(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년11월19일
(11) 등록번호 10-2329315
(24) 등록일자 2021년11월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 19/00 (2006.01) *A61K 38/37* (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 19/00 (2013.01)
A61K 38/37 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7003523
(22) 출원일자(국제) 2013년07월10일
심사청구일자 2018년07월09일
(85) 번역문제출일자 2015년02월10일
(65) 공개번호 10-2015-0036510
(43) 공개일자 2015년04월07일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/049989
(87) 국제공개번호 WO 2014/011819
국제공개일자 2014년01월16일
(30) 우선권주장
61/670,401 2012년07월11일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌
WO2011060242 A2
WO2011069164 A1
NATURE BIOTECHNOLOGY. vol. 27, no. 12, 2009, pages 1186-1190.
WO2011101242 A1

(73) 특허권자
바이오버라티브 테라퓨틱스 인크.
미국 매사추세츠 (우편번호 02451) 월섬 2엔디 에비뉴 225
(72) 발명자
차브라 에크타 세트
미국 01702 매사추세츠주 프레이밍햄 월체스처 로드 1550 넘버128
류 통야오
미국 02421 매사추세츠주 렉싱턴 버크만 드라이브 53
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 33 항 심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 **XTEN 및 폰 빌레브란트 인자 단백질과의 VIII 인자 복합체 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 VWF의 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 VWF 단백질, 하나 이상의 XTEN 서열 및 FVIII 단백질을 포함하는 키메라 단백질을 제공하되, 여기서 VWF 단편, XTEN 서열 또는 FVIII 단백질은 서로 연결되거나 회합된다. 키메라 단백질은 하나 이상의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(예를 들면, Fc 구역)를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 VWF 단편을 포함하는 폴리펩타이드 사슬은 XTEN 서열에 연결된 FVIII 단백질을 포함하는 폴리펩타이드 사슬에 결합하거나 이것과 회합되고, VWF 단편을 포함하는 폴리펩타이드 사슬은 XTEN 서열에 연결된 FVIII 단백질에 대한 내인성 VWF의 결합을 방지하거나 억제할 수 있다. FVIII에 대한 반감기 제한 인자인 FVIII 단백질에 대한 내인성 VWF의 결합을 방지하거나 억제함으로써, VWF 단편은 FVIII 단백질을 포함하는 키메라 단백질의 반감기의 연장을 유도할 수 있다. 본 발명은 또한 뉴클레오타이드, 벡터, 숙주 세포, VWF 단편의 사용 방법, 또는 키메라 단백질을 포함한다.

(52) CPC특허분류
C07K 14/755 (2013.01)
(72) 발명자
창 페이-윤
미국 94025 캘리포니아주 멘로 파크 샤론 로드 2395
피터스 로버트 티
미국 02492 매사추세츠주 니덤 파킨슨 스트리트 53
컬맨 존
미국 02478 매사추세츠주 벨몬트 크릴리 로드 88

(30) 우선권주장
61/759,819 2013년02월01일 미국(US)
61/801,504 2013년03월15일 미국(US)
61/801,544 2013년03월15일 미국(US)
61/827,158 2013년05월24일 미국(US)
61/840,811 2013년06월28일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a)(i) 폰 빌레브란트 인자 (von Willebrand Factor: VWF) 의 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 VWF 단편,

(ii) 제 1 연장된 길이의 폴리펩타이드 (XTEN), 및

(iii) 제 1 Fc 구역

을 포함하는 제 1 폴리펩타이드 및

(b)(i) VIII 인자 (FVIII) 단백질 및

(ii) 제 2 Fc 구역

을 포함하는 제 2 폴리펩타이드

를 포함하는 키메라 단백질로서,

VWF 단편의 D' 도메인은 서열 번호 2 의 764 번 내지 866 번 아미노산으로 이루어지고, VWF 단편의 D3 도메인은 서열 번호 2 의 867 번 내지 1240 번 아미노산에서 1099 번 잔기, 1142 번 잔기 또는 1099 번 및 1142 번 잔기 모두가 시스테인 이외의 아미노산으로 치환된 아미노산 서열로 이루어지고,

제 1 Fc 구역 및 제 2 Fc 구역 간에 하나 이상의 이황화 결합이 형성되는 것인,

키메라 단백질.

청구항 2

제 1 항에 있어서, VWF 단편은 서열 번호 2 의 1099 번 잔기, 1142 번 잔기, 또는 1099 번 및 1142 번 잔기 모두에 알라닌을 포함하는 것인 키메라 단백질.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 제 1 Fc 구역은 제 1 XTEN 에 연결된 것인 키메라 단백질.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 제 1 Fc 구역은 링커에 의해 제 1 XTEN 에 연결된 것인 키메라 단백질.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 링커는 개열 가능한 링커를 포함하는 것인 키메라 단백질.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 제 1 Fc 구역 및 제 2 Fc 구역 간에 두 개의 이황화 결합이 형성되는 것인 키메라 단백질.

청구항 7

제 1 항에 있어서, VWF 단편은 하나 이상의 이황화 결합에 더하여 비공유 결합에 의해 FVIII 단백질과 연결된 것인 키메라 단백질.

청구항 8

제 1 항에 있어서, FVIII 단백질은 N-말단 부분 및 C-말단 부분을 포함하고, N-말단 부분은 서열 번호 4 의 1 번 내지 745 번 아미노산으로 이루어지는 것인 키메라 단백질.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 제 2 폴리펩타이드는 제 2 XTEN 을 추가로 포함하는 것인 키메라 단백질.

청구항 10

제 8 항에 있어서, 제 2 폴리펩타이드는 제 2 XTEN 을 추가로 포함하고, 제 2 XTEN 이 FVIII 단백질의 745 번 잔기의 바로 하류에 삽입된 것인 키메라 단백질.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 제 1 XTEN 서열은 VWF 단편의 C 말단에 연결되고, 제 1 Fc 구역은 제 1 XTEN 서열의 C 말단에 연결되며, 제 2 Fc 영역은 FVIII 단백질의 C 말단에 연결되는 것인 키메라 단백질.

청구항 12

제 5 항에 있어서, 제 1 Fc 구역 및 제 2 Fc 구역이 서로 동일한 것인 키메라 단백질.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 제 1 Fc 구역과 제 2 Fc 구역이 인간 IgG1 인 키메라 단백질.

청구항 14

제 5 항에 있어서, 제 1 XTEN 서열은 개열 가능한 링커에 의해 제 1 Fc 구역의 N 말단에 연결되고, VWF 단백질은 제 1 XTEN 의 N 말단에 연결되는 것인 키메라 단백질.

청구항 15

제 1 항에 있어서, 제 1 폴리펩타이드는 서열 번호 119 의 아미노산 서열로 이루어지고, 제 2 폴리펩타이드는 서열 번호 103 의 아미노산 서열로 이루어지는 것인 키메라 단백질.

청구항 16

제 1 항에 있어서, VWF 단편은, VWF 단편에 작동적으로 연결된 VWF 의 신호 펩타이드를 추가로 포함하는 것인 키메라 단백질.

청구항 17

제 1 폴리뉴클레오타이드 및 제 2 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 세트로서, 제 1 폴리뉴클레오타이드 및 제 2 폴리뉴클레오타이드는 제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항의 키메라 단백질의 제 1 폴리펩타이드 및 제 2 폴리펩타이드를 각각 코딩하는 것인 폴리뉴클레오타이드 세트.

청구항 18

제 17 항에 있어서, 쌍 지은 염기성 아미노산 개열 효소 (Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme, PACE) 를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 것인 폴리뉴클레오타이드 세트.

