

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第3部門第2区分

【発行日】平成27年9月3日(2015.9.3)

【公表番号】特表2015-512876(P2015-512876A)

【公表日】平成27年4月30日(2015.4.30)

【年通号数】公開・登録公報2015-029

【出願番号】特願2014-557620(P2014-557620)

【国際特許分類】

C 0 7 K	14/755	(2006.01)
C 0 7 K	19/00	(2006.01)
C 1 2 N	15/09	(2006.01)
C 1 2 P	21/02	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
A 6 1 K	38/00	(2006.01)
A 6 1 P	7/02	(2006.01)

【F I】

C 0 7 K	14/755	Z N A
C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	15/00	A
C 1 2 P	21/02	C
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/00	1 0 1
A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P	7/02	

【手続補正書】

【提出日】平成27年7月10日(2015.7.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも1つの伸長組換えポリペプチド(X T E N)に融合された第V I I I 因子ポリペプチドを含有する組換え第V I I I 因子融合タンパク質であって、ここで、前記第V I I I 因子ポリペプチドは、A 1 ドメイン、A 2 ドメイン、A 3 ドメイン、a 3 ドメイン、C 1 ドメイン、C 2 ドメインおよび、任意選択的に、B ドメインまたはその一部を含有する、組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項2】

前記少なくとも1つのX T E Nは、前記A 1 ドメイン、前記A 2 ドメイン、前記A 3 ドメイン、前記a 3 ドメイン、前記B ドメインもしくはその一部、前記C 1 ドメイン、または前記C 2 ドメインから選択される、少なくとも1つのドメイン内に挿入されており、または、前記少なくとも1つのX T E Nは、前記第V I I I 因子ポリペプチドのC末端に融

合されている、請求項 1 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項 3】

前記少なくとも 1 つの X T E N は、前記 B ドメインまたはその一部に挿入されている、または、前記第 V I I I 因子ポリペプチドの C 末端に融合されている、または、その両方である、請求項 1 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項 4】

前記少なくとも 1 つの X T E N は、前記 A 1 ドメイン、前記 A 2 ドメイン、前記 A 3 ドメイン、前記 a 3 ドメイン、またはそれらの任意の組合せに挿入されている、請求項 1 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項 5】

前記 A 1 ドメインは、許容ループ 1 (A 1 - 1) 領域および許容ループ 2 (A 1 - 2) 領域を含有し、ここで、前記少なくとも 1 つの X T E N は、 A 1 - 1 、 A 1 - 2 、またはその両方に挿入されている、請求項 2 または 4 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項 6】

前記 A 2 ドメインは、許容ループ 1 (A 2 - 1) 領域および許容ループ 2 (A 2 - 2) 領域を含有し、ここで、前記少なくとも 1 つの X T E N は、 A 2 - 1 、 A 2 - 2 、またはその両方に挿入されている、請求項 2 または 4 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項 7】

前記 A 3 ドメインは、許容ループ 1 (A 3 - 1) 領域および許容ループ 2 (A 3 - 2) 領域を含有し、ここで、前記少なくとも 1 つの X T E N は、 A 3 - 1 、 A 3 - 2 、またはその両方に挿入されている、請求項 2 または 4 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項 8】

前記許容ループ 1 (A 1 - 1) 領域は、配列番号 2 のアミノ酸約 15 ~ アミノ酸約 45 、またはアミノ酸約 18 ~ アミノ酸約 32 の、天然成熟型ヒト F V I I I の領域に相当し、および、ここで、前記少なくとも 1 つの X T E N は、 A 1 - 1 に挿入されている、請求項 5 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項 9】

前記許容ループ 2 (A 1 - 2) 領域は、配列番号 2 のアミノ酸約 201 ~ アミノ酸約 232 、またはアミノ酸約 211 ~ アミノ酸約 224 の天然成熟型ヒト F V I I I の領域に相当し、および、ここで、前記少なくとも 1 つの X T E N は、 A 1 - 2 に挿入されている、請求項 5 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項 10】

前記許容ループ 1 (A 2 - 1) 領域は、配列番号 2 のアミノ酸約 395 ~ アミノ酸約 421 、またはアミノ酸約 397 ~ アミノ酸約 418 の天然成熟型ヒト F V I I I の領域に相当し、および、ここで、前記少なくとも 1 つの X T E N は、 A 2 - 1 に挿入されている、請求項 6 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項 11】

前記許容ループ 2 (A 2 - 2) 領域は、配列番号 2 のアミノ酸約 577 ~ アミノ酸約 635 、またはアミノ酸約 595 ~ アミノ酸約 607 の天然成熟型ヒト F V I I I の領域に相当し、および、ここで、前記少なくとも 1 つの X T E N は、 A 2 - 2 に挿入されている、請求項 6 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項 12】

前記許容ループ 1 (A 3 - 1) 領域は、配列番号 2 のアミノ酸約 1705 ~ アミノ酸約 1732 、またはアミノ酸約 1711 ~ アミノ酸約 1725 の天然成熟型ヒト F V I I I の領域に相当し、および、ここで、前記少なくとも 1 つの X T E N は、 A 3 - 1 に挿入されている、請求項 7 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項 13】

前記許容ループ2(A3 - 2)領域は、配列番号2のアミノ酸約1884～アミノ酸約1917、またはアミノ酸約1900～アミノ酸約1912の天然成熟型ヒトFVIIIの領域に相当し、および、ここで、前記少なくとも1つのXTENは、A3 - 2に挿入されている、請求項7に記載の組換え第VIII因子融合タンパク質。

【請求項14】

前記少なくとも1つのXTENは、配列番号2のアミノ酸17、配列番号2のアミノ酸18、配列番号2のアミノ酸22、配列番号2のアミノ酸24、配列番号2のアミノ酸26、配列番号2のアミノ酸28、配列番号2のアミノ酸32、配列番号2のアミノ酸38、配列番号2のアミノ酸40、および、配列番号2のアミノ酸41、から選択される成熟型天然ヒト第VIII因子中のアミノ酸に相当するアミノ酸のすぐ下流でA1 - 1に挿入される、請求項5または8に記載の組換え第VIII因子融合タンパク質。

【請求項15】

前記少なくとも1つのXTENは、配列番号2のアミノ酸205、配列番号2のアミノ酸210、配列番号2のアミノ酸211、配列番号2のアミノ酸216、配列番号2のアミノ酸220、配列番号2のアミノ酸222、配列番号2のアミノ酸223、配列番号2のアミノ酸224、および、配列番号2のアミノ酸230、から選択される成熟型天然ヒト第VIII因子中のアミノ酸に相当するアミノ酸のすぐ下流でA1 - 2に挿入される、請求項5または9に記載の組換え第VIII因子融合タンパク質。

【請求項16】

前記少なくとも1つのXTENは、配列番号2のアミノ酸399、配列番号2のアミノ酸403、配列番号2のアミノ酸405、配列番号2のアミノ酸409、および、配列番号2のアミノ酸416、から選択される成熟型天然ヒト第VIII因子中のアミノ酸に相当するアミノ酸のすぐ下流でA2 - 1に挿入される、請求項6または10に記載の組換え第VIII因子融合タンパク質。

【請求項17】

前記少なくとも1つのXTENは、配列番号2のアミノ酸598、配列番号2のアミノ酸599、配列番号2のアミノ酸603、および、配列番号2のアミノ酸616、から選択される成熟型天然ヒト第VIII因子中のアミノ酸に相当するアミノ酸のすぐ下流でA2 - 2に挿入される、請求項6または11に記載の組換え第VIII因子融合タンパク質。

【請求項18】

前記少なくとも1つのXTENは、配列番号2のアミノ酸1711、配列番号2のアミノ酸1713、配列番号2のアミノ酸1720、配列番号2のアミノ酸1724、配列番号2のアミノ酸1725、および、配列番号2のアミノ酸1726、から選択される成熟型天然ヒト第VIII因子中のアミノ酸に相当するアミノ酸のすぐ下流でA3 - 1に挿入される、請求項7または12に記載の組換え第VIII因子融合タンパク質。

【請求項19】

前記少なくとも1つのXTENは、配列番号2のアミノ酸1896、配列番号2のアミノ酸1900、配列番号2のアミノ酸1904、配列番号2のアミノ酸1905、および、配列番号2のアミノ酸1910、から選択される成熟型天然ヒト第VIII因子中のアミノ酸に相当するアミノ酸のすぐ下流でA3 - 2に挿入される、請求項7または13に記載の組換え第VIII因子融合タンパク質。

【請求項20】

前記少なくとも1つのXTENは、配列番号2のアミノ酸1656の成熟型天然ヒト第VIII因子中のアミノ酸に相当するアミノ酸のすぐ下流でa3に挿入される、請求項1または2に記載の組換え第VIII因子融合タンパク質。

【請求項21】

前記少なくとも1つのXTENは、前記Bドメインに挿入される、請求項1または2に記載の組換え第VIII因子融合タンパク質。

【請求項22】

前記少なくとも1つのX T E Nは、配列番号2のアミノ酸740または745の成熟型天然ヒト第V I I I 因子中のアミノ酸に相当するアミノ酸のすぐ下流に挿入される、請求項21に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項23】

前記少なくとも1つのX T E Nは、前記C1またはC2ドメインに挿入される、請求項1または2に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項24】

前記少なくとも1つのX T E Nは、配列番号2の2020、配列番号2のアミノ酸2044、配列番号2のアミノ酸2068、配列番号2のアミノ酸2073、配列番号2のアミノ酸2090、配列番号2のアミノ酸2092、配列番号2のアミノ酸2093、配列番号2のアミノ酸2111、配列番号2のアミノ酸2115、配列番号2のアミノ酸2120、配列番号2のアミノ酸2125、配列番号2のアミノ酸2171、配列番号2のアミノ酸2173、配列番号2のアミノ酸2188、配列番号2のアミノ酸2223、配列番号2のアミノ酸2224、配列番号2のアミノ酸2227、配列番号2のアミノ酸2268、配列番号2のアミノ酸2277、配列番号2のアミノ酸2278、および、配列番号2のアミノ酸2290、からなる群から選択される、成熟型天然ヒト第V I I I 因子中のアミノ酸に相当するアミノ酸のすぐ下流に挿入される、請求項1～23のいずれか1項に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項25】

