg	1440
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact	1500
gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta caaaagggtg taaaacattt gaaggatttt	1560
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca	1620
actaaatcag atcctcggtg cctgaccgcg tattactcta gtttcgttaa tatggagaga	1680
gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc thtagatcaa	1740
agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag	1800
aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tcccaatcc agctggagtg	1860

cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtt	1920
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggtgg catactggta cattctaagc	1980
attggagcac agactgactt cttttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa	2040
atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg	2100
atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc	2160
atgaccgcct tactgaaggt ttctagtgtg gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac	2220
agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc	2280
ttctctcaaa acccaccagt cttgaaacgc catcaacggg aaataactcg tactactctt	2340
cagtcagatc aagaggaaat tgactatgat gataccatat cagttgaaat gaagaaggaa	2400
gattttgaca tttatgatga ggatgaaaat cagagccccc gcagctttca aaagaaaaca	2460
cgacactatt ttattgctgc agtggagagg ctctgggatt atgggatgag tagctcccca	2520
catgttctaa gaaacagggc tcagagtggc agtgtccctc agttcaagaa agttgttttc	2580
caggaattta ctgatggctc ctttactcag cccttatacc gtggagaact aaatgaacat	2640
ttgggactcc tggggccata tataagagca gaagtgaag ataatatcat ggtaactttc	2700
agaaatcagg cctctcgtcc ctattccttc tattctagcc ttattttcta tgaggaagat	2760
cagaggcaag gagcagaacc tagaaaaaac ttgtcaagc ctaatgaaac caaaacttac	2820
ttttgaaag tgcaacatca tatggcaccc actaaagatg agtttgactg caaagcctgg	2880
gcttatttct ctgatgttga cctggaaaaa gatgtgcact caggcctgat tggaccctt	2940
ctggtctgcc acactaacac actgaaccct gctcatggga gacaagtac agtacaggaa	3000
tttgctctgt ttttcacat ctttgatgag accaaaagct ggtacttcac tgaaaatatg	3060
gaaagaaact gcagggtcc ctgcaatata cagatggaag atcccacttt taaagagaat	3120
tatcgcttcc atgcaatcaa tggctacata atggatacac tacctggctt agtaatggct	3180

caggatcaaa ggattcgaatg gtatcigctc agcatgggca gcaatgaaaa catccattct	3240
attcattttca gtggacatgt gttcactgta cgaaaaaaag aggagtataa aatggcactg	3300
tacaatctct atccagggtgt ttttgagaca gtggaaatgt taccatccaa agctggaatt	3360
tggcgggtgg aatgccttat tggcgagcat ctacatgctg ggatgagcac actttttctg	3420
gtgtacagca ataagtgtca gactcccctg ggaatggctt ctggacacat tagagatttt	3480
cagattacag cttcaggaca atatggacag tgggccccaa agctggccag acttcattat	3540
tccggatcaa tcaatgcctg gagcaccaag gagccctttt ctggatcaa ggtggatctg	3600
ttggcaccaa tgattattca cggcataaag acccagggtg cccgtcagaa gttctccagc	3660
ctctacatct ctcagtttat catcatgtat agtcttgatg ggaagaagtg gcagacttat	3720
cgaggaaatt ccactggaac cttaatggtc ttctttggca atgtggattc atctgggata	3780
aaacacaata tttttaaccc tccaattatt gtcgataca tccgtttgca cccaactcat	3840
tatagcattc gcagcactct tcgcatggag ttgatgggct gtgatttaaa tagttgcagc	3900
atgccattgg gaatggagag taaagcaata tcagatgcac agattactgc ttcatcctac	3960
ttaccaata tgtttgccac ctggctctct tcaaaagctc gacttcacct ccaagggagg	4020
agtaatgcct ggagacctca ggtgaataat ccaaaagagt ggctgcaagt ggacttcag	4080
aagacaatga aagtcacagg agtaactact cagggagtaa aatctctgct taccagcatg	4140
tatgtgaagg agttcctcat ctccagcagt caagatggcc atcagtggac tctctttttt	4200
cagaatggca aagtaaaggt ttttcaggga aatcaagact ccttcacacc tgtggtgaac	4260
tctctagacc caccgttact gactcgctac cttcgaattc acccccagag ttgggtgcac	4320
cagattgccc tgaggatgga ggttctgggc tgcgaggcac aggacctcta cgacaaaact	4380
cacacatgcc caccgtgcc agctccagaa ctcttgggcg gaccgtcagt ctctctcttc	4440
cccccaaac ccaaggacac cctcatgac tcccggaccc ctgaggtcac atgcgtggtg	4500

gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 4560
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 4620
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 4680
tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 4740
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 4800
agcctgacct gcctgggtcaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 4860
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgttggactc cgacggctcc 4920
ttcttcctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 4980
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 5040
tctccgggta aatga 5055

- <210> 126
- <211> 1684
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> pSYNFVIII 010

- <400> 126

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
 20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
 35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
85 90 95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
100 105 110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
115 120 125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
130 135 140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
145 150 155 160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
180 185 190

Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
195 200 205

Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
210 215 220

Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
225 230 235 240

Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
245 250 255

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
260 265 270

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
275 280 285

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
290 295 300

Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
305 310 315 320

Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
325 330 335

Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
340 345 350

Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
355 360 365

Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
370 375 380

Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
385 390 395 400

Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
405 410 415

Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
420 425 430

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
435 440 445

Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
450 455 460

Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
465 470 475 480

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
485 490 495

His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
500 505 510

Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
515 520 525

Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
530 535 540

Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
545 550 555 560

Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
565 570 575

Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
580 585 590

Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
595 600 605

Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
610 615 620

Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
625 630 635 640

Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
645 650 655

Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
660 665 670

Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
675 680 685

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
690 695 700

Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
705 710 715 720

Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
725 730 735

Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
740 745 750

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu
755 760 765

Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln
770 775 780

Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu
785 790 795 800

Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe
805 810 815

Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp
820 825 830

Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln
835 840 845

Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr
850 855 860

Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His
865 870 875 880

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile
885 890 895

Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser
900 905 910

Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg
915 920 925

Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val
 930 935 940

Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp
 945 950 955 960

Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu
 965 970 975

Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His
 980 985 990

Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe
 995 1000 1005

Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn
 1010 1015 1020

Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys
 1025 1030 1035

Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr
 1040 1045 1050

Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr
 1055 1060 1065

Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe
 1070 1075 1080

Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met
 1085 1090 1095

Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Pro	Gly	Val	Phe	Glu	Thr	Val	Glu	Met
1100						1105					1110			

Leu	Pro	Ser	Lys	Ala	Gly	Ile	Trp	Arg	Val	Glu	Cys	Leu	Ile	Gly
1115						1120					1125			

Glu	His	Leu	His	Ala	Gly	Met	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	Val	Tyr	Ser
1130						1135					1140			

Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Met	Ala	Ser	Gly	His	Ile	Arg
1145						1150					1155			

Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Gln	Trp	Ala	Pro
1160						1165					1170			

Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His	Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	Trp	Ser
1175						1180					1185			

Thr	Lys	Glu	Pro	Phe	Ser	Trp	Ile	Lys	Val	Asp	Leu	Leu	Ala	Pro
1190						1195					1200			

Met	Ile	Ile	His	Gly	Ile	Lys	Thr	Gln	Gly	Ala	Arg	Gln	Lys	Phe
1205						1210					1215			

Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp
1220						1225					1230			

Gly	Lys	Lys	Trp	Gln	Thr	Tyr	Arg	Gly	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr	Leu
1235						1240					1245			

Met	Val	Phe	Phe	Gly	Asn	Val	Asp	Ser	Ser	Gly	Ile	Lys	His	Asn
1250						1255					1260			