청구항 19

제 17 항의 폴리뉴클레오타이드 세트를 포함하는 숙주 세포.

청구항 20

제 18 항의 폴리뉴클레오타이드 세트를 포함하는 숙주 세포.

청구항 21

제 20 항에 있어서, 포유동물 세포인 숙주 세포.

청구항 22

제 21 항에 있어서, 포유동물 세포는 HEK293 세포, CHO 세포 및 BHK 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 숙주 세포.

청구항 23

제 22 항에 있어서, HEK293 세포인 숙주 세포.

청구항 24

제 23 항에 있어서, HEK293F 세포인 숙주 세포.

청구항 25

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항의 키메라 단백질 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는, 대상체에서 A 형 혈우병을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 26

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항의 키메라 단백질을 포함하는, 대상체에서 A 형 혈우병을 치료하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 27

제 26 항에 있어서, 예방학적으로 또는 수요대응형으로 투여되는 것인 약제학적 조성물.

청구항 28

제 26 항에 있어서, 국소 투여, 안내 투여, 비경구 투여, 척추강내 투여, 경막하 투여 및 경구 투여로 이루어진 군으로부터 선택된 경로에 의해 투여되는 것인 약제학적 조성물.

청구항 29

제 28 항에 있어서, 비경구 투여는 정맥내인 것인 약제학적 조성물.

청구항 30

제 28 항에 있어서, 비경구 투여는 피하인 것인 약제학적 조성물.

청구항 31

제 1 항 내지 제 16 항 중 어느 한 항의 키메라 단백질을 포함하는, 출혈 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 출혈 질환 또는 장애를 치료하기 위한 약제학적 조성물로서,

출혈 질환 또는 장애는 출혈 응고 장애, 관절혈증, 근육 출혈, 구강내 출혈, 출혈, 근육으로의 출혈, 경구 출혈, 외상, 외상 백선, 위장관 출혈, 두개내 출혈, 복강내 출혈, 흉내 출혈, 골절, 중추 신경계 출혈, 인두후강에서의 출혈, 복막강에서의 출혈 및 장요근초에서의 출혈로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 약제학적 조성물.

청구항 32

하나 이상의 숙주 세포를 제 17 항의 폴리뉴클레오타이드 세트로 형질감염시키는 단계 및 숙주 세포에서 키메라 단백질을 발현시키는 단계를 포함하는, 키메라 단백질의 제조 방법.

청구항 33

제 32 항에 있어서, 키메라 단백질을 단리하는 단계를 추가로 포함하는, 키메라 단백질의 제조 방법.

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

청구항 130

삭제

청구항 131

삭제

청구항 132

삭제

청구항 133

삭제

청구항 134

삭제

청구항 135

삭제

청구항 136

삭제

청구항 137

삭제

청구항 138

삭제

청구항 139

삭제

청구항 140

삭제

청구항 141

삭제

청구항 142

삭제

청구항 143

삭제

청구항 144

삭제

청구항 145

삭제

청구항 146

삭제

청구항 147

삭제

청구항 148

삭제

청구항 149

삭제

청구항 150

삭제

청구항 151

삭제

청구항 152

삭제

청구항 153

삭제

청구항 154

삭제

청구항 155

삭제

청구항 156

삭제

청구항 157

삭제

청구항 158

삭제

청구항 159

삭제

청구항 160

삭제

청구항 161

삭제

청구항 162

삭제

청구항 163

삭제

청구항 164

삭제

청구항 165

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

배 경 기 술

[0001] A형 혈우병은 응고 VIII 인자(FVIII)를 코딩하는 유전자의 결함에 의해 생기는 출혈 장애이고 10,000명의 남아 중 1 내지 2명을 이환시킨다. Graw *et al., Nat. Rev. Genet.* 6(6): 488-501 (2005). A형 혈우병으로 이환된 환자는 정제된 또는 재조합으로 생생된 FVIII의 점적주사에 의해 치료될 수 있다. 그러나, 모든 상업적으로 구입 가능한 FVIII 제품은 약 8시간 내지 12시간의 반감기를 가져, 환자에 대한 빈번한 정맥내 투여를 요하는 것으로 공지되어 있다. 문헌[Weiner M.A. and Cairo, M.S., Pediatric Hematology Secrets, Lee, M.T., 12. Disorders of Coagulation, Elsevier Health Sciences, 2001; Lillicrap, D. Thromb. Res. 122 Suppl 4:S2-8 (2008)]을 참조한다. 또한, FVIII 반감기를 연장시키기 위해 다수의 접근법이 시도되었다. 예를 들면, 응고 인자의 반감기를 연장시키기 위해 개발 중인 접근법은 페길화, 글라이코페길화 및 알부민과의 접합을 포함한다. 문헌[Dumont et al., Blood. 119(13): 3024-3030(2012년 1월 13일에 공개)]을 참조한다. 그러나, 사용되는 단백질 조작과 무관하게, 현재 개발 중인 장기 작용성 FVIII 제품은 전임상 동물 모델에서 불과 약 1.5 내지 2시간으로 제한된 반감기를 갖는 것으로 보고되었다. 상기 문헌 참조. 일치하는 결과가 인간에서 입증되었고, 예를 들면, rFVIIIFc는 A형 혈우병 환자에서 애드베이트(ADVATE)(등록상표)와 비교하여 최대 약 1.7배로 반감기를 개선하는 것으로 보고되었다. 상기 문헌 참조. 따라서, 반감기 증가는, 약간의 개선에도 불구하고, 다른 T1/2 제한 인자의 존재를 나타낼 수 있다. 문헌[Liu, T. *et al.*, 2007 ISTH 회의, 초록 #P-M-035; Henrik, A. *et al.*, 2011 ISTH 회의, 초록 #P=MO-181; Liu, T. *et al.*, 2011 ISTH 회의, 초록 #P-WE-131]을 참조한다.

[0002] 혈장 폰 빌레브란트 인자(von Willebrand Factor: VWF)는 대략 12시간(9시간 내지 15시간 범위)의 반감기를 갖는다. http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/vwd/2_scientificoverview.htm(2011년 10월 22일 최종 방문). VWF 반감기는 다수의 인자에 의해 영향을 받을 수 있다: 글라이코실화 패턴, ADAMTS-13(트롬보스폰딘 모티프-13을 갖는 메탈로프로테아제 및 디스인테그린) 및 VWF에서의 다양한 돌연변이.

[0003] 혈장에서, FVIII 중 95-98%는 전장 VWF와의 친밀한 비공유 복합체로 순환한다. 이 복합체의 형성은 생체내 FVIII의 적절한 혈장 수치의 유지에 중요하다. Lenting *et al., Blood.* 92(11): 3983-96 (1998); Lenting *et al., J. Thromb. Haemost.* 5(7): 1353-60 (2007). 전장 야생형 FVIII은 중쇄(MW 200kD) 및 경쇄(MW 73kD)를 갖는 이종이합체로서 대부분 존재한다. FVIII이 중쇄에서의 372번 및 740번 위치 및 경쇄에서의 1689번 위치에서의 단백분해로 인해 활성화될 때, FVIII에 결합된 VWF는 활성화 FVIII로부터 제거된다. 활성화 FVIII은, 활성화 IX 인자, 칼슘 및 인지질("테나세 복합체")과 함께, X 인자의 활성화를 유도하여, 다량의 트롬빈을 생성시킨다. 결국, 트롬빈은 이후 피브리노겐을 개열시켜 가용성 피브린 단량체를 형성시키고, 이 단량체는 이후 자발적으로 중합하여 가용성 피브린 중합체를 형성한다. 트롬빈은 또한 XIII 인자를 활성화시키고, 이는 칼슘과 함께 가용성 피브린 중합체를 가교결합시키고 안정화시켜, 가교결합된(불용성) 피브린을 형성하도록 작용한다. 활성화 FVIII은 단백분해에 의한 순환으로부터 신속히 청소된다.