前記少なくとも1つのX T E Nは、配列番号2のアミノ酸18、配列番号2のアミノ酸22、配列番号2のアミノ酸26、配列番号2のアミノ酸28、配列番号2のアミノ酸32、配列番号2のアミノ酸40、配列番号2のアミノ酸211、配列番号2のアミノ酸216、配列番号2のアミノ酸220、配列番号2のアミノ酸224、配列番号2のアミノ酸333、配列番号2のアミノ酸336、配列番号2のアミノ酸339、配列番号2のアミノ酸399、配列番号2のアミノ酸403、配列番号2のアミノ酸409、および、配列番号2のアミノ酸416、配列番号2のアミノ酸599、配列番号2のアミノ酸603、配列番号2のアミノ酸1711、配列番号2のアミノ酸1720、配列番号2のアミノ酸1796、配列番号2のアミノ酸1802、配列番号2のアミノ酸1900、配列番号2のアミノ酸1904、配列番号2のアミノ酸1905、および、配列番号2のアミノ酸1910、配列番号2のアミノ酸1656、配列番号2のアミノ酸2068、配列番号2のアミノ酸2171、配列番号2のアミノ酸2227、および、配列番号2のアミノ酸2277、からなる群から選択される、成熟型天然ヒト第V I I I 因子中のアミノ酸に相当するアミノ酸のすぐ下流に挿入される、請求項1に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項26】

少なくとも2つのX T E Nを含有する、請求項1～25のいずれか1項に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項27】

前記少なくとも2つのX T E Nは、配列番号2のアミノ酸18、配列番号2のアミノ酸26、配列番号2のアミノ酸40、配列番号2のアミノ酸399、配列番号2のアミノ酸403、配列番号2のアミノ酸599、配列番号2のアミノ酸745、配列番号2のアミノ酸1656、配列番号2のアミノ酸1711、配列番号2のアミノ酸1720、配列番号2のアミノ酸1725、配列番号2のアミノ酸1900および、配列番号2のアミノ酸1905、配列番号2のアミノ酸2332からなる群から選択される、成熟型天然ヒト第V I I I 因子中のアミノ酸に相当する1または2のアミノ酸のすぐ下流に挿入または融合される、請求項26に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項28】

前記少なくとも2つのX T E Nは、以下からなる群から選択される、成熟型天然ヒト第V I I I 因子中のアミノ酸に相当するアミノ酸のすぐ下流に挿入または融合される、請求項27に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質：

(i)	配列番号 2 のアミノ酸 7 4 5 、および、 2 3 3 2
(i i)	配列番号 2 のアミノ酸 1 6 5 6 、および、 2 3 3 2
(i i i)	配列番号 2 のアミノ酸 2 6 、および、 4 0 3
(i v)	配列番号 2 のアミノ酸 4 0 、および、 4 0 3
(v)	配列番号 2 のアミノ酸 1 8 、および、 4 0 3
(v i)	配列番号 2 のアミノ酸 2 6 、および、 5 9 9
(v i i)	配列番号 2 のアミノ酸 4 0 、および、 5 9 9
(v i i i)	配列番号 2 のアミノ酸 1 8 、および、 5 9 9
(i x)	配列番号 2 のアミノ酸 1 8 、および、 1 6 5 6
(x)	配列番号 2 のアミノ酸 2 6 、および、 1 6 5 6
(x i)	配列番号 2 のアミノ酸 4 0 、および、 1 6 5 6
(x i i)	配列番号 2 のアミノ酸 4 0 3 、および、 1 6 5 6
(x i i i)	配列番号 2 のアミノ酸 1 6 5 6 、および、 1 7 2 0
(x i v)	配列番号 2 のアミノ酸 4 0 、および、 3 9 9
(x v)	配列番号 2 のアミノ酸 2 6 、および、 1 9 0 0
(x v i)	配列番号 2 のアミノ酸 1 8 、および、 3 9 9
(x v i i)	配列番号 2 のアミノ酸 4 0 、および、 3 9 9 、ならびに、
(x v i i i)	配列番号 2 のアミノ酸 1 6 5 6 、および、 1 9 0 0 。

【請求項 2 9】

少なくとも 3 つの X T E N 、少なくとも 4 つの X T E N 、少なくとも 5 つの X T E N 、または、少なくとも 6 つの X T E N 、を含有する、請求項 1 または 2 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項 3 0】

i . 前記少なくとも 3 つの X T E N が、配列番号 2 のアミノ酸 1 8 、配列番号 2 のアミノ酸 2 6 、配列番号 2 のアミノ酸 4 0 、配列番号 2 のアミノ酸 3 9 9 、配列番号 2 のアミノ酸 4 0 3 、配列番号 2 のアミノ酸 5 9 9 、配列番号 2 のアミノ酸 7 4 5 、配列番号 2 のアミノ酸 1 6 5 6 、配列番号 2 のアミノ酸 1 7 1 1 、配列番号 2 のアミノ酸 1 7 2 0 、配列番号 2 のアミノ酸 1 7 2 5 、配列番号 2 のアミノ酸 1 9 0 0 、配列番号 2 のアミノ酸 1 9 0 5 、配列番号 2 のアミノ酸 1 9 1 0 、および、配列番号 2 のアミノ酸 2 3 3 2 、から選択される、成熟型天然ヒト第 V I I I 因子中のアミノ酸に相当する 1 以上のアミノ酸のすぐ下流に挿入または融合されるか、

i i . 前記少なくとも 4 つの X T E N が、配列番号 2 のアミノ酸 1 8 、配列番号 2 のアミノ酸 2 6 、配列番号 2 のアミノ酸 4 0 、配列番号 2 のアミノ酸 4 0 3 、配列番号 2 のアミノ酸 4 0 9 、配列番号 2 のアミノ酸 7 4 5 、配列番号 2 のアミノ酸 1 6 5 6 、配列番号 2 のアミノ酸 1 7 2 0 、配列番号 2 のアミノ酸 1 9 0 0 、配列番号 2 のアミノ酸 1 9 0 5 、配列番号 2 のアミノ酸 1 9 1 0 、および、配列番号 2 のアミノ酸 2 3 3 2 、から選択される、成熟型天然ヒト第 V I I I 因子中のアミノ酸に相当する 1 以上のアミノ酸のすぐ下流に挿入または融合されるか、または、

i i i . 前記少なくとも 5 つの X T E N が、配列番号 2 のアミノ酸 1 8 、配列番号 2 のアミノ酸 4 0 3 、配列番号 2 のアミノ酸 7 4 5 、配列番号 2 のアミノ酸 1 6 5 6 、配列番号 2 のアミノ酸 1 7 2 0 、配列番号 2 のアミノ酸 1 9 0 0 、および、配列番号 2 のアミノ酸 2 3 3 2 、から選択される、成熟型天然ヒト第 V I I I 因子中のアミノ酸に相当する 1 以上のアミノ酸のすぐ下流に挿入または融合される、

請求項 2 9 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項 3 1】

前記少なくとも 1 つの X T E N が、少なくとも 3 6 アミノ酸、少なくとも 4 2 アミノ酸、少なくとも 7 2 アミノ酸、少なくとも 9 6 アミノ酸、少なくとも 1 4 4 または、少なくとも 2 8 8 アミノ酸を含有する、請求項 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項 3 2】

前記少なくとも1つのX T E Nが、少なくとも72アミノ酸、少なくとも144または、少なくとも288アミノ酸を含有する、請求項31に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項33】

前記少なくとも1つのX T E Nが、1以上のX T E N配列モチーフを含有し、ここで、前記1以上のX T E N配列モチーフは、配列番号19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、および48からなる群から選択される、請求項1～32のいずれか1項に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項34】

前記1以上のX T E N配列モチーフは、配列番号23、24、25および26からなる群から選択される、請求項33に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項35】

前記少なくとも1つのX T E Nは、配列番号49、50、51、52、57、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、78、および、79からなる群から選択されるアミノ酸配列に対し少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含有する、請求項1～34のいずれか1項に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項36】

前記少なくとも1つのX T E Nは、配列番号279、281、283、285、287、289、291、293、295、297、299、301、303、305、307、309、311、313、315、317、319、321、323、325、327、329、331、333、335、337、339、341、343、345、347、349、および、351からなる群から選択されるアミノ酸配列に対し少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含有する、請求項1～34のいずれか1項に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項37】

前記第V I I I 因子ポリペプチドは、天然型第V I I I 因子ポリペプチドを含有する、請求項1～36のいずれか1項に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項38】

前記第V I I I 因子ポリペプチドは、部分的に欠失したBドメイン、または、完全に欠失したBドメインを含有する、請求項1～37のいずれか1項に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項39】

前記第V I I I 因子ポリペプチドは、一本鎖第V I I I 因子ポリペプチドを含有し、ここで、配列番号2に対応するアミノ酸1648は、グリシンまたはアラニンである、請求項1～38のいずれか1項に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項40】

少なくとも1つの異種ポリペプチドが、前記A1ドメイン、前記A2ドメイン、前記A3ドメイン、前記Bドメイン、前記a3ドメイン、前記C1ドメイン、または前記C2ドメインに挿入され、または、前記第V I I I 因子ポリペプチドのC末端に融合されている、請求項1～39のいずれか1項に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項41】

前記少なくとも1つの異種ポリペプチドは、イムノグロブリンのFc断片である、請求項40に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項42】

前記少なくとも1つの異種ポリペプチドは、アルブミンまたはその断片、ヒト絨毛性ゴナドトロピンのC末端ペプチドのサブユニット、H A P配列、トランスフェリン、P A Sポリペプチド、ポリグリシンリンカー、および、ポリセリンリンカーからなる群から選択される、請求項40に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