Ile Phe	Asn Pro Pro	Ile Ile	Ala Arg Tyr	Ile Arg	Leu His Pro
1265		1270		1275	

Thr His	Tyr Ser Ile Arg	Ser Thr Leu Arg	Met Glu	Leu Met Gly
1280		1285		1290

Cys Asp	Leu Asn Ser Cys	Ser Met Pro Leu	Gly Met	Glu Ser Lys
1295		1300		1305

Ala Ile	Ser Asp Ala Gln	Ile Thr Ala Ser	Ser Tyr	Phe Thr Asn
1310		1315		1320

Met Phe	Ala Thr Trp Ser	Pro Ser Lys Ala	Arg Leu	His Leu Gln
1325		1330		1335

Gly Arg	Ser Asn Ala Trp	Arg Pro Gln Val	Asn Asn	Pro Lys Glu
1340		1345		1350

Trp Leu	Gln Val Asp Phe	Gln Lys Thr Met	Lys Val	Thr Gly Val
1355		1360		1365

Thr Thr	Gln Gly Val Lys	Ser Leu Leu Thr	Ser Met	Tyr Val Lys
1370		1375		1380

Glu Phe	Leu Ile Ser Ser	Ser Gln Asp Gly	His Gln	Trp Thr Leu
1385		1390		1395

Phe Phe	Gln Asn Gly Lys	Val Lys Val Phe	Gln Gly	Asn Gln Asp
1400		1405		1410

Ser Phe	Thr Pro Val Val	Asn Ser Leu Asp	Pro Pro	Leu Leu Thr
1415		1420		1425

Arg Tyr	Leu Arg Ile His Pro	Gln Ser Trp Val His	Gln Ile Ala
1430	1435	1440	

Leu Arg	Met Glu Val Leu Gly	Cys Glu Ala Gln Asp	Leu Tyr Asp
1445	1450	1455	

Lys Thr	His Thr Cys Pro Pro	Cys Pro Ala Pro Glu	Leu Leu Gly
1460	1465	1470	

Gly Pro	Ser Val Phe Leu Phe	Pro Pro Lys Pro Lys	Asp Thr Leu
1475	1480	1485	

Met Ile	Ser Arg Thr Pro Glu	Val Thr Cys Val Val	Val Asp Val
1490	1495	1500	

Ser His	Glu Asp Pro Glu Val	Lys Phe Asn Trp Tyr	Val Asp Gly
1505	1510	1515	

Val Glu	Val His Asn Ala Lys	Thr Lys Pro Arg Glu	Glu Gln Tyr
1520	1525	1530	

Asn Ser	Thr Tyr Arg Val Val	Ser Val Leu Thr Val	Leu His Gln
1535	1540	1545	

Asp Trp	Leu Asn Gly Lys Glu	Tyr Lys Cys Lys Val	Ser Asn Lys
1550	1555	1560	

Ala Leu	Pro Ala Pro Ile Glu	Lys Thr Ile Ser Lys	Ala Lys Gly
1565	1570	1575	

Gln Pro	Arg Glu Pro Gln Val	Tyr Thr Leu Pro Pro	Ser Arg Asp
1580	1585	1590	

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
1595 1600 1605

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
1610 1615 1620

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
1625 1630 1635

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
1640 1645 1650

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
1655 1660 1665

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1670 1675 1680

Lys

- <210> 127
- <211> 78
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> AE72 XTEN

<400> 127

Gly Ala Pro Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser
1 5 10 15

Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala
20 25 30

Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu
35 40 45

Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr
50 55 60

Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ala Ser Ser
65 70 75

<210> 128
<211> 144
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AE144_2A

<400> 128

Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly
1 5 10 15

Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly
20 25 30

Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly
35 40 45

Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu
50 55 60

Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu
65 70 75 80

Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly
85 90 95

Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu
100 105 110

Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu
115 120 125

Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly
130 135 140

- <210> 129
- <211> 144
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> AE144_3B

<400> 129

Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser
1 5 10 15

Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser
20 25 30

Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly
35 40 45

Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu
50 55 60

Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly
65 70 75 80

Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly
85 90 95

Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu
100 105 110

Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser
115 120 125

Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly
130 135 140

- <210> 130
- <211> 144
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> AE144_4A

<400> 130

Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala
1 5 10 15

Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu
20 25 30

Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly
35 40 45

Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu
50 55 60



Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Glu Pro Ala
50 55 60

Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser
65 70 75 80

Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly
85 90 95

Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Glu Pro Ala
100 105 110

Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu
115 120 125

Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly
130 135 140

- <210> 133
- <211> 144
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> AG144_A