[0004] 빈번한 투약 및 투약 스케줄에 의해 발생한 불편함으로 인해, 덜 빈번한 투여를 요하는 FVIII 제품, 즉 1.5배 내지 2배 반감기 제한보다 긴 반감기를 갖는 FVIII 제품을 개발하고자 하는 수요가 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0005] 본 발명은 (ⅰ) 폰 빌레브란트 인자(VWF)의 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 VWF 단편, (ii) XTEN 서열 및 (iii) FVIII 단백질을 포함하는 키메라 단백질에 관한 것이되, 여기서 VWF 단편 및 XTEN 서열은 임의의 링커에 의해 연결되고, VWF 단편 또는 XTEN 서열은 FVIII 단백질에 연결되거나 이것과 회합된다(associated). 키메라

단백질은 VWF 단편, XTEN 서열 및 FVIII 단백질을 포함하는 단일 폴리펩타이드 사슬 또는 2개의 폴리펩타이드 사슬을 포함할 수 있고, 제1 사슬은 VWF 단편을 포함하며, 제2 사슬은 FVIII 단백질을 포함하고, XTEN 폴리펩타이드는 VWF 단편 또는 FVIII 단백질 중 어느 하나에 연결된다.

[0006] 일 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은,

[0007] (a) V-X-FVIII,

[0008] (b) FVIII-X-V,

[0009] (c) V-X:FVIII,

[0010] (d) X-V:FVIII,

[0011] (e) FVIII:V-X, 또는

[0012] (f) FVIII:X-V

[0013] 를 포함하는 식을 포함하되,

[0014] 식 중, V는 VWF 단편을 포함하고,

[0015] X는 하나 이상의 XTEN 서열을 포함하며,

[0016] FVIII은 FVIII 단백질을 포함한다. 하이픈(-)은 펩타이드 결합 또는 링커, 예를 들면, 개열 가능한 링커일 수 있고, 콜론(:)은 폴리펩타이드 사이의 화학적 회합 또는 물리적 회합, 예를 들면 공유 또는 비공유 결합을 나타낸다.

[0017] 또 다른 실시형태에서, 키메라 단백질은 (iv) VWF 단편, XTEN 서열, FVIII 단백질 또는 이들의 임의의 조합에 연결된 면역글로불린(Ig) 불변 구역 또는 이의 일부(또한 F1 또는 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부로 표시됨)를 추가로 포함한다. 다른 실시형태에서, 키메라 단백질은 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(또한 F2 또는 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부로 표시됨)를 추가로 포함한다. 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 VWF 단편 또는 XTEN 서열에 연결될 수 있고, 제2 Ig 불변 구역은 FVIII 단백질에 연결될 수 있다. 제1 Ig 불변 구역, 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부 또는 둘 다는 FVIII 단백질의 반감기를 연장시킬 수 있다.

[0018] 몇몇 실시형태에서, 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(F2)는 링커, 예를 들면, 처리 가능한 링커에 의해 VWF 단편에 연결된다. 다른 실시형태에서, 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(F2)는 (제1) Ig 불변 구역 또는 이의 일부(F1)와 회합된다. 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(F2) 및 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(F1)는 동일하거나 상이할 수 있다. 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 공유 결합, 예를 들면, 이황화 결합에 의해 Ig 불변 구역 또는 이의 일부와 회합될 수 있다. 또한, 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 연결된 VWF 단편은 비공유 결합에 의해 제2 Fc 구역에 연결된 FVIII 단백질과 회합될 수 있다. 소정의 실시형태에서, FVIII 단백질은 FVIII 단백질의 C 말단 또는 N 말단에 연결되거나 FVIII 단백질 내의 하나 이상의 아미노산(예를 들면, 하나 이상의 XTEN 삽입 자리)의 바로 하류에 삽입된 하나 이상의 추가의 XTEN 서열을 추가로 포함할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, FVIII 단백질의 반감기는 야생형 FVIII 또는 VWF 단편이 없는 FVIII 단백질과 비교하여 연장된다.

[0019] 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은,

[0020] (g) V-L2-X-L1-F1:FVIII-L3-F2;

[0021] (h) V-L2-X-L1-F1:F2-L3-FVIII;

[0022] (i) F1-L1-X-L2-V:FVIII-L3-F2;

[0023] (j) F1-L1-X-L2-V:F2-L3-FVIII;

[0024] (k) V-L2-X-L1-F1-L4-FVIII-L3-F2;

[0025] (l) F2-L3-FVIII-L4-F1-L1-X-L2-V;

[0026] (m) FVIII-L3-F2-L4-V-L2-X-L1-F1; 또는

[0027] (n) F1-L1-X-L2-V-L4-F2-L3-FVIII

[0028] 을 포함하는 식을 포함하되,

[0029] 식 중, V는 VWF 단편을 포함하고,

[0030] L1, L2 및 L3은 각각 임의의 링커, 예를 들면, 개열 가능한 링커를 포함하며,

[0031] L4는 임의의 링커, 예를 들면, 처리 가능한 링커이고,

[0032] FVIII은 FVIII 단백질을 포함하며,

[0033] X는 하나 이상의 XTEN 서열을 포함하고,

[0034] F1은 임의의 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 포함하며,

[0035] F2는 임의의 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 포함하고,

[0036] (:)은 공유 결합 또는 비공유 결합이다.

[0037] 본 발명은 또한 (i) FVIII 단백질, (ii) XTEN 서열 및 (iii) Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 포함하는 키메라 단백질에 관한 것이되, 여기서 XTEN 서열은 FVIII 단백질의 N 말단 또는 C 말단에서 임의의 링커에 의해 FVIII 단백질에 연결되거나 FVIII 단백질 내의 하나 이상의 아미노산(예를 들면, 하나 이상의 삽입 자리)의 바로 하류에 삽입되고, Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 FVIII 단백질 또는 XTEN 서열에 연결되거나 이것과 회합된다. 일 실시형태에서, 키메라 단백질에 유용한 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 제1 Fc 구역을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 키메라 단백질은 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 추가로 포함한다. 본 발명에 유용한 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는, 예를 들면, 공유 결합에 의해 제1 Fc 구역에 연결되거나 이것과 회합된 제2 Fc 구역을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 제1 Fc 구역은 링커, 예를 들면, 처리 가능한 링커에 의해 제2 Fc 구역에 연결된다.