【請求項 4 3】

請求項 1 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質をコードする核酸。

【請求項 4 4】

配列番号	5 9 6、	5 9 8、	6 0 0、	6 0 2、	6 0 4、	6 0 6、	6 0 8、	6 1 0、	6 1 2	
	6 1 4、	6 1 6、	6 1 8、	6 2 0、	6 2 2、	6 2 4、	6 2 6、	6 2 8、	6 3 0、	6 3 2
	6 3 4、	6 3 6、	6 3 8、	6 4 0、	6 4 2、	6 4 4、	6 4 6、	6 4 8、	6 5 0、	6 5 2
	6 5 4、	6 5 6、	6 5 8、	6 6 0、	6 6 2、	6 6 4、	6 6 6、	6 6 8、	6 7 0、	6 7 2
	6 7 4、	6 7 6、	6 7 8、	6 8 0、	6 8 2、	6 8 4、	6 8 6、	6 8 8、	6 9 0、	6 9 2
	6 9 4、	6 9 6、	6 9 8、	7 0 0、	7 0 2、	7 0 4、	7 0 6、	7 0 8、	7 1 0、	7 1 2
	7 1 4、	7 1 6、	7 1 8、	7 2 0、	7 2 2、	7 2 4、	7 2 6、	7 2 8、	7 3 0、	7 3 2
	7 3 4、	7 3 6、	7 3 8、	7 4 0、	7 4 2、	7 4 4、	7 4 6、	7 4 8、	7 5 0、	7 5 2
	7 5 4、	7 5 6、	7 5 8、	7 6 0、	7 6 2、	7 6 4、	7 6 6、	7 6 8、	7 7 0、	7 7 2
	7 7 4、	7 7 6、	7 7 8、	7 8 0、	7 8 2、	7 8 4、	7 8 6、	7 8 8、	7 9 0、	7 9 2
	7 9 4、	7 9 6、	7 9 8、	8 0 0、	8 0 2、	8 0 4、	8 0 6、	8 0 8、	8 1 0、	8 1 2
	8 1 4、	8 1 6、	8 1 8、	8 2 0、	8 2 2、	8 2 4、	8 2 6、	8 2 8、	8 3 0、	8 3 2
	8 3 4、	8 3 6、	8 3 8、	8 4 0、	8 4 2、	8 4 4、	8 4 6、	8 4 8、	8 5 0、	8 5 2
	8 5 4、	8 5 6、	8 5 8、	8 6 0、	8 6 2、	8 6 4、	8 6 6、	8 6 8、	8 7 0、	8 7 2
	8 7 4、	8 7 6、	8 7 8、	8 8 0、	8 8 2、	8 8 4、	8 8 6、	8 8 8、	8 9 0、	8 9 2
	8 9 4、	8 9 6、	8 9 8、	9 0 0、	9 0 2、	9 0 4、	9 0 6、	9 0 8、	9 1 0、	9 1 2
	9 1 4、	9 1 6、	9 1 8、	9 2 0、	9 2 2、	9 2 4、	9 2 6、	9 2 8、	9 3 0、	9 3 2
	9 3 4、	9 3 6、	9 3 8、	9 4 0、	9 4 2、	9 4 4、	9 4 6、	9 4 8、	9 5 0、	9 5 2
	9 5 4、	9 5 6、	9 5 8、	9 6 0、	9 6 2、	9 6 4、	9 6 6、	9 6 8、	9 7 0、	9 7 2
	9 7 4、	9 7 6、	9 7 8、	9 8 0、	9 8 2、	9 8 4、	9 8 6、	9 8 8、	9 9 0、	9 9 2
	9 9 4、	9 9 6、	9 9 8、	1 0 0 0、	1 0 0 2、	1 0 0 4、	1 0 0 6、	1 0 0 8、	1 0	
1 0、	1 0 1 2、	1 0 1 4、	1 0 1 6、	1 0 1 8、	1 0 2 0、	1 0 2 2、	1 0 2 4、	1 0		
2 6、	1 0 2 8、	1 0 3 0、	1 0 3 2、	1 0 3 4、	1 0 3 6、	1 0 3 8、	1 0 4 0、	1 0		
4 2、	1 0 4 4、	1 0 4 6、	1 0 4 8、	1 0 5 0、	1 0 5 2、	1 0 5 4、	1 0 5 6、	1 0		
5 8、	1 0 6 0、	1 0 6 2、	1 0 6 4、	1 0 6 6、	1 0 6 8、	1 0 7 0、	1 0 7 2、	1 0		
7 4、	1 0 7 6、	1 0 7 8、	1 0 8 0、	1 0 8 2、	1 0 8 4、	1 0 8 6、	1 0 8 8、	1 0		
9 0、	1 0 9 2、	1 0 9 4、	1 0 9 6、	1 0 9 8、	1 1 0 0、	1 1 0 2、	1 1 0 4、	1 1		
0 6、	1 1 0 8、	1 1 1 0、	1 1 1 2、	1 1 1 4、	1 1 1 6、	1 1 1 8、	1 1 2 0、	1 1		
2 2、	1 1 2 4、	1 1 2 6、	1 1 2 8、	1 1 3 0、	1 1 3 2、	1 1 3 4、	1 1 3 6、	1 1		
3 8、	1 1 4 0、	1 1 4 2、	1 1 4 4、	1 1 4 6、	1 1 4 8、	1 1 5 0、	1 1 5 2、	1 1		
5 4、	1 1 5 6、	1 1 5 8、	1 1 6 0、	1 1 6 2、	1 1 6 4、	1 1 6 6、	1 1 6 8、	1 1		
7 0、	1 1 7 2、	1 1 7 4、	1 1 7 6、	1 1 7 8、	1 1 8 0、	1 1 8 2、	1 1 8 4、	1 1		
8 6、	1 1 8 8、	1 1 9 0、	1 1 9 2、	1 1 9 4、	1 1 9 6、	1 1 9 8、	1 2 0 0、	1 2		
0 2、	1 2 0 4、	1 2 0 6、	1 2 0 8、	1 2 1 0、	1 2 1 2、	1 2 1 4、	1 2 1 6、	1 2		
1 8、	1 2 2 0、	1 2 2 2、	1 2 2 4、	1 2 2 6、	1 2 2 8、	1 2 3 0、	1 2 3 2、	1 2		
3 4、	1 2 3 6、	1 2 3 8、	1 2 4 0、	1 2 4 2、	1 2 4 4、	1 2 4 6、	1 2 4 8、	1 2		
5 0、	1 2 5 2、	1 2 5 4、	1 2 5 6、	1 2 5 8、	1 2 6 0、	1 2 6 2、	1 2 6 4、	1 2		
6 6、	1 2 6 8、	1 2 7 0、	1 2 7 2、	1 2 7 4、	1 2 7 6、	1 2 7 8、	1 2 8 0、	1 2		
8 2、	1 2 8 4、	1 2 8 6、	1 2 8 8、	1 2 9 0、	1 2 9 2、	1 2 9 4、	1 2 9 6、	1 2		
9 8、	1 3 0 0、	1 3 0 2、	1 3 0 4、	1 3 0 6、	1 3 0 8、	1 3 1 0、	1 3 1 2、	1 3		
1 4、	1 3 1 6、	1 3 1 8、	1 3 2 0、	1 3 2 2、	1 3 2 4、	1 3 2 6、	1 3 2 8、	1 3		
3 0、	1 3 3 2、	1 3 3 4、	1 3 3 6、	1 3 3 8、	1 3 4 0、	1 3 4 2、	1 3 4 4、	1 3		
4 6、	1 3 4 8、	1 3 5 0、	1 3 5 2、	1 3 5 4、	1 3 5 6、	1 3 5 8、	1 3 6 0、	1 3		
6 2、	1 3 6 4、	1 3 6 6、	1 3 6 8、	1 3 7 0、	1 3 7 2、	1 3 7 4、	1 3 7 6、	1 3		
7 8、	1 3 8 0、	1 3 8 2、	1 3 8 4、	1 3 8 6、	1 3 8 8、	1 3 9 0、	1 3 9 2、	1 3		
9 4、	1 3 9 6、	1 3 9 8、	1 4 0 0、	1 4 0 2、	1 4 0 4、	1 4 0 6、	1 4 0 8、	1 4		

1 0、1 4 1 2、1 4 1 4、1 4 1 6、1 4 1 8、1 4 2 0、1 4 2 2、1 4 2 4、1 4
2 6、1 4 2 8、1 4 3 0、1 4 3 2、1 4 3 4、1 4 3 6、1 4 3 8、1 4 4 0、1 4
4 2、1 4 4 4、1 4 4 6、1 4 4 8、1 4 5 0、1 4 5 2、1 4 5 4、1 4 5 6、1 4
5 8、1 4 6 0、1 4 6 2、1 4 6 4、1 4 6 6、1 4 6 8、1 4 7 0、1 4 7 2、1 4
7 4、1 4 7 6、1 4 7 8、1 4 8 0、1 4 8 2、1 4 8 4、1 4 8 6、および、1 4 8
8 からなる群から選択される核酸配列に対し、少なくとも約 9 0 %、少なくとも約 9 5 %
、少なくとも約 9 6 %、少なくとも約 9 7 %、少なくとも約 9 8 %、少なくとも約 9 9 %
または 1 0 0 % 同一の核酸配列を含有する、請求項 4 3 に記載の核酸。

【請求項 4 5】

請求項 4 3 または 4 4 に記載の核酸を含有するベクターまたはベクターセット。

【請求項 4 6】

プラスミド、コスミド、ウイルス粒子、またはファージである、請求項 4 5 に記載のベ
クターまたはベクターセット。

【請求項 4 7】

アデノウイルスベクター、またはバキュロウイルスベクター、または、自律複製ベクタ
ーである、請求項 4 5 または 4 6 に記載のベクターまたはベクターセット。

【請求項 4 8】

前記核酸は、プロモーター、リーダー配列、ターミネーター、またはエンハンサーに操
作可能に連結されている、請求項 4 5 ~ 4 7 のいずれか 1 項に記載のベクターまたはベク
ターセット。

【請求項 4 9】

請求項 4 5 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載のベクターまたはベクターセットを含有する宿
主細胞。

【請求項 5 0】

前記融合タンパク質は、in vivo で発現されることができ、および、凝固促進活性を有する、請求項 4 9 に記載の宿主細胞。

【請求項 5 1】

請求項 1 ~ 4 2 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質および、
薬学的に受容可能な担体を含有する医薬組成物。

【請求項 5 2】

請求項 4 3 もしくは 4 4 に記載の核酸、請求項 4 5 ~ 4 8 のいずれか 1 項に記載のベク
ターもしくはベクターセット、または、請求項 4 9 もしくは 5 0 に記載の宿主細胞、およ
び、薬学的に受容可能な担体、を含有する医薬組成物。

【請求項 5 3】

適切な条件下で、請求項 4 9 または 5 0 に記載の宿主細胞を培地内で培養することを含
有する、組換え第 V I I I 因子融合タンパク質を作製する方法。

【請求項 5 4】

前記培地から前記組換え第 V I I I 因子融合タンパク質を単離することをさらに含む、
請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

凝固障害を治療するための、請求項 5 1 または 5 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 6】

出血症状を治療するための、請求項 5 1 または 5 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 5 7】