<400> 133

Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Pro
1 5 10 15

Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr
20 25 30

Gly Thr Gly Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro
35 40 45

Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Pro
50 55 60

Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
65 70 75 80

Thr Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro
85 90 95

Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly
100 105 110

Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
115 120 125

Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro
130 135 140

- <210> 134
- <211> 144
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> AG144_B

<400> 134

Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ser Ser Thr
1 5 10 15

Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
20 25 30

Thr Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro
35 40 45

Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Pro
50 55 60

Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr
65 70 75 80

Gly Thr Gly Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro
85 90 95

Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro
100 105 110

Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
115 120 125

Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro
130 135 140

<210> 135
<211> 144
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AG144_C

<400> 135

Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ala Ser Pro
1 5 10 15

Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
20 25 30

Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro
35 40 45

Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Thr Pro Gly
50 55 60

Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
65 70 75 80

Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro
85 90 95

Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr
100 105 110

Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala
115 120 125

Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro
130 135 140

<210> 136
<211> 144
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AG144_F

<400> 136

Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ser Ser Pro
1 5 10 15

Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
20 25 30

Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro
35 40 45

Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Pro
50 55 60

Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
65 70 75 80

Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro
85 90 95

Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ser Ser Thr
100 105 110

Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala
115 120 125

Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro
130 135 140

<210> 137
<211> 288
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AE288_2

<400> 137

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu
1 5 10 15

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly
20 25 30

Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
35 40 45

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
50 55 60

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
65 70 75 80

Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
85 90 95

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
100 105 110

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
115 120 125

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
130 135 140

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
145 150 155 160

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
165 170 175

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
180 185 190

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr
195 200 205

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
210 215 220

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
225 230 235 240

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala
245 250 255

Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
260 265 270

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
275 280 285

- <210> 138
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 連接子

<400> 138

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 139

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<220>

<221> REPEAT

<222> (1).. (5)

<223> 可重複 1 至 10 次

<400> 139

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

<210> 140

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 連接子

<220>

<221> REPEAT

<222> (2).. (6)

<223> 可重複 1 至 10 次

<400> 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1

5

I667258

發明摘要

※申請案號：102124926

※申請日：102 年 07 月 11 日

※IPC 分類：

【發明名稱】(中文/英文)

因子 VIII 與 XTEN 及范威爾邦德(VON WILLEBRAND)因子蛋白質之複合物及其用途

Factor VIII complex with XTEN and von Willebrand factor protein, and uses thereof

【中文】

本發明提供一種嵌合蛋白，其包含含有 VWF 之 D'域及 D3 域之 VWF 蛋白質、一或多個 XTEN 序列、及 FVIII 蛋白質，其中該 VWF 片段、該 XTEN 序列或該 FVIII 蛋白質係彼此連接或締合。該嵌合蛋白可進一步包含一或多個 Ig 恆定區或其部分(例如 Fc 區)。包含本發明之 VWF 片段之多肽鏈與包含連接於 XTEN 序列之 FVIII 蛋白質之多肽鏈結合或締合，且包含該 VWF 片段之該多肽鏈可阻止或抑制內源性 VWF 結合連接於該 XTEN 序列之該 FVIII 蛋白質。藉由阻止或抑制內源性 VWF 結合 FVIII 蛋白質，VWF 片段可誘導包含 FVIII 蛋白質之嵌合蛋白之半衰期延長，其中該結合為 FVIII 之半衰期限制因素。本發明亦包括核苷酸、載體、宿主細胞、使用 VWF 片段或嵌合蛋白之方法。

【 英文 】

The present invention provides a chimeric protein comprising a VWF protein comprising the D' domain and D3 domain of VWF, one or more XTEN sequence, and a FVIII protein, wherein the VWF fragment, the XTEN sequence, or the FVIII protein are linked to or associated with each other. The chimeric protein can further comprise one or more Ig constant region or a portion thereof (*e.g.*, an Fc region). A polypeptide chain comprising a VWF fragment of the invention binds to or is associated with a polypeptide chain comprising a FVIII protein linked to an XTEN sequence and the polypeptide chain comprising the VWF fragment can prevent or inhibit binding of endogenous VWF to the FVIII protein linked to the XTEN sequence. By preventing or inhibiting binding of endogenous VWF to the FVIII protein, which is a half-life limiting factor for FVIII, the VWF fragment can induce extension of half-life of the chimeric protein comprising a FVIII protein. The invention also includes nucleotides, vectors, host cells, methods of using the VWF fragment, or the chimeric proteins.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第(2)圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