[0038] 다른 양상에서, 키메라 단백질은 (i) FVIII 단백질, (ii) XTEN 서열, (iii) VWF 단편 및 (iv) Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 포함하되, VWF의 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하되, XTEN 서열은 FVIII 단백질의 N 말단 또는 C 말단에서 임의의 링커에 의해 FVIII 단백질에 연결되거나 FVIII 단백질 내의 하나 이상의 아미노산(예를 들면, 하나 이상의 삽입 자리)의 바로 하류에 삽입되고, VWF 단편은 FVIII 단백질 또는 XTEN 서열에 연결되거나 이것과 회합되며, Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 FVIII 단백질, XTEN 서열, VWF 단편 또는 이들의 임의의 조합에 연결된다. 키메라 단백질의 비제한적인 예는,

[0039] (1) FVIII(X1)-L1-F1:V-L2-X2-L3-F2;

[0040] (2) FVIII(X1)-L1-F1:F2-L3-X2-L2-V;

[0041] (3) F1-L1-FVIII(X1):V-L2-X2-L3-F2;

[0042] (4) F1-L1-FVIII(X1):F2-L3-X2-L2-V;

[0043] (5) FVIII(X1)-L1-F1-L4-V-L2-X2-L3-F2;

[0044] (6) FVIII(X1)-L1-F1-L4-F2-L3-X2-L2-V;

[0045] (7) F1-L1-FVIII(X1)-L4-V-L2-X2-L3-F2; 또는

[0046] (8) F1-L1-FVIII(X1)-L4-F2-L3-X2-L2-V

[0047] 를 포함하는 식을 포함할 수 있되,

[0048] 식 중, FVIII(X1)은 FVIII 단백질 및 하나 이상의 XTEN 서열을 포함하고, 하나 이상의 XTEN 서열은 FVIII 단백질의 N 말단 또는 C 말단에 연결되거나 FVIII 단백질 내의 하나 이상의 아미노산(예를 들면, 하나 이상의 XTEN 삽입 자리)의 바로 하류에 삽입되며;

[0049] L1, L2 또는 L3은 각각 임의의 링커, 예를 들면, 개열 가능한 링커를 포함하고;

[0050] L4는 링커, 처리 가능한 링커이며;

[0051] X2는 하나 이상의 XTEN 서열을 포함하고;

[0052] F1은 Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 포함하며;

[0053] F2는 임의의 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 포함하고;

[0054] V는 VWF 단편을 포함하며;

[0055] (-)는 펩타이드 결합 또는 하나 이상의 아미노산이고;

[0056] (:)은 공유 결합 또는 비공유 결합을 포함한다.

[0057] 본 발명의 일 양상은 키메라 단백질에 유용한 VWF 단편이 VWF 청소 수용체(clearance receptor)에 결합하지 않아서, FVIII 단백질과 내인성 VWF와의 상호작용을 방지하거나 억제한다는 것이다. VWF 단편을 포함하는 키메라 단백질은 따라서 감소된 청소를 갖거나 VWF 청소 경로를 통해 청소되지 않는다는 것이다. 본 발명의 또 다른 양상은 VWF 단편이 하나 이상의 프로테아제 개열로부터 FVIII 단백질을 보호하거나, 활성화로부터 FVIII 단백질을 보호하거나, FVIII 단백질의 중쇄 및/또는 경쇄를 안정화시키거나, 하나 이상의 스캐빈저 수용체에 의한 FVIII 단백질의 청소를 방지할 수 있다는 것이다.

[0058] FVIII 단백질과 내인성 VWF와의 상호작용을 방지하거나 억제하는 VWF 단편의 능력으로 인해, FVIII 단백질의 반감기는 VWF 단편이 없는 FVIII 단백질과 비교하여 연장된다. 일 실시형태에서, FVIII 단백질의 반감기는 야생형 FVIII보다 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 적어도 약 11배 또는 적어도 약 12배 길게 연장된다. 또 다른 실시형태에서, FVIII 단백질의 반감기는 적어도 약 10시간, 적어도 약 11시간, 적어도 약 12시간, 적어도 약 13시간, 적어도 약 14시간, 적어도 약 15시간, 적어도 약 16시간, 적어도 약 17시간, 적어도 약 18시간, 적어도 약 19시간, 적어도 약 20시간, 적어도 약 21시간, 적어도 약 22시간, 적어도 약 23시간, 적어도 약 24시간, 적어도 약 36시간, 적어도 약 48시간, 적어도 약 60시간, 적어도 약 72시간, 적어도 약 84시간, 적어도 약 96시간 또는 적어도 약 108시간이다.

[0059] 키메라 단백질에 유용한 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 임의의 링커, 예를 들면, 개열 가능한 링커에 의해 VWF 단편에 연결된 제1 Fc 구역을 포함한다. 키메라 단백질은 임의의 링커에 의해 FVIII 단백질 또는 XTEN 서열, Ig 불변 구역 또는 이의 일부, VWF 단편 또는 이들의 임의의 조합에 연결된 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 추가로 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 임의의 링커에 의해 FVIII 단백질에 연결된다. 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 제2 Fc 구역을 포함할 수 있다.

[0060] 본 발명에 유용한 Ig 불변 구역 또는 이의 일부 및 본 발명에 유용한 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 동일하거나 상이하다.

[0061] 몇몇 양상에서, FVIII 단백질은 FVIII 단백질의 C 말단 또는 N 말단에서 XTEN 서열에 연결되거나 성숙 네이티브 인간 FVIII 내의 하나 이상의 아미노산(예를 들면, 하나 이상의 삽입 자리)의 바로 하류에 삽입되거나 이들의 임의의 조합이다. FVIII 단백질 내의 하나 이상의 삽입 자리는 A1 도메인, a1 산성 구역, A2 도메인, a2 산성 구역, A3 도메인, B 도메인, C1 도메인, C2 도메인 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 FVIII 단백질의 하나 이상의 도메인 내에 또는 A1 도메인과 a1 산성 구역, a1 산성 구역과 A2 도메인, A2 도메인과 a2 산성 구역, a2 산성 구역과 B 도메인, B 도메인과 A3 도메인, A3 도메인과 C1 도메인, C1 도메인과 C2 도메인 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 FVIII 단백질의 하나 이상의 도메인 사이에 또는 A1 도메인과 a1 산성 구역, a1 산성 구역과 A2 도메인, A2 도메인과 a2 산성 구역, a2 산성 구역과 B 도메인, B 도메인과 A3 도메인, A3 도메인과 C1 도메인, C1 도메인과 C2 도메인 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 FVIII 단백질의 2개의 도메인 사이에 위치할 수 있다.

[0062] 일 실시형태에서, 하나 이상의 삽입 자리는 표 7, 8, 9, 10, 11 또는 이들의 임의의 조합의 아미노산 잔기로 이루어진 군으로부터 선택된 성숙 네이티브 인간 FVIII(예를 들면, 서열 번호 4[성숙 FVIII 서열-전장]) 내의 하나 이상의 아미노산의 바로 하류에 위치한다.

[0063] 또 다른 실시형태에서, 하나 이상의 삽입 자리는 성숙 네이티브 인간 FVIII의 하나 이상의 허용성 루프에 위치한다. 다른 실시형태에서, 하나 이상의 삽입 자리는 성숙 네이티브 인간 FVIII의 a3 구역에 위치한다. 예를 들면, XTEN 서열은 서열 번호 4(전장 성숙 FVIII)에 상응하는 1656번 아미노산의 바로 하류에 삽입될 수 있다. 다른 실시형태에서, FVIII 단백질은 적어도 2개의 XTEN 서열에 연결되고, 제1 XTEN 서열은 a3 구역 내에 삽입되고, 제2 XTEN 서열은 FVIII 단백질에서 허용성 루프(예를 들면, A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 또는 A3-2) 내에 삽입된다. 또 다른 실시형태에서, FVIII 단백질은 적어도 3개의 XTEN 서열에 연결되고, 제1 XTEN 서열은 a3 구역 내에 삽입되고, 제2 XTEN 서열 및 제3 XTEN 서열은 FVIII 단백질에서 1개 또는 2개의 허용성 루프(예를 들면, A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 또는 A3-2) 내에 삽입된다.