血友病 A を治療するための、請求項 5 1 または 5 2 に記載の医薬組成物。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0046

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0046】

組換え第VIII因子融合タンパク質は、本明細書に開示される特性の1以上または任意の組み合わせを示しうることが明確に企図される。

一つの実施形態において、本発明は例えば以下の項目を提供する。

(項目1)

第VIII因子ポリペプチドおよび、少なくとも第一の伸長組換えポリペプチド(XTEN)を含有する組み換え第VIII融合タンパク質であって、ここで、前記第VIII因子ポリペプチドは、a1酸性スペーサー領域を含有するA1ドメイン、a2酸性スペーサー領域を含有するA2ドメイン、a3酸性スペーサー領域を含有するA3ドメイン、C1ドメイン、C2ドメイン、および、任意選択的にBドメインの一部またはすべてを含有し、ならびに、前記第一XTENは、(i)前記第VIII因子ポリペプチドのC末端で；(ii)もしBドメインの一部またはすべてが存在する場合には、前記第VIII因子ポリペプチドのBドメインの内で；(iii)前記第VIII因子ポリペプチドのA1ドメインの内で；(iv)前記第VIII因子ポリペプチドのA2ドメインの内で；(v)前記第VIII因子ポリペプチドのA3ドメインの内で；(vi)前記第VIII因子ポリペプチドのC1ドメインの内で；(vii)前記第VIII因子ポリペプチドのC2ドメインの内で；(viii)前記第VIII因子ポリペプチドのN末端で、(ix)前記第VIII因子ポリペプチドの2つのドメインの間で、前記第VIII因子ポリペプチドに連結されており；ならびに、ここで、XTENに連結されていない対応する第VIII因子と比較した場合、前記融合タンパク質は、(a)in vitroの凝固アッセイにおいて、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%または、500%の凝固促進活性を維持しているか、または、(b)in vitroの結合アッセイにおいて、抗第VIII因子抗体に対する減少した結合を示す、組み換え第VIII融合タンパク質。

(項目2)

第VIII因子ポリペプチドおよび少なくとも第一の伸長組換えポリペプチド(XTEN)を含有する、項目1に記載の組み換え第VIII因子融合タンパク質であって、ここで、前記第VIII因子ポリペプチドは、a1酸性スペーサー領域を含有するA1ドメイン、a2酸性スペーサー領域を含有するA2ドメイン、a3酸性スペーサー領域を含有するA3ドメイン、C1ドメイン、C2ドメイン、および、任意選択的にBドメインの一部またはすべてを含有し、ならびに、ここで、前記第一のXTENは、(i)前記第VIII因子ポリペプチドのC末端で；(ii)もしBドメインの一部またはすべてが存在する場合には、前記第VIII因子ポリペプチドのBドメインの内で；(iii)前記第VIII因子ポリペプチドのA1ドメインの内で；(iv)前記第VIII因子ポリペプチドのA2ドメインの内で；(v)前記第VIII因子ポリペプチドのA3ドメインの内で；(vi)前記第VIII因子ポリペプチドのC1ドメインの内で；(vii)前記第VIII因子ポリペプチドのC2ドメインの内で；または、(viii)前記第VIII因子ポリペプチドの2つのドメインの間で、前記第VIII因子ポリペプチドに連結されており；ならびに、XTENに連結されていない対応する第VIII因子と比較した場合、前記融合タンパク質は、(a)in vitroの凝固アッセイにおいて、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%または、500%の凝固促進活性を維持しており、および、(b)in vitroの結合アッセイにおいて、抗第VIII因子抗体に対する減少した結合を示す、組み換え第VIII因子融合タンパク質。

(項目3)

前記第一のXTENが、表5、表6、表7、表8または表9から選択される挿入部位で、前記第VIIIポリペプチドに連結されている、項目1または2に記載の組み換え第V

I I I 因子融合タンパク質。(項目4)

第V I I I 因子ポリペプチドおよび少なくとも第一の伸長組換えポリペプチド(X T E N)を含有する組換え第V I I I 因子融合タンパク質であって、ここで、前記第V I I I 因子ポリペプチドは、a 1 酸性スペーサー領域を含有するA 1 ドメイン、a 2 酸性スペーサー領域を含有するA 2 ドメイン、a 3 酸性スペーサー領域を含有するA 3 ドメイン、C 1 ドメイン、C 2 ドメイン、および、任意選択的にB ドメインの一部またはすべてを含有し、ならびに、ここで、前記第一のX T E Nは、表6および表7から選択される挿入部位で、前記第V I I I 因子ポリペプチドに連結されており、ならびに、ここで、前記融合タンパク質は、in vitro 凝固アッセイにより計測した場合、X T E Nに連結されていない対応する第V I I I 因子タンパク質と比較して、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%または、500%の凝固促進活性を維持している、組み換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目5)

前記第V I I I ポリペプチド因子は、表1の配列、図3に図示される配列、および図4に図示される配列からなる群から選択される配列に対し、最適整列した場合に、少なくとも約80%の配列同一性、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%、または約100%の配列同一性を有している、項目1～4のいずれか1項に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目6)

前記第V I I I 因子位ポリペプチドのC末端で前記第V I I I 因子ポリペプチドに連結されている、または前記第V I I I 因子ポリペプチドのB ドメイン内で前記第V I I I 因子ポリペプチドに連結されている、または任意選択的に前記第V I I I 因子ポリペプチドのB ドメインを置換する、少なくとも第二のX T E Nを含有する、項目1～5のいずれか1項に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目7)

前記第V I I I 因子ポリペプチドのB ドメイン内で前記第V I I I 因子ポリペプチドに連結されている、または任意選択的に前記第V I I I 因子ポリペプチドのB ドメインを置換する、少なくとも第二のX T E Nを含有する、項目1～5のいずれか1項に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目8)

前記第V I I I 因子ポリペプチドがヒト第V I I I 因子のB ドメイン欠失変異体を含有し、ここで、前記B ドメイン欠失は、図3に記述される全長ヒト第V I I I 因子配列に準拠して、アミノ酸残基番号約741～約750での第一の位置から始まり、アミノ酸残基番号約1635～約1648での第二の位置で終わる、項目1～7のいずれか1項に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目9)

前記第一のX T E N配列が、前記第V I I I 因子ポリペプチドのC末端で前記第V I I I 因子ポリペプチドに連結されており、そして、第二のX T E Nが、前記第V I I I 因子ポリペプチドのB ドメイン内で前記第V I I I 因子ポリペプチドに連結されており、ここで、前記第二のX T E Nは、図3に記述される全長ヒト第V I I I 因子配列に準拠して、アミノ酸残基番号約741～約750のC末端に連結されており、そして、アミノ酸残基番号約1635～約1648のN末端に連結されており、ここで、すべてのX T E Nの累積的な長さは、少なくとも約84アミノ酸残基である、項目6～8のいずれか1項に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目10)

前記融合タンパク質は、最適整列した場合に、表21の配列からなる群から選択される

同等の長さの配列と比較して、少なくとも約 80%、または少なくとも約 90%、または少なくとも約 91%、または少なくとも約 92%、または少なくとも約 93%、または少なくとも約 94%、または少なくとも約 95%、または少なくとも約 96%、または少なくとも約 97%、または少なくとも約 98%、または少なくとも約 99%～少なくとも約 100% の配列同一性を有している、項目 1～9 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I 因子融合タンパク質。

(項目 11)

少なくとも第二の X T E N、任意選択的に第三の X T E N、任意選択的に第四の X T E N、任意選択的に第五の X T E N、および任意選択的に第六の X T E N を含有し、ここで、第二、第三、第四、第五、または第六の X T E N のそれぞれは、前記第 V I I I 因子ポリペプチドに、以下からなる群から選択される第二、第三、第四、第五、または第六の部位で連結されている、項目 1～10 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質：

(a) 表 5、表 6、表 7、表 8 および表 9 由来の挿入部位；

(b) 図 3 に記述される全長ヒト第 V I I I 因子配列に準拠して、アミノ酸残基番号 32、220、224、336、339、390、399、416、603、1656、1711、1725、1905 または 1910 の 6 アミノ酸以内の挿入部位；

(c) 前記第 V I I I 因子ポリペプチドの任意の 2 つの隣接するドメインの間の挿入部位であって、ここで、前記 2 つの隣接するドメインは、A 1 および A 2 ドメイン、A 2 および B ドメイン、B および A 3 ドメイン、A 3 および C 1 ドメイン、ならびに、C 1 および C 2 ドメインからなる群から選択される、挿入部位；

(d) 前記第 V I I I 因子ポリペプチドの B ドメイン内であって、ここで、前記第二 X T E N は、図 3 に記述される全長ヒト第 V I I I 因子配列に準拠して、アミノ酸残基番号約 741～750 の C 末端およびアミノ酸残基番号約 1635～約 1648 の N 末端に連結されている；

(e) 前記第 V I I I 因子ポリペプチドの C 末端；および、

(f) 前記第 V I I I 因子ポリペプチドの N 末端。

(項目 12)

前記第一の X T E は、少なくとも 10 アミノ酸、少なくとも 50 アミノ酸、少なくとも 100 アミノ酸、少なくとも 200 アミノ酸、少なくとも 300 アミノ酸、または少なくとも 400 アミノ酸で、第二の X T E N から分離されている、項目 11 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 13)

対象に投与された場合に、前記融合タンパク質が、少なくとも約 3 時間、または少なくとも約 4 時間、または少なくとも約 6 時間、または少なくとも約 12 時間、または少なくとも約 13 時間、または少なくとも約 14 時間、または少なくとも約 16 時間、または少なくとも約 24 時間、または少なくとも約 48 時間、または少なくとも約 72 時間、または少なくとも約 96 時間、または少なくとも約 120 時間、または少なくとも約 144 時間、または少なくとも約 7 日、または少なくとも約 14 日、または少なくとも約 21 日の終末相半減期を示し、ここで、前記対象は、ヒトおよび第 V I I I 因子 / von Willebrand 因子二重欠損マウスから選択される、項目 1～12 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 14)

表 4、表 13、表 14、表 15、表 16 および表 17 の配列からなる群から選択される、同等の長さの X T E N と比較して、各 X T E N が、最適整列した場合に、少なくとも約 80%、または少なくとも約 90%、または少なくとも約 91%、または少なくとも約 92%、または少なくとも約 93%、または少なくとも約 94%、または少なくとも約 95%、または少なくとも約 96%、または少なくとも約 97%、または少なくとも約 98%、または少なくとも約 99%、または約 100% の配列同一性を有する、項目 1～13 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目15)