申請專利範圍

1. 一種嵌合蛋白，其包含(i)包含 VWF 之 D'域及 D3 域之范威爾邦德因子(von Willebrand Factor, VWF)片段，(ii)延長長度多肽(XTEN)，(iii)因子 VIII(FVIII)蛋白質，(iv)第一 Ig 恆定區或其部分，及(v)第二 Ig 恆定區或其部分，

其中該 VWF 片段及該 XTEN 藉由視情況選用之連接子來連接，其中該 XTEN 或該 VWF 片段係與該第一 Ig 恆定區或其部分連接，

其中該 FVIII 蛋白質係與該第二 Ig 恆定區或其部分連接，

且其中該第一 Ig 恆定區或其部分係藉由共價鍵與該第二 Ig 恆定區或其部分連接或締合。

2. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合蛋白，其包含

(a) 含有該 VWF 片段、該 XTEN、該第一 Ig 恆定區或其部分、該第二 Ig 恆定區或其部分及該 FVIII 蛋白質之單一多肽鏈；或

(b) 第一多肽鏈及第二多肽鏈，其中該第一多肽鏈包含 VWF 片段、該 XTEN、及該第一 Ig 恆定區或其部分，且該第二多肽鏈包含該 FVIII 蛋白質及該第二 Ig 恆定區或其部分。

3. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合蛋白，其包含含選自由下列所組成之群組之式：

(a) V-L2-X-L1-F1: FVIII-L3-F2；

- (b) V-L2-X-L1-F1:F2-L3-FVIII ;
- (c) F1-L1-X-L2-V:FVIII-L3-F2 ;
- (d) F1-L1-X-L2-V:F2-L3-FVIII ;
- (e) V-L2-X-L1-F1-L4-FVIII-L3-F2 ;
- (f) F2-L3-FVIII-L4-F1-L1-X-L2-V ;
- (g) FVIII-L3-F2-L4-V-L2-X-L1-F1 ; 及
- (h) F1-L1-X-L2-V-L4-F2-L3-FVIII ,

其中 V 包含該 VWF 片段 ;

L1、L2 及 L3 各自包含視情況選用之連接子 ;

L4 為視情況選用之連接子 ;

FVIII 包含該 FVIII 蛋白質 ;

X 包含該 XTEN ;

F1 包含該第一 Ig 恆定區或其部分 ;

F2 包含該第二 Ig 恆定區或其部分 ;

(-)為肽鍵或一或多個胺基酸 ; 且

(:)為共價鍵。

4. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合蛋白，其中該第一 Ig 恆定區或其部分包含第一 Fc 區。

5. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合蛋白，其中該第一 Ig 恆定區或其部分藉由連接子連接於該 XTEN。

6. 如申請專利範圍第 5 項之嵌合蛋白，其中該第一 Ig 恆定區或其部分與該 XTEN 之間的該連接子包含可裂解連接子。

7. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合蛋白，其中該第二

第 102124926 號

民國 107 年 12 月 21 日修正

Ig 恆定區或其部分包含第二 Fc 區。

8. 如申請專利範圍第 7 項之嵌合蛋白，其中該第二 Fc 區藉由連接子進一步連接於該第一 Fc 區。

9. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合蛋白，其中該共價鍵為二硫鍵。

10. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合蛋白，其中相較於無該 VWF 片段之 FVIII 蛋白質或野生型 FVIII，該 FVIII 蛋白質之半衰期得到延長。

11. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合蛋白，其進一步包含第二 XTEN，該第二 XTEN 緊靠該 FVIII 蛋白質中一或多個插入位點之下游插入。

12. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合蛋白，其包含含選自由下列所組成之群組之式：

- (1) FVIII(X1)-L1-F1:V-L2-X2-L3-F2；
- (2) FVIII(X1)-L1-F1:F2-L3-X2-L2-V；
- (3) F1-L1-FVIII(X1): V-L2-X2-L3-F2；
- (4) F1-L1-FVIII(X1)F2-L3-X2-L2-V；
- (5) FVIII(X1)-L1-F1-L4-V-L2-X2-L3-F2；
- (6) FVIII(X1)-L1-F1-L4-F2-L3-X2-L2-V；
- (7) F1-L1-FVIII(X1)-L4-V-L2-X2-L3-F2，或
- (8) F1-L1-FVIII(X1)-L4-F2-L3-X2-L2-V，

其中 FVIII(X1)包含該 FVIII 蛋白質及第二 XTEN，其中該第二 XTEN 連接於該 FVIII 蛋白質之 N 末端或 C 末端或緊靠該 FVIII 蛋白質中之一或多個胺基酸(「一或多個插

第 102124926 號

民國 107 年 12 月 21 日修正

入位點」)之下游插入；

L1、L2 或 L3 各自包含視情況選用之連接子；

L4 為連接子；

X2 包含該 XTEN；

F1 包含該第一 Ig 恆定區或其部分；

F2 包含該第二 Ig 恆定區或其部分，且

V 包含該 VWF 片段；

(-)為肽鍵或一或多個胺基酸；且

(:)包含共價鍵。

13. 如申請專利範圍第 12 項之嵌合蛋白，其中該第二 XTEN 係插入於該 FVIII 蛋白質中之一或多個插入位點內，該一或多個插入位點選自由表 7、表 8、表 9 及表 10 中之胺基酸殘基組成之群。

14. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合蛋白，其中該 VWF 片段不結合 VWF 清除受體或能夠保護該 FVIII 蛋白質免遭一或多種蛋白酶裂解、保護該 FVIII 蛋白質免遭活化、穩定化該 FVIII 蛋白質之重鏈及/或輕鏈、或阻止該 FVIII 蛋白質由一或多種清除受體清除。

15. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合蛋白，其中該第一 Ig 恆定區或其部分及該第二 Ig 恆定區或其部分相同或不同。

16. 一種嵌合蛋白，其包含第一多肽鏈及第二多肽鏈，其中該第一多肽鏈包含包括 VWF 之 D'域及 D3 域之 VWF 片段、XTEN 及第一 Ig 恆定區或其部分且該第二多

第 102124926 號

民國 107 年 12 月 21 日修正

肽鏈包含 FVIII 蛋白質及第二 Ig 恆定區或其部分，且其中該第一 Ig 恆定區或其部分經由共價鍵與該第二 Ig 恆定區或其部分連接或締合。

17. 一種嵌合蛋白，其包含第一多肽鏈及第二多肽鏈，其中該第一多肽鏈包含包括 VWF 之 D'域及 D3 域之 VWF 片段、第一 XTEN 及第一 Ig 恆定區或其部分，且該第二多肽鏈包含 FVIII 蛋白質、第二 XTEN 及第二 Ig 恆定區或其部分，其中該第一 Ig 恆定區或其部分經由共價鍵與該第二 Ig 恆定區或其部分連接或締合，且其中該第二 XTEN 連接於該 FVIII 蛋白質之 C 末端或 N 末端或緊靠該 FVIII 蛋白質中之一或多個插入位點之下游插入。

18. 一種嵌合蛋白，其包含第一多肽鏈、第二多肽鏈及第三多肽鏈，其中該第一多肽鏈包含包括 VWF 之 D'域及 D3 域之 VWF 片段、XTEN 及第一 Ig 恆定區或其部分，該第二多肽鏈包含該 FVIII 蛋白質之輕鏈及第二 Ig 恆定區或其部分，且該第三多肽鏈包含 FVIII 蛋白質之重鏈，其中該第一 Ig 恆定區或其部分經由共價鍵與該第二 Ig 恆定區或其部分連接或締合，且其中該 FVIII 蛋白質之輕鏈與該 FVIII 蛋白質之重鏈連接或締合。