[0064] 소정의 실시형태에서, 하나 이상의 XTEN 삽입에 대한 하나 이상의 삽입 자리는 (성숙 FVIII 서열에 대해 넘버링된) 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산의 바로 하류에 있다:

[0065] (1) 3번 아미노산, (2) 18번 아미노산, (3) 22번 아미노산,

[0066] (4) 26번 아미노산, (5) 32번 아미노산, (6) 40번 아미노산,

[0067] (7) 60번 아미노산, (8) 65번 아미노산, (9) 81번 아미노산,

[0068] (10) 116번 아미노산, (11) 119번 아미노산, (12) 130번 아미노산,

[0069] (13) 188번 아미노산, (14) 211번 아미노산, (15) 216번 아미노산,

[0070] (16) 220번 아미노산, (17) 224번 아미노산, (18) 230번 아미노산,

[0071] (19) 333번 아미노산, (20) 336번 아미노산, (21) 339번 아미노산,

[0072] (22) 375번 아미노산, (23) 399번 아미노산, (24) 403번 아미노산,

[0073] (25) 409번 아미노산, (26) 416번 아미노산, (26) 442번 아미노산,

[0074] (28) 487번 아미노산, (29) 490번 아미노산, (30) 494번 아미노산,

[0075] (31) 500번 아미노산, (32) 518번 아미노산, (33) 599번 아미노산,

[0076] (34) 603번 아미노산, (35) 713번 아미노산, (36) 745번 아미노산,

[0077] (37) 1656번 아미노산, (38) 1711번 아미노산, (39) 1720번 아미노산,

[0078] (40) 1725번 아미노산, (41) 1749번 아미노산, (42) 1796번 아미노산,

[0079] (43) 1802번 아미노산, (44) 1827번 아미노산, (45) 1861번 아미노산,

[0080] (46) 1896번 아미노산, (47) 1900번 아미노산, (48) 1904번 아미노산,

[0081] (49) 1905번 아미노산, (50) 1910번 아미노산, (51) 1937번 아미노산,

[0082] (52) 2019번 아미노산, (53) 2068번 아미노산, (54) 2111번 아미노산,

[0083] (55) 2120번 아미노산, (56) 2171번 아미노산, (57) 2188번 아미노산,

[0084] (58) 2227번 아미노산, (59) 2277번 아미노산, 및

[0085] (60) 이들의 2개 이상의 조합.

[0086] 몇몇 실시형태에서, 하나의 XTEN은 FVIII 단백질에서 삽입된다. 몇몇 실시형태에서, 2개의 XTEN은 FVIII 단백질에서 삽입된다. 몇몇 실시형태에서, 3개의 XTEN은 FVIII 단백질에서 삽입된다.

[0087] 특정한 예에서, 제1 XTEN은 서열 번호 4(전장 성숙 FVIII)에 상응하는 26번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1720번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 또 다른 예에서, 제1 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 403번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1720번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 몇몇 예에서, 제1 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1656번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1720번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 다른 예에서, 제1 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 26번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1656번 아미노산의 바로 하류에 삽입되며, 제3 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1720번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 또 다른 실시형태에서, 제1 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 403번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1656번 아미노산의 바로 하류에 삽입되며, 제3 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1720번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 또 다른 실시형태에서, 제1 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 403번 아미노산과 404번 아미노산 사이에 삽입되고, 제2 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1656번 아미노산의 바로 하류에 삽입되며, 제3 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1720번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 소정의 실시형태에서, 제1 XTEN은 서열 번호 4(전장 성숙 FVIII)에 상응하는 26번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1720번 아미노산의 바로 하류에 삽입되며, 제3 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1900번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 몇몇 실시형태에서, 제1 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 26번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN은 서열 번호 2에 상응하는 1656번 아미노산의 바로 하류에 삽입되며, 제3

XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1720번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제4 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1900번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 또 다른 예에서, XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 745번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 추가의 예에서, 제1 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1656번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1900번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 몇몇 실시형태에서, 제1 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 26번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1656번 아미노산의 바로 하류에 삽입되며, 제3 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1900번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 또 다른 예에서, 제1 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 403번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 745번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 몇몇 실시형태에서, 제1 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 745번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1900번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 몇몇 실시형태에서, 제1 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 18번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 745번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다.

[0088] 몇몇 실시형태에서, FVIII 단백질은 이중 사슬 FVIII 동형(isoform)이다. 몇몇 실시형태에서, FVIII 단백질은 단일 사슬 FVIII 동형이다.

[0089] 몇몇 실시형태에서, 삽입된 XTEN은 서열 번호 39(AE288)이다. 몇몇 예에서, 삽입된 XTEN은 서열 번호 38 및 서열 번호 37(AG144 및 AE144)이다. 몇몇 예에서, 삽입된 XTEN은 서열 번호 37, 서열 번호 38 및 서열 번호 37(AE144, AG144 및 AE144)이다. 몇몇 실시형태에서. 삽입된 XTEN은 서열 번호 37 및 서열 번호 40(AE144 및 AE288)이다. 몇몇 실시형태에서, 삽입된 XTEN은 AE42(서열 번호 36), AE72(서열 번호 127), AE144_2A(서열 번호 128), AE144_3B(서열 번호 129), AE144_4A(서열 번호 130), AE144_5A(서열 번호 131), AE144_6B(서열 번호 132), AG144_A(서열 번호 133), AG144_B(서열 번호 134), AG144_C(서열 번호 135), AG144_F(서열 번호 136), AE864(서열 번호 43), AE576(서열 번호 41), AE288(서열 번호 39), AE288_2(서열 번호 137), AE144(서열 번호 37), AG864(서열 번호 44), AG576(서열 번호 42), AG288(서열 번호 40), AG144(서열 번호 38) 및 이들의 임의의 조합이다.

[0090] 본 발명에 유용한 FVIII 단백질은 B 도메인 또는 이의 일부, 예를 들면, SQ B 도메인 결실 FVIII을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, FVIII 단백질은 단일 사슬 FVIII을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 단일 사슬 FVIII은 전장 성숙 VIII 인자 폴리펩타이드(서열 번호 4)의 1648번 잔기, 1645번 잔기 또는 둘 다, 또는 SQ BDD VIII 인자(서열 번호 6)의 754번 잔기, 751번 잔기 또는 둘 다에 상응하는 잔기에서 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다. 다른 실시형태에서, 아미노산 치환은 아르기닌 이외의 아미노산이다. 몇몇 실시형태에서, FVIII 단백질은 FVIII의 중쇄 및 FVIII의 경쇄를 포함하고, 중쇄 및 경쇄는 금속 결합에 의해 서로 회합된다.

[0091] FVIII 단백질은, 예를 들면 저밀도 지단백 수용체 관련 단백질(LRP)에 대한 친화도를 낮추거나 이에 대한 결합을 제거하는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함함으로써, LRP에 대해 낮은 친화도를 가질 수 있거나 이에 결합하지 않을 수 있다. 이러한 적어도 하나의 아미노산 치환은 전장 성숙 FVIII의 471번 잔기, 484번 잔기, 487번 잔기, 490번 잔기, 497번 잔기, 2092번 잔기, 2093번 잔기 또는 이들의 2개 이상의 조합에 상응하는 잔기에 있을 수 있다. 특정한 실시형태에서, 471번, 484번 또는 497번 잔기에서의 아미노산 치환은 아르기닌 이외의 아미노산이거나, 487번 잔기에서의 아미노산 치환은 타이로신 이외의 아미노산이거나, 2092번 잔기에서의 아미노산 치환은 라이신 이외의 아미노산이거나, 2093번 잔기에서의 아미노산 치환은 페닐알라닌 이외의 아미노산이다.

[0092] 몇몇 실시형태에서, FVIII 단백질은 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하고, 이는 치환이 없는 FVIII 단백질보다 FVIII 단백질이 더 안정하도록 유도한다. 이러한 치환은, 예를 들면, 전장 성숙 FVIII의 664번 잔기, 1826번 잔기, 662번 잔기, 1828번 잔기 또는 이들의 2개 이상의 조합에 상응하는 잔기에서 FVIII 단백질의 A2 도메인 및 A3 도메인에 위치할 수 있다.