前記融合タンパク質が、X T E Nに連結されていない対応する第V I I I 因子ポリペプチドと比較して、抗第V I I I 因子ポリペプチド抗体への前記融合タンパク質の減少した結合、および増加した凝固促進活性を示す、項目1～14のいずれか1項に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質

(項目16)

*in vitro*の凝固アッセイにより凝固促進活性が分析される場合、前X T E Nに連結されていない対応する第V I I I 因子ポリペプチドと比較して、記融合タンパク質が、抗F V I I I 抗体の存在下で、少なくとも30%、40%、50%、80%、100%、200%、300%、400%、または500%大きい凝固促進活性を有している、請求項15に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目17)

表10の抗体および第V I I I 因子阻害物質を有する血友病A患者由来のポリクローナル抗体からなる群から選択される、抗第V I I I 因子抗体を用いたBethesdaアッセイを用いて、X T E Nに連結されていない対応する第V I I I 因子ポリペプチドと比較して、抗第V I I I 因子抗体への融合タンパク質の減少した結合が測定される、項目15に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目18)

抗第V I I I 因子抗体に対する減少した結合、および、前記維持された融合タンパク質の凝固促進活性が、X T E Nに連結されていない対応する第V I I I 因子ポリペプチドに対するそれと比較して、融合タンパク質に対する、少なくとも約2、4、6、8、10、12、15、20、30、40、50、60、70、80、100または、200 Bethesda単位のより低いBethesda価により立証される、項目17に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目19)

少なくとも1つの伸長組換えポリペプチド(X T E N)を含有する組換え第V I I I 因子融合タンパク質であって、前記融合タンパク質が、以下の式IX：(A1_N)-(S)_a-(X T E N)_t-(S)_b-(A1_c)-(A2_N)-(S)_c-(X T E N)_u-(S)_d-(A2_c)-(B_N)-(S)_e-(X T E N)_v-(S)_f-(B_c)-(A3_N)-(S)_g-(X T E N)_w-(S)_h-(A3_c)-(C1_N)-(S)_i-(X T E N)_x-(S)_j-(C1_c)-(C2_N)-(S)_k-(X T E N)_y-(S)_l-(C2_c)-(S)_m-(X T E N)_z式IX、

の構造を有し、ここで、各出現に対し、独立して、

a) A1_Nは、図3に記述される全長ヒト第V I I I 因子配列に準拠して、少なくともアミノ酸残基番号1から、アミノ酸残基番号371を超えない範囲にある配列を有する、第V I I I 因子のA1ドメインの断片である；

b) いかなるA1_N断片の配列もA1_c断片において重複していないという条件下で、A1_cは、少なくともアミノ酸残基番号2から、アミノ酸残基番号372を超えない範囲にある配列を有する、第V I I I 因子のA1ドメインの断片である；

c) A2_Nは、少なくともアミノ酸残基番号373から、アミノ酸残基番号739を超えない範囲にある配列を有する、第V I I I 因子のA2ドメインの断片である；

d) いかなるA2_N断片の配列もA2_c断片において重複していないという条件下で、A2_cは、少なくともアミノ酸残基番号374から、アミノ酸残基番号740を超えない範囲にある配列を有する、第V I I I 因子のA2ドメインの断片である；

e) B_Nは、少なくともアミノ酸残基番号741から、アミノ酸残基番号1647を超えない範囲にある配列を有する、第V I I I 因子のBドメインの断片である；

f) いかなるB_N断片の配列もB_c断片において重複していないという条件下で、B_cは、少なくともアミノ酸残基番号742から、アミノ酸残基番号1648を超えない範囲にある配列を有する、第V I I I 因子のBドメインの断片である；

g) A3_Nは、少なくともアミノ酸残基番号1649から、アミノ酸残基番号2018を

超えない範囲にある配列を有する、第V I I I 因子のA 3 ドメインの断片である；
 h) いかなるA 3 N 断片の配列もA 3 C 断片において重複していないという条件下で、A 3 C は、少なくともアミノ酸残基番号1 6 5 0 から、アミノ酸残基番号2 0 1 9 を超えない範囲にある配列を有する、第V I I I 因子のA 3 ドメインの断片である；
 i) C 1 N は、少なくともアミノ酸残基番号2 0 2 0 から、アミノ酸残基番号2 1 7 1 を超えない範囲にある配列を有する、第V I I I 因子のC 1 ドメインの断片である；
 j) いかなるC 1 N 断片の配列もC 1 C 断片において重複していないという条件下で、C 1 C は、少なくともアミノ酸残基番号2 0 2 1 から、アミノ酸残基番号2 1 7 2 を超えない範囲にある配列を有する、第V I I I 因子のC 1 ドメインの断片である；
 k) C 2 N は、少なくともアミノ酸残基番号2 1 7 3 から、アミノ酸残基番号2 3 3 1 を超えない範囲にある配列を有する、第V I I I 因子のC 2 ドメインの断片である；
 l) いかなるC 2 N 断片の配列もC 2 C 断片において重複していないという条件下で、C 2 C は、少なくともアミノ酸残基番号2 1 7 4 から、アミノ酸残基番号2 3 3 2 を超えない範囲にある配列を有する、第V I I I 因子のC 2 ドメインの断片である；
 m) S は、任意選択的に開裂配列、または制限酵素部位と互換性のあるアミノ酸を含むことができる、1 ~ 約50 アミノ酸残基を有する、スペーサー配列である；
 n) a は、0 または1 のいずれかである、
 o) b は、0 または1 のいずれかである、
 p) c は、0 または1 のいずれかである、
 q) d は、0 または1 のいずれかである、
 r) e は、0 または1 のいずれかである、
 s) f は、0 または1 のいずれかである、
 t) g は、0 または1 のいずれかである、
 u) h は、0 または1 のいずれかである、
 v) i は、0 または1 のいずれかである、
 w) j は、0 または1 のいずれかである、
 x) k は、0 または1 のいずれかである、
 y) l は、0 または1 のいずれかである、
 z) m は、0 または1 のいずれかである、
 a a) t は、0 または1 のいずれかである、
 b b) u は、0 または1 のいずれかである、
 c c) v は、0 または1 のいずれかである、
 d d) w は、0 または1 のいずれかである、
 e e) x は、0 または1 のいずれかである、
 f f) y は、0 または1 のいずれかである、
 g g) z は、0 または1 のいずれかであるが、t + u + v + w + x + y + z = 1 であることを条件とする。

h h) 各X T E N は、独立して、伸長組換えタンパク質である；および、
 ここで、前記融合タンパク質は、X T E N に連結されていない対応する第V I I I 因子ポリペプチドの凝固促進活性の少なくとも約10 %、20 %、30 %、40 %、0 %、60 %、70 %、80 %、90 %または100 %を有しており、または、
 ここで、前記融合タンパク質は、E L I S A またはBethesda アッセイであるin vitro アッセイにより測定された場合、X T E N に連結されていない対応する第V I I I 因子と比較して、抗第V I I I 因子抗体への減少した結合を示す、組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目20)

z が1 である、項目19 に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目21)

v が1 であり、ここで、(X T E N) v が、図3 に記述される全長ヒト第V I I I 因子配列に準拠して、アミノ酸残基番号約741 ~ 約750 のC末端およびアミノ酸残基番

号 1 6 3 5 ~ 約 1 6 4 8 の N 末端に連結されている、項目 1 9 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 2 2)

t 、 u 、 v 、 w 、 x 、 y および z の総和が、 2 、 3 、 4 、 5 または 6 である、項目 1 9 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 2 3)

t 、 u 、 v 、 w 、 x 、 y および z の総和が 2 であり、および、 v が 1 であり、および、 z が 1 である、項目 2 2 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 2 4)

t 、 u 、 v 、 w 、 x 、 y および z の総和が 3 であり、ならびに、 v および z がそれぞれ 1 であり、ならびに、 t 、 u 、 w 、 x または y のうちの 1 つが 1 である、項目 2 2 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 2 5)

t 、 u 、 v 、 w 、 x 、 y および z の総和が 4 であり、ならびに、 v および w および z がそれぞれ 1 であり、ならびに、 t 、 u 、 x または y のうちの 1 つが 1 である、項目 2 2 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 2 6)

すべての X T E N の累積の長さが、約 8 4 ~ 約 3 0 0 0 の間、または約 1 4 4 ~ 約 2 0 0 の間、または約 2 8 8 ~ 約 1 0 0 0 アミノ酸残基である、項目 1 ~ 2 5 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 2 7)

最適整列した場合に、表 4 、表 1 3 、表 1 4 、表 1 5 、表 1 6 および表 1 7 の配列からなる群から選択される、同等の長さの X T E N と比較して、各 X T E N が、少なくとも約 8 0 % 、または少なくとも約 9 0 % 、または少なくとも約 9 1 % 、または少なくとも約 9 2 % 、または少なくとも約 9 3 % 、または少なくとも約 9 4 % 、または少なくとも約 9 5 % 、または少なくとも約 9 6 % 、または少なくとも約 9 7 % 、または少なくとも約 9 8 % 、または少なくとも約 9 9 % 、または約 1 0 0 % の配列同一性を有する、項目 1 9 ~ 2 6 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 2 8)

各 X T E N が、独立して、表 5 、表 6 、表 7 、表 8 、および表 9 から選択される挿入部位で、前記融合タンパク質に連結されている、項目 1 9 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 2 9)

X T E N が、アミノ酸残基番号 3 2 、 2 2 0 、 2 2 4 、 3 3 6 、 3 3 9 、 3 9 9 、 4 1 6 、 6 0 3 、 1 6 5 6 、 1 7 1 1 、 1 7 2 5 、 1 9 0 5 および 1 9 1 0 からなる群から選択される、成熟天然型ヒト第 V I I I 因子のアミノ酸に対応する、アミノ酸のすぐ下流に挿入される、項目 1 9 ~ 2 8 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 3 0)

式 X : (A 1) a 1 - (A 2) a 2 - [B] を含有する第一のポリペプチド；および、式 X I : a 3 - (A 3) (C 1) (C 2) を含有する第二のポリペプチド、を含有する組換え第 V I I I 因子融合タンパク質であって；

ここで、前記第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドが融合している、またはヘテロ二量体として存在しており；