19. 一種嵌合蛋白，其包含第一多肽鏈、第二多肽鏈及第三多肽鏈，其中該第一多肽鏈包含包括 VWF 之 D'域及 D3 域之 VWF 片段、第一 XTEN 及第一 Ig 恆定區或其部分，該第二多肽鏈包含該 FVIII 蛋白質之輕鏈及第二 Ig 恆定區或其部分，且該第三多肽鏈包含 FVIII 蛋白質之重

第 102124926 號

民國 107 年 12 月 21 日修正

鏈及第二 XTEN，其中該第一 Ig 恆定區或其部分經由共價鍵與該第二 Ig 恆定區或其部分連接或締合，其中該第二 XTEN 序列連接於該 FVIII 蛋白質之該重鏈之 C 末端或 N 末端或緊靠該 FVIII 蛋白質中之一或多個插入位點之下游插入，且其中該 FVIII 蛋白質之輕鏈與該 FVIII 蛋白質之重鏈連接或締合。

20. 如申請專利範圍第 16 項之嵌合蛋白，其中該 FVIII 蛋白質連接於至少兩個 XTEN、至少三個 XTEN、至少四個 XTEN、至少五個 XTEN 或至少六個 XTEN。

21. 如申請專利範圍第 16 項之嵌合蛋白，其中該第二 XTEN 插入於該 FVIII 蛋白質中之一或多個插入位點內，該一或多個插入位點選自由表 7、表 8、表 9 及表 10 中之胺基酸殘基組成之群。

22. 如申請專利範圍第 17 項之嵌合蛋白，其中該第二 XTEN 插入於該 FVIII 蛋白質中之一或多個插入位點內，該一或多個插入位點選自由表 7、表 8、表 9 及表 10 中之胺基酸殘基組成之群。

23. 如申請專利範圍第 18 項之嵌合蛋白，其中該第二 XTEN 插入於該 FVIII 蛋白質中之一或多個插入位點內，該一或多個插入位點選自由表 7、表 8、表 9 及表 10 中之胺基酸殘基組成之群。

24. 如申請專利範圍第 19 項之嵌合蛋白，其中該第二 XTEN 插入於該 FVIII 蛋白質中之一或多個插入位點內，該一或多個插入位點選自由表 7、表 8、表 9 及表 10

第 102124926 號

民國 107 年 12 月 21 日修正

中之胺基酸殘基組成之群。

25. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合蛋白，其中該 FVIII 蛋白質包含 B 域或其部分或不包含 B 域。

26. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合蛋白，其中該 FVIII 蛋白質為 SQ B 域缺失之 FVIII。

27. 如申請專利範圍第 11 項之嵌合蛋白，其中該 FVIII 多肽鏈包含 B 域或其部分，且其中該第二 XTEN 係插入該 B 域或其部分內。

28. 如申請專利範圍第 17 項之嵌合蛋白，其中該 FVIII 多肽鏈包含 B 域或其部分，且其中該第二 XTEN 係插入該 B 域或其部分內。

29. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合蛋白，其中該 FVIII 蛋白質包含單鏈 FVIII 或雙鏈 FVIII。

30. 如申請專利範圍第 29 項之嵌合蛋白，其中該單鏈 FVIII 在對應於全長成熟 FVIII 多肽(SEQ ID NO: 4)之殘基 1645、殘基 1648 或兩者或 SQ BDDFVIII(SEQ ID NO: 6)之殘基 751、殘基 754 或兩者之殘基處含有至少一個胺基酸取代。

31. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合蛋白，其中該 VWF 片段為單體。

32. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合蛋白，其包含至少兩個 VWF 片段、至少三個 VWF 片段、至少四個 VWF 片段、至少五個 VWF 片段或至少六個 VWF 片段。

33. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合蛋白，其中該

第 102124926 號

民國 107 年 12 月 21 日修正

VWF 片段包含與 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 1240 至少 90%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%一致之胺基酸序列。

34. 如申請專利範圍第 33 項之嵌合蛋白，其中該 VWF 片段基本上由 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 1240 組成或由 SEQ ID NO: 2 之胺基酸 764 至 1240 組成。

35. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合蛋白，其中該 VWF 片段含有取代對應於 SEQ ID NO: 2 之殘基 1099、殘基 1142 或殘基 1099 與 1142 兩者之殘基的除半胱胺酸以外之胺基酸。

36. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合蛋白，其中該 VWF 片段基本上由以下組成或由以下組成：(1)VWF 之 D' 及 D3 域；(2)VWF 之 D1、D'及 D3 域；(3)VWF 之 D2、D' 及 D3 域；(4)VWF 之 D1、D2、D'及 D3 域；或(5)VWF 之 D1、D2、D'、D3 及 A1 域。

37. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合蛋白，其中該等 XTEN 中之一或多者包含選自表 2A 的至少一個基元。

38. 如申請專利範圍第 1 項之嵌合蛋白，其中該等 XTEN 中之一或多者係選自由 AE42、AE72、AE144、AG144、AE288、AG288、AE576、AG576、AE864、AG864 及其任何組合組成之群。

39. 如申請專利範圍第 38 項之嵌合蛋白，其中該 XTEN 包含選自由下列組成之群之胺基酸序列：SEQ ID NO: 36；SEQ ID NO: 37；SEQ ID NO: 38；SEQ ID NO:

第 102124926 號

民國 107 年 12 月 21 日修正

39 ; SEQ ID NO: 40 ; SEQ ID NO: 41 ; SEQ ID NO: 42 ;
SEQ ID NO: 43 ; SEQ ID NO: 44 ; SEQ ID NO: 127 ; SEQ
ID NO: 128 ; SEQ ID NO: 129 ; SEQ ID NO: 130 ; SEQ ID
NO: 131 ; SEQ ID NO: 132 ; SEQ ID NO: 133 ; SEQ ID NO:
134 ; SEQ ID NO: 135 ; SEQ ID NO: 136 ; SEQ ID NO:
137 及其任何組合。

40. 如申請專利範圍第 39 項之嵌合蛋白，其中該
XTEN 序列為 AE144 或 AE288。

41. 一種聚核苷酸或一組聚核苷酸，其編碼如申請專
利範圍第 1 項至第 40 項中任一項之嵌合蛋白。

42. 一種載體，其包含如申請專利範圍第 41 項之聚
核苷酸或該組聚核苷酸及一或多個可操作地連接於該聚核
苷酸或該組聚核苷酸之啟動子。

43. 一種宿主細胞，其包含如申請專利範圍第 41 項
之聚核苷酸或該組聚核苷酸或如申請專利範圍第 42 項之
載體。

44. 一種醫藥組合物，其包含如申請專利範圍第 1 項
至第 40 項中任一項之嵌合蛋白及醫藥學上可接受之載
劑。

45. 一種醫藥組合物，其包含如申請專利範圍第 41
項之聚核苷酸或該組聚核苷酸、如申請專利範圍第 42 項
之載體、或如申請專利範圍第 43 項之宿主細胞及醫藥學
上可接受之載劑。

46. 一種如申請專利範圍第 1 項至第 40 項中任一項

之嵌合蛋白、如申請專利範圍第 41 項之聚核苷酸或該組聚核苷酸、如申請專利範圍第 42 項之載體、如申請專利範圍第 43 項之宿主細胞、或如申請專利範圍第 44 項或第 45 項之組合物用於製造供防止或抑制 FVIII 蛋白質與內源性 VWF 之結合、延長或增加 FVIII 蛋白質之半衰期或防止或抑制 FVIII 蛋白質自有需要之個體中之細胞清除的藥劑之用途。

47. 一種如申請專利範圍第 1 項至第 40 項中任一項之嵌合蛋白、如申請專利範圍第 41 項之聚核苷酸或該組聚核苷酸、如申請專利範圍第 42 項之載體、如申請專利範圍第 43 項之宿主細胞、或如申請專利範圍第 44 項或第 45 項之組合物用於製造供治療有需要之個體中的血友病的藥劑之用途。

48. 一種製備嵌合蛋白之方法，其包含在適合培養基下培養如申請專利範圍第 43 項之宿主細胞及在該宿主細胞中表現該嵌合蛋白。

49. 如申請專利範圍第 48 項之方法，其進一步包含分離該嵌合蛋白。