[0093] 본 발명에 유용한 VWF 단편은 FVIII에 함께 결합할 수 있는 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함한다. VWF 단편은 서열 번호 2의 764번 내지 866번 아미노산과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 D' 도메인의 아미노산 서열 및/또는 서열 번호 2의 867번 내지 1240번 아미노산과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 D3 도메인의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, VWF 단편은 단량체이다. 또 다른 실시형태에서, VWF 단편은 적어도 2개의 VWF 단편, 적어도 3개의 VWF 단편, 적어도 4개의 VWF 단편, 적어도 5개의 VWF 단편 또는 적어도 6개의 VWF 단편을 포함한다. 일 실시형태에서, 2개 이상의 VWF 단편은 동일할 수 있거나 상이할 수 있다. VWF 단편은 서열 번호 2의 764번 내지 1240번 아미노산과 적어도 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산을 포함할 수 있다. VWF 단편은 서열 번호 2의 764번 내지 1240번 아

미노산으로 실질적으로 이루어지거나 이것으로 이루어질 수 있다. 소정의 실시형태에서, VWF 단편은 서열 번호 2의 1099번 잔기, 1142번 잔기, 또는 1099번 잔기 및 1142번 잔기 둘 다에 상응하는 잔기에서 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, VWF 단편은 VWF의 D1 도메인, D2 도메인, 또는 D1 도메인 및 D2 도메인을 추가로 포함한다.

[0094] VWF 단편은 A1 도메인, A2 도메인, A3 도메인, D4 도메인, B1 도메인, B2 도메인, B3 도메인, C1 도메인, C2 도메인, CK 도메인, 이들의 하나 이상의 단편 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 VWF 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면, VWF 단편은 (1) VWF의 D' 및 D3 도메인 또는 이의 단편; (2) VWF의 D1, D' 및 D3 도메인 또는 이의 단편; (3) VWF의 D2, D' 및 D3 도메인 또는 이의 단편; (4) VWF의 D1, D2, D' 및 D3 도메인 또는 이의 단편; 또는 (5) VWF의 D1, D2, D', D3 및 A1 도메인 또는 이의 단편으로 실질적으로 이루어지거나 이것으로 이루어질 수 있다. 몇몇 실시형태에서, VWF 단편은 VWF 단편에 작동적으로 연결된 FVIII 또는 VWF의 신호 펩타이드를 추가로 포함한다.

[0095] 본 발명에 유용한 하나 이상의 링커는 적어도 약 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 110개, 120개, 130개, 140개, 150개, 160개, 170개, 180개, 190개, 200개, 210개, 220개, 230개, 240개, 250개, 300개, 350개, 400개, 450개, 500개, 550개, 600개, 650개, 700개, 750개, 800개, 850개, 900개, 950개, 1000개, 1200개, 1400개, 1600개, 1800개 또는 2000개의 아미노산의 길이를 갖는다. 몇몇 실시형태에서, 하나 이상의 링커는 약 1개 내지 약 2000개의 아미노산의 길이를 갖는다. 일 실시형태에서, 하나 이상의 링커는 적어도 약 20개, 35개, 42개, 48개, 73개, 75개, 95개, 98개, 144개, 288개, 324개, 333개, 576개 또는 864개의 아미노산의 길이를 갖는다. 또 다른 실시형태에서, 하나 이상의 링커는 gly/ser 펩타이드, XTEN 서열 또는 둘 다를 포함한다. gly/ser 펩타이드의 예는 $(Gly_4Ser)_n$(서열 번호 139) 또는 $S(Gly_4Ser)_n$(서열 번호 140)(식 중, n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 10으로 이루어진 군으로부터 선택된 양의 정수임)의 식을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 예를 들면, $(Gly_4Ser)_n$ 링커는 $(Gly_4Ser)_3$(서열 번호 63) 또는 $(Gly_4Ser)_4$(서열 번호 138)일 수 있다. 일 실시형태에서, 링커는 링커의 N 말단에서 적어도 하나의 제1 개열 자리, 링커의 C 말단에서 적어도 하나의 제2 개열 자리 또는 둘 다를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 링커는 20개의 아미노산, 35개의 아미노산, 48개의 아미노산, 73개의 아미노산 또는 95개의 아미노산 트롬빈 개열 가능한 링커를 포함한다. 개열 가능한 링커는 XIa 인자, XIIa 인자, 칼리크레인, VIIa 인자, IXa 인자, Xa 인자, IIa 인자(트롬빈), 엘라스타제-2, 그랜자임-B, TEV, 엔테로키나제, 프로테아제 3C, 소타제 A, MMP-12, MMP-13, MMP-17 및 MMP-20, 예를 들면, TLDPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEEK(서열 번호 8)로 이루어진 군으로부터 선택된 프로테아제에 의해 하나 이상의 개열 자리를 포함할 수 있다. 하나 이상의 개열 자리의 비제한적인 예는 RRRR(서열 번호 9), RKRRKR(서열 번호 10), RRRRS(서열 번호 11), TQSFNDFTR(서열 번호 12), SVSQTSKLTR(서열 번호 13), DFLAEGGGVR(서열 번호 14), TTKIKPR(서열 번호 15), LVPRG(서열 번호 16), ALRPR(서열 번호 17), KLTRAET(서열 번호 18), DFTRVVG(서열 번호 19), TMTRIVGG(서열 번호 20), SPFRSTGG(서열 번호 21), LQVRIVGG(서열 번호 22), PLGRIVGG(서열 번호 23), IEGRTVGG(서열 번호 24), LTPRSLLV(서열 번호 25), LGPVSGVP(서열 번호 26), VAGDSLEE(서열 번호 27), GPAGLGGA(서열 번호 28), GPAGLRGA(서열 번호 29), APLGLRLR(서열 번호 30), PALPLVAQ(서열 번호 31), ENLYFQG(서열 번호 32), DDDKIVGG(서열 번호 33), LEVLFQGP(서열 번호 34) 및 LPKTGSES(서열 번호 35)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 제1 개열 자리 및 제2 개열 자리는 동일하거나 상이하다.

[0096] 본 발명에 유용한 XTEN 서열은 AE42(서열 번호 36), AE144(서열 번호 37), AG144(서열 번호 38), AE288(서열 번호 39), AG288(서열 번호 40), AE576(서열 번호 41). AG576(서열 번호 42), AE864(서열 번호 43), AE72(서열 번호 127), AE144_2A(서열 번호 128), AE144_3B(서열 번호 129), AE144_4A(서열 번호 130), AE144_5A(서열 번호 131), AE144_6B(서열 번호 132), AG144_A(서열 번호 133), AG144_B(서열 번호 134), AG144_C(서열 번호 135), AG144_F(서열 번호 136), AE288_2(서열 번호 137) 또는 AG864(서열 번호 44)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 특정한 실시형태에서, XTEN 서열은 AE288 또는 AG288을 포함한다.

[0097] 본 발명의 키메라 단백질은 폴리시알릴화, 페길화 또는 헤실화될 수 있다.