ここで、 a) A 1 は、第 V I I I 因子の A 1 ドメインであり； b) A 2 は、第 V I I I 因子の A 2 ドメインであり； c) [B] は、第 V I I I 因子の B ドメイン、その断片、または欠失されており； d) A 3 は、第 V I I I 因子の A 3 ドメインであり； e) C 1 は、第 V I I I 因子の C 1 ドメインであり； f) C 2 は、第 V I I I 因子の C 2 ドメインであり； g) a 1 、 a 2 および a 3 は、酸性スペーサー領域であり；

ここで、前記 A 1 ドメインは、X T E N 許容ループ - 1 (A 1 - 1) 領域および X T E N

許容ループ - 2 (A 1 - 2) を含有し；

ここで、前記 A 2 ドメインは、 X T E N 許容ループ - 1 (A 2 - 1) 領域および X T E N 許容ループ - 2 (A 2 - 2) を含有し；

ここで、前記 A 3 ドメインは、 X T E N 許容ループ - 1 (A 3 - 1) 領域および X T E N 許容ループ - 2 (A 3 - 2) を含有し；

ここで、 X T E N 配列が、 A 1 - 1 、 A 1 - 2 、 A 2 - 1 、 A 2 - 2 、 A 3 - 1 または A 3 - 2 領域のうちの少なくとも 1 つへ挿入され；および、

ここで、前記組換え第 V I I I 因子タンパク質は、凝固促進活性を示す、組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 3 1)

式 X : (A 1) a 1 - (A 2) a 2 - [B] を含有する第一のポリペプチド；および、式 X I : a 3 - (A 3) (C 1) (C 2) を含有する第二のポリペプチド、を含有する組換え第 V I I I 因子融合タンパク質であって；

ここで、前記第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドが融合している、またはヘテロ二量体として存在しており；

ここで、 a) A 1 は、第 V I I I 因子の A 1 ドメインであり； b) A 2 は、第 V I I I 因子の A 2 ドメインであり； c) [B] は、第 V I I I 因子の B ドメイン、その断片、または、欠失されており、もしくは任意選択的に存在しておらず； d) A 3 は、第 V I I I 因子の A 3 ドメインであり； e) C 1 は、第 V I I I 因子の C 1 ドメインであり； f) C 2 は、第 V I I I 因子の C 2 ドメインであり； g) a 1 、 a 2 および a 3 は、酸性スペーサー領域であり；

ここで、 X T E N が、 a 3 に挿入されており；および、

ここで、前記融合タンパク質は凝固促進活性を示す、組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 3 2)

前記第一のポリペプチドおよび第二のポリペプチドが、式 (A 1) a 1 (A 2) a 2 [B] [a 3] (A 3) (C 1) (C 2) を含有する単一ポリペプチド鎖を形成する、項目 3 0 または 3 1 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 3 3)

前記 X T E N 許容ループが、表面に露出された、フレキシブルなループ構造内に含まれ、および、ここで、 D S S P データベースのアクセッション番号 2 R 7 E として保存されている成熟第 V I I I 因子の二次構造に従い、 A 1 - 1 は ストランド 1 および ストランド 2 の間に位置し、ならびに、 A 1 - 2 は ストランド 1 1 および ストランド 1 2 の間に位置し、 A 2 - 1 は ストランド 2 2 および ストランド 2 3 の間に位置し、 A 2 - 2 は ストランド 3 2 および ストランド 3 3 の間に位置し、 A 3 - 1 は ストランド 3 8 および ストランド 3 9 の間に位置し、 A 3 - 4 は ストランド 4 5 および ストランド 4 6 の間に位置している、項目 3 0 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

。

(項目 3 4)

A 1 - 1 を含有する、前記表面に露出された、フレキシブルなループ構造が、天然型成熟ヒト第 V I I I 因子のアミノ酸約 15 ~ アミノ酸約 45 の領域に対応する、項目 3 3 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 3 5)

A 1 - 1 が、天然型成熟ヒト第 V I I I 因子のアミノ酸約 18 ~ アミノ酸約 41 における領域に対応する、項目 3 3 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 3 6)

A 1 - 2 を含有する、表面に露出された、フレキシブルなループ構造が、天然型成熟ヒト第 V I I I 因子のアミノ酸約 201 ~ アミノ酸約 232 における領域に対応する、請求項 3 3 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 3 7)

A 1 - 2 が、天然型成熟ヒト第V I I I 因子のアミノ酸約218～アミノ酸約229における領域に対応する、項目33に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目38)

A 2 - 1 を含有する、表面に露出された、フレキシブルなループ構造が、天然型成熟ヒト第V I I I 因子のアミノ酸約395～アミノ酸約421における領域に対応する、請求項33に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目39)

A 2 - 1 が、天然型成熟ヒト第V I I I 因子のアミノ酸約397～アミノ酸約418における領域に対応する、項目33に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目40)

A 2 - 2 を含有する、表面に露出された、フレキシブルなループ構造が、天然型成熟ヒト第V I I I 因子のアミノ酸約577～アミノ酸約635における領域に対応する、請求項33に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目41)

A 2 - 2 が、天然型成熟ヒト第V I I I 因子のアミノ酸約595～アミノ酸約607における領域に対応する、項目33に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目42)

A 3 - 1 を含有する、表面に露出された、フレキシブルなループ構造が、天然型成熟ヒト第V I I I 因子のアミノ酸約1705～アミノ酸約1732における領域に対応する、項目33に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目43)

A 3 - 1 が、天然型成熟ヒト第V I I I 因子のアミノ酸約1711～アミノ酸約1725における領域に対応する、項目33に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目44)

A 3 - 2 を含有する、表面に露出された、フレキシブルなループ構造が、天然型成熟ヒト第V I I I 因子のアミノ酸約1884～アミノ酸約1917における領域に対応する、項目33に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目45)

A 3 - 2 が、天然型成熟ヒト第V I I I 因子のアミノ酸約1899～アミノ酸約1911における領域に対応する、項目33に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目46)

X T E N が、A 1 - 1、A 1 - 2、A 2 - 1、A 2 - 2、A 3 - 1 または A 3 - 2 領域の内の少なくとも2つに挿入されている、項目30および項目32～45のいずれか1項に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目47)

X T E N が、アミノ酸残基番号32、220、224、399、416、603、1711、1725、1905および1910からなる群から選択される、成熟天然型ヒト第V I I I 因子のアミノ酸に対応する、アミノ酸のすぐ下流に挿入される、項目30および項目32～46のいずれか1項に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目48)

追加のX T E N配列が、a3酸性スペーサー領域に挿入される、項目30および請求項32～47のいずれか1項に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目49)

前記追加のX T E N配列が、成熟天然型ヒト第V I I I 因子のアミノ酸1656に対応するアミノ酸のすぐ下流のa3酸性スペーサーに挿入される、項目48に記載の組換え第V I I I 因子融合タンパク質。

(項目50)

前記A1ドメインは、X T E N許容ループ-1(A1-1)領域およびX T E N許容ループ-2(A1-2)を含有し；

前記A2ドメインは、X T E N許容ループ-1(A2-1)領域およびX T E N許容ル

ープ - 2 (A 2 - 2) を含有し ;

前記 A 3 ドメインは、 X T E N 許容ループ - 1 (A 3 - 1) 領域および X T E N 許容ループ - 2 (A 3 - 2) を含有し ;

ここで、追加の X T E N 配列が、 A 1 - 1 、 A 1 - 2 、 A 2 - 1 、 A 2 - 2 、 A 3 - 1 または A 3 - 2 領域の少なくとも 1 つへ挿入される、項目 3 1 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 5 1)

追加の X T E は、アミノ酸残基番号 3 2 、 2 2 0 、 2 2 4 、 3 3 6 、 3 3 9 、 3 9 0 、 3 9 9 、 4 1 6 、 6 0 3 、 1 6 5 6 、 1 7 1 1 、 1 7 2 5 、 1 9 0 5 または 1 9 1 0 からなる群から選択される、成熟天然型ヒト第 V I I I 因子に対応するアミノ酸のすぐ下流に挿入される、項目 3 1 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 5 2)

前記融合タンパク質が、 X T E N に連結されていない対応する第 V I I I 因子の凝固促進活性の、少なくとも約 3 0 % 、 4 0 % 、 5 0 % 、 6 0 % 、 7 0 % 、 8 0 % または 9 0 % を示し、ここで、前記凝固促進活性は、 in vitro 凝固アッセイにより分析される、項目 1 5 ~ 5 1 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 5 3)

前記凝固促進活性は、発色分析、 1 段階凝固アッセイ、またはその両方により測定される、項目 5 2 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 5 4)

前記融合タンパク質が、細胞培養培地で発現され、 in vitro 凝固アッセイにより分析された場合、約 0 . 5 I U / m l 、または約 1 . 0 、または約 1 . 5 、または約 2 . 0 I U / m l を超える in vitro 凝固促進活性を示す、項目 1 ~ 5 3 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 5 5)

前記融合タンパク質が、対象に投与された場合に、少なくとも約 3 時間、または 4 時間、または 6 時間、または 1 2 時間、または 1 3 時間、または 1 4 時間、または 1 6 時間、または 2 4 時間、または 4 8 時間、または 7 2 時間、または 9 6 時間、または 1 2 0 時間、または 1 4 4 時間、または 7 日、または 1 4 日、または 2 1 日の終末相半減期を示す、項目 3 0 ~ 5 4 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 5 6)

前記対象がヒトである、項目 5 5 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 5 7)

前記対象が、 V I I I / v o n W i l l e b r a n d 因子二重欠損マウスである、請求項 5 5 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 5 8)

前記融合タンパク質が、 X T E N に連結されていない対応する第 V I I I 因子と比較して、抗第 V I I I 因子抗体への減少した結合を示す、項目 3 0 ~ 5 7 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 5 9)

前記第 V I I I 因子融合タンパク質が、表 1 0 の抗体および第 V I I I 因子阻害物質を有する血友病 A 患者由来のポリクローナル抗体からなる群から選択される、抗第 V I I I 因子抗体を用いた Bethesda アッセイにおいて分析された場合に、 X T E N に連結されていない第 V I I I 因子と比較して、少なくとも約 2 、 4 、 6 、 8 、 1 0 、 1 2 、 1 5 、 2 0 、 3 0 、 4 0 、 5 0 、 6 0 、 7 0 、 8 0 、 1 0 0 または 2 0 0 Bethesda 単位だけ低い Bethesda 値を有する、項目 5 8 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 6 0)

第 V I I I 因子ポリペプチドならびに、少なくとも第一および第二の伸長組換えポリペプチド (X T E N) を含有する組換え第 V I I I 因子融合タンパク質であって、ここで、

前記第一の X T E N は、前記第 V I I I 因子ポリペプチドの C 2 ドメイン内で前記第 V I I I 因子ポリペプチドに連結され、前記第二の X T E N は、前記第 V I I I 因子ポリペプチドの A 1 または A 2 ドメイン内で前記第 V I I I 因子ポリペプチドに連結され；ここで、(a) 前記融合タンパク質は、X T E N に連結されていない対応する第 V I I I 因子と比較して、A 1、A 2 または C 2 ドメイン内に位置するエピトープへ結合することができる第 V I I I 因子阻害抗体である、抗第 V I I I 因子抗体への減少した結合を示し；および / または、(b) ここで、前記融合タンパク質は、凝固促進活性を示す、組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 6 1)

前記第二の X T E N は、前記第 V I I I 因子ポリペプチドの A 2 ドメイン内で前記第 V I I I 因子ポリペプチドに連結されている、項目 6 0 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 6 2)

前記抗第 V I I I 因子抗体は、前記第 V I I I 因子ポリペプチドの A 2 ドメインに結合する、項目 6 0 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 6 3)

前記抗第 V I I I 因子抗体は、前記第 V I I I 因子ポリペプチドの C 2 ドメインに結合する、項目 6 0 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 6 4)

前記組換え第 V I I I 因子融合タンパク質は、第三の X T E N をさらに含有し、ここで、前記第三の X T E N は、B ドメイン内にある挿入部位、もしくは B ドメインを置換する挿入部位で、または C 末端で、前記第 V I I I 因子に連結されている、項目 6 0 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 6 5)

表 7 の部位からなる群から選択される挿入部位の 1、2、3、4、5 もしくは 6 アミノ酸で、または、表 7 の部位からなる群から選択される挿入部位の 1、2、3、4、5 もしくは 6 アミノ酸以内で、前記第 V I I I 因子ポリペプチド内に連結される、第三の X T E N を含有する項目 6 0 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 6 6)

表 9 の部位からなる群から選択される挿入部位の 1、2、3、4、5 もしくは 6 アミノ酸で、または、表 9 の部位からなる群から選択される挿入部位の 1、2、3、4、5 もしくは 6 アミノ酸以内で、前記第 V I I I 因子ポリペプチド内に連結される、第三の X T E N を含有する項目 6 0 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 6 7)

抗第 V I I I 因子抗体の、前記融合タンパク質への結合が、E L I S A アッセイにより分析された場合に、X T E N に連結されていない対応する第 V I I I 因子ポリペプチドと比較して、少なくとも約 5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 % または 40 % だけ減少している、項目 6 0 ~ 6 6 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 6 8)

前記抗第 V I I I 因子抗体が、表 1 0 の抗体および第 V I I I 因子阻害物質を有する血友病 A 患者由来のポリクローナル抗体からなる群から選択される、項目 6 0 ~ 6 7 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 6 9)

前記融合タンパク質が、抗第 V I I I 因子抗体の存在下で、in vitro 凝固アッセイにより分析された場合に、X T E N に連結されていない対応する第 V I I I 因子と比較して、少なくとも 10 %、20 %、30 %、40 %、50 %、80 %、100 %、200 %、300 %、400 % または 500 % の凝固促進活性を維持している、項目 6 0 ~ 6 8 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 7 0)

前記分析が、発色分析である、項目69に記載の組換え第VIII因子融合タンパク質。

(項目71)

各XTENが、以下の点で特徴付けられる配列を有する、項目1～70のいずれか1項に記載の組換え第VIII因子融合タンパク質：

- (a) 前記XTENは、少なくとも36アミノ酸残基を含有する；
- (b) グリシン(G)、アラニン(A)、セリン(S)、スレオニン(T)、グルタミン酸(E)およびプロリン(P)の総和が、前記XTENの総アミノ酸残基の約80%超を占める；
- (c) 実質的に非反復であり、(i)前記XTENが、アミノ酸がセリンでない限り、同一である3つの連続したアミノ酸を含有しない；(ii)XTEN配列の少なくとも約80%が、非重複配列モチーフから構成され、前記配列モチーフのそれぞれは、グリシン(G)、アラニン(A)、セリン(S)、スレオニン(T)、グルタミン酸(E)およびプロリン(P)から選択される4～6つのアミノ酸からなる、約9～約14アミノ酸残基を含有し、ここで、任意の2つの連続するアミノ酸残基は、各配列モチーフ内で2回より多くは存在しない；または(iii)前記XTENは、10未満の部分配列スコアを有する；
- (d) 前記XTENは、GORアルゴリズムによる決定で、90%超のランダムコイル構造を有している；
- (e) 前記XTENは、Chou-Fasmanアルゴリズムによる決定で、2%未満のヘリックスおよび2%未満のシートを有している；および、
- (f) 前記XTENは、TEPITOPEアルゴリズムにより分析された場合に、推定T細胞エピトープを欠失しており、ここで、前記アルゴリズムによる前記推定に対する前記TEPITOPEの閾値スコアは、-9の閾値を有している。.

(項目72)

各XTENが、最適整列した場合に、独立して、表4、表13、表14、表15、表16および表17からなる群から選択される、同等の長さの1以上のXTEN配列と比較して、少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%、または約100%の配列同一性を有する、項目1～71のいずれか1項に記載の組換え第VIII因子融合タンパク質。

(項目73)

少なくとも1つのXTENが、AE42_1、AE42_2、AE42_3、AG42_1、AG42_2、AG42_3、AG42_4、AE144_1A、AE144_2A、AE144_2B、AE144_3A、AE144_3B、AE144_4A、AE144_4B、AE144_5A、AE144_6B、AG144_1、AG144_2、AG144_3A、AG144_3B、AG144_4C、AG144_4F、AG144_5A、AG144_6B、AG144_7C、AG144_8D、AG144_9E、AG144_10F、AG144_11G、AG144_12H、AG144_13I、AG144_14J、AG144_15K、AG144_16L、AG144_17M、AG144_18N、AG144_19O、AG144_20P、AG144_21Q、AG144_22R、AG144_23S、AG144_24T、AG144_25U、AG144_26V、AG144_27W、AG144_28X、AG144_29Y、AG144_30Z、AE288_1、AE288_2、AG288_1およびAG288_2から選択される配列と比較して、少なくとも90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%、または約100%の配列同一性を有する、項目1～72のいずれか1項に記載の組換え第VIII因子融合タンパク質。

(項目74)

成熟ヒト第VIII因子に対して付番された、残基R1645、R1648、Y1680、R1689およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される前記第VIII因子配列中に、1、2または3のアミノ酸置換を含有し、ここで、各置換は独立して、アラニン、グリシンまたはフェニルアラニンであるアミノ酸へのものである、項目1～73のいずれか1項に記載の組換え第VIII因子融合タンパク質。

(項目 7 5)

前記融合タンパク質が、少なくとも約 1 . 3 、または少なくとも約 2 、または少なくとも約 3 、または少なくとも約 4 、または少なくとも約 5 、または少なくとも約 6 、または少なくとも約 7 、または少なくとも約 8 、または少なくとも約 9 、または少なくとも約 10 の見かけ分子量係数を示す、項目 1 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I I 因子

(項目 7 6)

少なくとも 1 つの X T E N が、 1 または 2 の開裂配列（各々が、第 X I a 因子、第 X I I a 因子、カリクレイン（ k a l l i k r e i n ）、第 V I I a 因子、第 I X a 因子、第 X a 因子、第 I I a 因子（トロンビン）、エラスターーゼ - 2 、 M M P - 1 2 、 M M P 1 3 、 M M P - 1 7 および M M P - 2 0 からなる群から選択される哺乳類プロテアーゼにより開裂可能である）を介して、第 V I I I 因子ポリペプチドに連結され、ここで、前記哺乳類プロテアーゼによる、前記開裂配列での開裂により、前記 X T E N から前記第 V I I I 因子配列が放出され、ここで、前記放出された第 V I I I 因子配列は、非開裂の融合タンパク質と比較して、凝固促進活性の増加を示す、項目 1 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 7 7)

前記開裂配列（複数含む）は、第 X I a 因子により開裂可能である、項目 7 6 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 7 8)

少なくとも 3 つの独立した X T E N を含有する組換え第 V I I I 因子融合タンパク質であって、ここで、前記第 V I I I 因子ポリペプチドは、 a 1 酸性スペーサー領域を含有する A 1 ドメイン、 a 2 酸性スペーサー領域を含有する A 2 ドメイン、 a 3 酸性スペーサー領域を含有する A 3 ドメイン、 C 1 ドメイン、 C 2 ドメイン、および、任意選択的に B ドメインの一部またはすべてを含有し、および、ここで、前記少なくとも 3 つの X T E N のそれぞれは、第 V I I I 因子ポリペプチドの異なる挿入部位で位置し、ここで、前記異なる挿入部位のそれぞれは、独立して、以下からなる群から選択される、組換え第 V I I I 因子融合タンパク質：

(a) 表 5 、表 6 、表 7 、表 8 および表 9 由来の挿入部位；

(b) 図 3 に記述される全長ヒト第 V I I I 因子配列に準拠して、アミノ酸残基 3 2 、 2 2 0 、 2 2 4 、 3 3 6 、 3 3 9 、 3 9 0 、 3 9 9 、 4 1 6 、 6 0 3 、 1 6 5 6 、 1 7 1 1 、 1 7 2 5 、 1 9 0 5 または 1 9 1 0 の 6 アミノ酸以内の挿入部位；

(c) 前記第 V I I I 因子配列の任意の 2 つの隣接するドメインの間の挿入部位であって、ここで、前記 2 つの隣接するドメインは、 A 1 および A 2 、 A 2 および B 、 B および A 3 、 A 3 および C 1 、ならびに、 C 1 および C 2 からなる群から選択される、挿入部位；

(d) 図 3 に記述される全長ヒト第 V I I I 因子配列に準拠して、アミノ酸残基番号約 7 4 1 ~ 約 7 5 0 での第一の位置から始まり、アミノ酸残基番号約 1 6 3 5 ~ 約 1 6 4 8 での第二の位置で終わる、内部 B ドメイン欠失を有する挿入部位；