[0098] 본 발명은 또한 키메라 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 일련의 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이다. 폴리뉴클레오타이드는 PC5 또는 PC7을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 사슬을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명은 또한 폴리뉴클레오타이드 또는 일련의 폴리뉴클레오타이드 및 폴리뉴클레오타이드 또는 일련의 폴리뉴클레오타이드에 작동적으로 연결된 하나 이상의 프로모터를 포함하는 벡터에 관한 것이다. 벡터는 PC5 또는 PC7을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 사슬을 포함하는 추가의 벡터를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명은 또한 폴리뉴클레오

타이드 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 숙주 세포는 포유동물 세포, 예를 들면, HEK293 세포, CHO 세포 또는 BHK 세포일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 숙주 세포의 PC5 또는 PC7은 VWF의 D1D2 도메인을 개열시킨다.

[0099] 본 발명은 또한 키메라 단백질, 폴리뉴클레오타이드, 벡터 또는 숙주 세포 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 따라서 야생형 FVIII 단백질과 비교하여 연장된 반감기를 갖는다. FVIII 단백질의 반감기는 야생형 FVIII보다 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 적어도 약 11배 또는 적어도 약 12배 길게 연장된다. VIII 인자의 반감기는 적어도 약 17시간, 적어도 약 18시간, 적어도 약 19시간, 적어도 약 20시간, 적어도 약 21시간, 적어도 약 22시간, 적어도 약 23시간, 적어도 약 24시간, 적어도 약 25시간, 적어도 약 26시간, 적어도 약 27시간, 적어도 약 28시간, 적어도 약 29시간, 적어도 약 30시간, 적어도 약 31시간, 적어도 약 32시간, 적어도 약 33시간, 적어도 약 34시간, 적어도 약 35시간, 적어도 약 36시간, 적어도 약 48시간, 적어도 약 60시간, 적어도 약 72시간, 적어도 약 84시간, 적어도 약 96시간 또는 적어도 약 108시간이다.

[0100] 본 발명의 조성물은 국소 투여, 안내 투여, 비경구 투여, 척추강내 투여, 경막하 투여 및 경구 투여로 이루어진 군으로부터 선택된 경로에 의해 투여될 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 조성물은 비경구 투여, 예를 들면, 정맥내 또는 피하 투여를 통해 투여된다. 본 발명의 조성물은 출혈 질환 또는 병증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 출혈 질환 또는 병증을 치료하는 데 유용하다. 출혈 질환 또는 병증은 출혈 응고 장애, 관절혈증, 근육 출혈, 구강내 출혈, 출혈, 근육으로의 출혈, 경구 출혈, 외상, 외상 백선, 위장관 출혈, 두개내 출혈, 복강내 출혈, 흉내 출혈, 골절, 중추 신경계 출혈, 인두후강에서의 출혈, 복막강에서의 출혈, 장요근초에서의 출혈 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일 실시형태에서, 키메라 단백질로 치료된 대상체는 수술 예정이다. 또 다른 실시형태에서, 치료는 예방학적 또는 수요대응형(on-demand)이다.

[0101] 본 발명은 또한 FVIII 단백질과 내인성 VWF의 결합을 방지하거나 억제하는 방법으로서, 유효량의 키메라 단백질, 폴리뉴클레오타이드 벡터, 숙주 세포 또는 조성물을 이러한 방지 또는 억제를 필요로 하는 대상체에 첨가하는 단계를 포함하되, VWF 단편은 FVIII 단백질에 결합하여 내인성 VWF의 결합을 방지하거나 억제하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 추가로 FVIII 단백질의 반감기를 연장시키거나 증가시키는 방법으로서, 유효량의 키메라 단백질, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 숙주 세포 또는 조성물을 이러한 연장 또는 증가를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하되, VWF 단편은 FVIII 단백질에 결합하여 FVIII 단백질의 반감기를 연장시키거나 증가시키는 방법에 관한 것이다. 세포로부터 FVIII 단백질의 청소를 방지하거나 치료하는 방법으로서, 유효량의 키메라 단백질, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 숙주 세포 또는 조성물을 FVIII 단백질 또는 FVIII 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포에 투여하는 단계를 포함하고, VWF 활성을 갖는 단백질은 FVIII 단백질에 결합하는 방법이 또한 제공된다. 본 방법에서 유용한 대상체는 동물, 예를 들면, 인간, 예를 들면, A형 혈우병을 앓는 환자이다.

[0102] 본 발명은 또한 유효량의 키메라 단백질, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 숙주 세포 또는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 이를 필요로 하는 대상체에서 출혈 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하되, 여기서 출혈 질환 또는 장애는 출혈 응고 장애, 관절혈증, 근육 출혈, 구강내 출혈, 출혈, 근육으로의 출혈, 경구 출혈, 외상, 외상 백선, 위장관 출혈, 두개내 출혈, 복강내 출혈, 흉내 출혈, 골절, 중추 신경계 출혈, 인두후강에서의 출혈, 복막강에서의 출혈 및 장요근초에서의 출혈로 이루어진 군으로부터 선택된다. 치료는 예방학적 또는 수요대응형일 수 있다. 일 실시형태에서, 유효량은 0.1㎍/kg 내지 500㎎/kg이다.

[0103] 본 발명은 또한 하나 이상의 숙주 세포를 폴리뉴클레오타이드 또는 벡터로 형질감염시키는 단계 및 숙주 세포에서 키메라 단백질을 발현시키는 단계를 포함하는 키메라 단백질의 제조 방법을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0104] 도 1A 내지 도 1D. VWF 단편의 개략적 다이어그램. 도 1A는 본 발명에 유용한 3개의 예시적인 VWF 단편, 예를 들면, VWF-002, VWF-010 및 VWF-013을 나타낸다. VWF-002는 서열 번호 124의 1번 내지 477번 아미노산(서열 번호 2의 764번 내지 1240번 아미노산)을 포함하고, 프리/프로펩타이드 서열 없이 합성된다. VWF-010은 D'D3 도메인 이외에 D1D2 도메인을 포함한다. VWF-013은 서열 번호 123의 336번 및 379번 잔기에서 시스테인을 치환하는 알라닌 잔기 이외에 D1D2D'D3 도메인을 포함한다. 도 1B는 개열 가능한 링커, 예를 들면, 48개의 아미노산 트롬빈 개열 가능한 링커에 의해 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 융합된 D1D2D'D3 도메인, 예를 들면, Fc 구역을 포함하는 VWF-031을 나타낸다. 도 1C는 pLIVE 벡터에 포함된 D1D2D'D3 도메인을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열인,

VWF-025, 및 pLIVE 벡터에서 2개의 아미노산 치환, C336A 및 C379A를 갖는 D1D2D'D3 도메인을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열인, VWF-029를 나타낸다. 도 1D는 프로펩타이드(D1 및 D2 도메인) 및 성숙 아단위(D', D3, A1, A2, A3, D4, B1-3, C1-2 도메인)를 포함하는 전장 VWF 단편을 나타낸다. VWF 단편은 약 250kDa의 단백질이고, 이황화 결합에 의해 다합체(20MDa 초과)를 형성한다. VWF 단편은 비공유 복합체로 FVIII(95-98%)과 회합되고, 이후 프로테아제 개열/활성화로부터 FVIII을 보호하며, 중쇄 및 경쇄를 안정화시키고, 스캐빈저 수용체에 의한 FVIII의 청소를 방지함으로써 FVIII의 반감기를 연장시킨다. VWF 단편은 또한 VWF 수용체를 통한 FVIII-VWF 복합체의 청소에 의해 및 음세포작용을 방지함으로써 및 rFVIIIFc를 재순환시킴으로써 FVIII의 반감기를 제한할 수 있다.