(e) 前記第 V I I I 因子ポリペプチドの C 末端；

(f) 前記第 V I I I 因子ポリペプチドの N 末端；

(g) 前記第 V I I I 因子ポリペプチドの 2 つの隣接するドメインの間；

ここで、前記すべての X T E N の累積の長さは少なくとも約 8 4 ~ 約 3 0 0 0 アミノ酸残基である。

(項目 7 9)

前記融合タンパク質は、 G T P G S G T A S S S P (配列番号 3 1) 、 G S S T P S G A T G S P (配列番号 3 2) 、 G S S P S A S T G T G P (配列番号 3 3) G A S P G T S S T G S P (配列番号 3 4) および、 G S E P A T S G S E T P G T S E S A T P E S G P G S E P A T S G S E T P G S P A G S P T S T E E G T S T E P S E G S A P G S E P A T S G S E T P G S E P A T S G S E T P G S E P A T S G S E T P G T S T E P S E G S A P G T S E S A T P E S G P G S E P A T S G S E T P G T S T E P S E G S

A P (配列番号 5 9) から選択される配列を含有しない、項目 7 8 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 8 0)

前記融合タンパク質は、G S E P A T S G S E T P G T S E S A T P E S G P G S E P A T S G S E T P G S P A G S P T S T E E G T S T E P S E G S A P G S E P A T S G S E T P G S E P A T S G S E T P G T S T E P S E G S A P G T S E S A T P E S G P G S E P A T S G S E T P G T S T E P S E G S A P (配列番号 5 9) 、 PG S S P S A S T G T G P G S S P S A S T G T G P G T P G S G T A S S S P G S S T P S G A T G S P G S S P S A S T G T G P G A S P G T S S T G S P G T S S T G S P G T P G S G T A S S S P G A S P G T S S T G S P G A S P G T S S T G S P G T P G S G T A S S S P G S S T P S G A T G S P G T P G S G T A S S S P G S S T P S G A T G S P G S S P S A S T G T G P G S S P S A S T G T G P G A S P G T S S T G S P G S S T P S G A T G S P G S S P S A S T G T G P G S S P S A S T G T G P G A S P G T S S T G S P G A S P G T S S T G S P G S S P S A S T G T G P G T P G S G T A S S S P G S S T P S G A T G S (配列番号 8 0) からなる X T E N 配列を含有しない、項目 7 8 または 7 9 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 8 1)

前記融合タンパク質は、X T E N に連結されていない対応する第 V I I I 因子と比較して、少なくとも約 3 0 %、または約 4 0 %、または約 5 0 %、または約 6 0 %、または約 7 0 %、または約 8 0 %、または約 9 0 % の凝固促進活性を維持している、項目 7 8 ~ 8 0 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 8 2)

前記融合タンパク質は、前記 X T E N を欠落している対応する第 V I I I 因子ポリペプチドと比較して、対象に投与された場合に、延長された終末相半減期を示す、項目 7 8 ~ 8 0 のいずれか 1 項に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 8 3)

前記融合タンパク質は、対象に投与された場合に、少なくとも約 3 時間、または 4 時間、または 6 時間、または 1 2 時間、または 1 3 時間、または 1 4 時間、または 1 6 時間、または 2 4 時間、または 4 8 時間、または 7 2 時間、または 9 6 時間、または 1 2 0 時間、または 1 4 4 時間、または 7 日、または 1 4 日、または 2 1 日の終末相半減期を示す、項目 8 2 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 8 4)

前記対象がヒトである、項目 8 3 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 8 5)

前記対象が、第 V I I I 因子 / v o n W i l l e b r a n d 因子二重欠損マウス である、項目 8 3 に記載の組換え第 V I I I 因子融合タンパク質。

(項目 8 6)

第 V I I I 因子ポリペプチドおよび少なくとも 1 つの X T E N を含有する組換え第 V I I I 因子融合タンパク質であって、ここで、前記第 V I I I 因子ポリペプチドは、A 1 ドメイン、A 2 ドメイン、A 3 ドメイン、C 1 ドメイン、C 2 ドメインおよび、任意選択的に B ドメインの一部またはすべてを含有し、ここで、前記少なくとも 1 つの X T E N (複数含む) のそれぞれは、前記第 V I I I 因子ポリペプチドに、残基番号 1 8 ~ 3 2 、または 4 0 、または 2 1 1 ~ 2 2 4 、または 3 3 6 ~ 4 0 3 、または 5 9 9 、または 7 4 5 ~ 1 6 4 0 、または 1 6 5 6 ~ 1 7 2 8 、または 1 7 9 6 ~ 1 8 0 4 、または 1 9 0 0 ~ 1 9 1 2 、または 2 1 7 1 ~ 2 3 3 2 から選択される挿入部位で、連結され、；および、ここで、前記融合タンパク質は、X T E N に連結されていない対応する第 V I I I 因子と比

較して、少なくとも約30%、または約40%、または約50%、または約60%、または約70%、または約80%、または約90%の凝固促進活性を有している、組換え第VIII因子融合タンパク質。

(項目87)

項目1～86のいずれか1項に記載の組換え第VIII因子融合タンパク質および薬学的に受容可能な担体を含有する、医薬組成物。

(項目88)

対象における凝固障害を治療する方法であって、前記対象に項目87に記載の医薬組成物の凝固有効量を含有する組成物を投与することを含む、方法。

(項目89)

X TENが連結されていない対応する第VIII因子を含有し、同等の投与量で対象に投与される組成物と比較して、前記投与の後の凝固促進第VIII因子の血液濃度がより高いレベルに維持されている、項目88に記載の方法。

(項目90)

前記血液濃度が、前記投与後の少なくとも48時間の間、約0.05IU/ml、または約0.1IU/ml、または約1.5IU/ml以上に維持されている、項目89に記載の方法。

(項目91)

項目87に記載の医薬組成物の凝固有効量を、血液と接触させることを含む、対象において、血液を凝固させる方法。

(項目92)

第VIII因子の循環阻害物質を有する対象における、凝固障害を治療する方法であって、前記対象に、項目87に記載の医薬組成物の凝固有効量を投与することを含み、ここで、前記組成物は、X TENに連結されていない対照の第VIII因子を含有し、前記対象に同等の量を用いて投与される組成物と比較して、前記対象においてより高い凝固促進活性を示す、方法。

(項目93)

対照における出血症状を治療する方法であって、項目87に記載の医薬組成物の凝固有効量を前記対象に投与することを含み、ここで、X TENに連結されておらず、および前記対象に同等の量を用いて投与される対応する第VIII因子と比較して、前記融合タンパク質の前記凝固有効量により、少なくとも2倍、または少なくとも3倍長い期間、出血症状が止められる、方法。

(項目94)

前記凝固障害が、血友病Aである、項目88～93のいずれか1項に記載の方法。

(項目95)

血友病A患者の治療のための医薬レジメンにおける使用のための組換え第VIII因子融合タンパク質であって、前記レジメンは、項目1～86のいずれか1項に記載の前記組換え第VIII因子融合タンパク質を含有する医薬組成物を含有する、組換え第VIII因子融合タンパク質。

(項目96)

前記医薬レジメンに、前記血友病A患者に止血をもたらすために必要とされる医薬組成物の量を決定するステップがさらに含まれる、項目95に記載の組換え第VIII因子融合タンパク質。

(項目97)

血友病A患者の治療のための前記医薬レジメンに、前記対象に、2回以上の連続投与で、医薬組成物を有効量で投与することが含まれる、項目95の組換え第VIII因子融合タンパク質であって、ここで、X TENに連結されておらず、同等の投与量を用いて投与される第VIII因子と比較して、前記投与により、前記血友病A疾患に関連する少なくとも1、2または3つのパラメータの、少なくとも10%、または20%、または30%、または40%、または50%、または60%、または70%、または80%、または

90%大きい改善がもたらされる、組換え第VIII因子融合タンパク質。

(項目98)

前記改善されるパラメータが、凝固促進第VIII因子の血液濃度、減少した活性化部分プロトンピン(aPTT)アッセイ時間、減少した1段階または2段階凝固アッセイ時間、出血症状の発生の遅延、減少した発色分析時間、減少した出血アッセイ時間、出血イベントの消散、または天然FVIIIに対する減少したBethesda価、から選択される、項目97に記載の組換え第VIII因子融合タンパク質。

(項目99)

項目1~86のいずれか1項に記載の組換え第VIII因子融合タンパク質を含有する、血友病Aの治療に用いられる組換え第VIII因子融合タンパク質。

(項目100)

項目1~86のいずれか1項に記載の組換え第VIII因子融合タンパク質、またはその相補物をコードする核酸。

(項目101)

シグナルペプチドをコードする配列をさらに含有する、項目100に記載の核酸であって、前記配列は、以下である、核酸：

ATGCAAAATAGAGCTCTCCACCTGCCTCTTTCTGTGCCCTTT
TGCAGATTCTGCTTTAGT (配列番号1613)またはその相補体。

(項目102)

項目100または項目101に記載の核酸を含有する、発現ベクター。

(項目103)

項目102に記載の発現ベクターを含有する、単離された宿主細胞。

(項目104)

(a) 項目102の発現ベクターを含有する宿主細胞を提供すること、

(b) 前記宿主細胞を、前記融合タンパク質の產生をもたらす条件下で培養すること、および、

(c) 前記融合タンパク質を回収すること、

を含む、項目1~86のいずれか1項に記載の融合タンパク質を製造する方法。

(項目105)

最適整列した場合に、表21から選択される同等の長さの配列と比較して、少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%、または少なくとも約100%の配列同一性を有するポリペプチドを含有する、組換え第VIII因子融合タンパク質。

(項目106)

(a) 最適整列した場合に、表21から選択される同等の長さの配列と比較して、少なくとも約80%、または少なくとも約90%、または少なくとも約91%、または少なくとも約92%、または少なくとも約93%、または少なくとも約94%、または少なくとも約95%、または少なくとも約96%、または少なくとも約97%、または少なくとも約98%、または少なくとも約99%、または少なくとも約100%の配列同一性を有する配列、または、

(b) (a)のポリヌクレオチドの相補体、

から選択されるポリヌクレオチド配列を含有する単離された核酸。

(項目107)

(a) の核酸の5'末端に連結される、配列ATGCAAAATAGAGCTCTCCACCTGCCTCTTTCTGTGCCCTTTAGT、または、(b)の3'末端に連結される配列の相補体、をさらに含有する、項目106に記載の単離された核酸。