도 2. VWF D'D3 발현 마우스 또는 FVIII 및 VWF 이중 넉아웃(DKO) 마우스에서의 rFVIII-XTEN(rFVIII-AE288 또는 rFVIII-288AE)의 약동학적 프로필. 도 2A는 D'D3 도메인 코딩 플라스미드 DNA(VWF-025)의 유체역학 주사(hydrodynamic injection: HDI)의 시각(-5일), rFVIII-XTEN AE288의 정맥내 투약(0일) 및 PK 샘플 수집(5일)을 나타낸다. 도 2B는 D1D2D'D3 마우스에서의 rFVIII-XTEN288(역삼각형) 및 DKO 마우스에서의 rFVIII-XTEN288(다이아몬드형)의 IV 투약 후 FVIII 발색 검정에 의해 측정된 FVIII 활성을 나타낸다. 도 2C는 VWF-025의 투여 후 D'D3 혈장 수치(ng/mℓ)를 나타낸다. X 축은 hr 단위의 시간을 나타낸다.

도 3. 예시적인 VWF:FVIII 이종이합체 작제물의 개략적 다이어그램. 작제물은 FVIII-F1-L1-V-X-L2-F2 식으로 표시된 일반 구조를 갖지만, 상이한 가변 링커의 예를 포함한다. 도시된 작제물(FVIII-161)은, XTEN 서열(개열 가능한 링커 및 제2 Fc 구역에 추가로 연결됨)에 연결된 VWF의 D' 및 D3 도메인(즉, 아미노산 치환 C336A 및 C379A를 갖는 서열 번호 2의 1번 내지 477번 아미노산)인, VWF 단편 및 제1 Fc 구역에 연결된 이종이합체 FVIII(중쇄 및 경쇄는 금속 결합에 의해 회합됨)을 포함한다. FVIII-161에 포함된 XTEN 서열은 XTEN AE288 서열이고, 링커는 35개의 아미노산을 갖는 트롬빈 개열 가능한 링커이다. FVIII-161에서, 제1 Fc 구역에 연결된 FVIII 단백질은 처리 가능한 링커에 의해 VWF 단편에 연결된다. 발현 시, 처리 가능한 링커는 세포내 처리 효소에 의해 개열되어, 작제물인 3개의 폴리펩타이드 사슬이 서로 회합되게 할 수 있다.

도 4는 FVIII-VWF 이종이합체 또는 단량체 예의 개략적 다이어그램이다. FVIII-168, FVIII-175, FVIII-172, FVIII-174 및 FVIII170. 작제물 FVIII-168은 제1 Fc 구역에 연결된, 단일 사슬 FVIII 서열(1645번 및 1648번 잔기에서 아르기닌 잔기를 치환하는 알라닌 잔기를 가짐)을 포함하고, 이 구역은 이후 48개의 아미노산을 갖는 트롬빈 개열 가능한 링커에 의해 제2 Fc 구역에 연결된 VWF 단편에 융합된다. AE288 XTEN은 단일 사슬 FVIII 서열의 B 도메인에서 삽입된다. 제1 Fc 구역과 VWF 단편 사이의 연결은 세포내 처리 효소, 즉, 처리 가능한 링커에 의해 개열될 수 있는 링커를 포함한다. 작제물 FVIII-175는 AE288 XTEN 및 제1 Fc 구역(링커, 예를 들면, 처리 가능한 링커에 의해 제2 Fc 구역에 연결됨)에 연결된 (1645번 및 1648번 잔기에서 아르기닌 잔기를 치환하는 알라닌 잔기를 갖는) 단일 사슬 FVIII을 포함한다. AE288 XTEN은 단일 사슬 FVIII 서열의 B 도메인에서 삽입된다. 작제물 FVIII-172는 2개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하고, 제1 사슬은 AE288 XTEN에 융합된 중쇄 FVIII 서열을 포함하고, 제2 사슬은 경쇄 FVIII 서열, 제1 Fc 구역, 링커(예를 들면, 처리 가능한 링커), VWF 단편, 트롬빈 개열 가능한 링커(예를 들면, 48개의 아미노산) 및 제2 Fc 구역을 포함한다. 작제물 FVIII-174는 2개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하고, 제1 사슬은 AE288 XTEN에 융합된 중쇄 FVIII 서열을 포함하고, 제2 사슬은 경쇄 FVIII, 제1 Fc 구역, 링커(예를 들면, 처리 가능한 링커) 및 제2 Fc 구역을 포함한다. 작제물 FVIII-170은 VWF 단편, AE288 XTEN, 링커(예를 들면, 35개의 아미노산의 길이인 트롬빈 개열 가능한 링커) 및 단일 사슬 FVIII 서열을 포함한다.

도 5. Fc 구역과 조합된 XTEN 서열을 포함하는 FVIII/VWF 이종이합체의 약동학적 프로필. 작제물 FVIII-161, FVIII-168 및 FVIII-172를 100㎍/마우스 용량으로 유체역학 주사(HDI)에 의해 FVIII:VWF 이중 넉아웃(DKO) 마우스에 투여하였다. 작제물 FVIII-170을 50㎍/마우스 용량으로 HDI에 의해 FVIII:VWF DKO 마우스에 투여하였다. HDI 후 혈장 FVIII 활성을 HDI 후 24시간 동안 FVIII 발색 검정에 의해 평가하였다. XTEN 서열 및 Fc 도메인을 포함하는 FVIII:VWF 이종이합체의 FVIII 활성을 VWF 단편, XTEN 서열 및 Fc 도메인이 없는 BDD-FVIII의 FVIII 활성과 비교하였다.

도 6. 예시적인 FVIII-VWF 이종이합체 동시형질감염 시스템의 개략적 다이어그램. 도 6A. 작제물 FVIII-169는 Fc 구역에 연결된 전장 FVIII 서열(1645번 및 1648번 아르기닌 잔기를 치환하는 알라닌 잔기 및 단일 사슬 FVIII 서열에서 삽입된 XTEN 서열을 가짐)을 포함한다. VWF-031은 48개의 트롬빈 개열 가능한 링커에 의해 또 다른 Fc 구역에 연결된 D1D2D'D3 단편(336번 및 379번 시스테인 잔기를 치환하는 알라닌 잔기를 가짐)을 포함한다. 세포내 처리 후, 작제물 FVIII-169는 하나의 Fc 단편 및 XTEN 서열에 융합된 전장 단일 사슬 FVIII(SCFVIII)을 생성하고, 작제물 VWF-031은 또 다른 Fc 단편에 연결된 477개의 아미노산 D'D3 단편을 생성한

다. 2개의 공유 결합은 D'D3 단편 또는 SC FVIII에 연결된 Fc 단편 사이에 형성될 수 있고, 이는 결국 FVIII과 D'D3의 비공유 회합을 허용한다. 도 6B. 작제물 FVIII-173은 이종이합체 FVIII 서열, XTEN 서열에 연결된 중쇄 FVIII 서열 및 Fc 구역에 연결된 경쇄 FVIII 서열을 포함한다. VWF-031은 상기 기재되어 있다. 세포내 처리 후, 작제물 FVIII-173은 이종이합체 단백질, XTEN 서열에 융합된 중쇄 FVIII, 하나의 Fc 단편에 융합된 경쇄 FVIII을 생성하고, 작제물 VWF-031은 또 다른 Fc 단편에 연결된 477개의 아미노산 D'D3 단편을 생성한다. 2개의 공유 결합은 D'D3 단편 또는 경쇄 FVIII에 연결된 Fc 단편 사이에 형성될 수 있고, 이는 결국 FVIII과 D'D3의 비공유 회합을 허용한다.

도 7. 옥테트(Octet) 검정에서 부동화된 hVWF에 대한 XTEN 서열 및 Fc 도메인을 포함하는 예시적인 FVIII:VWF의 결합 친화도. FVIII-169/VWF-031 및 부동화된 hVWF에 융합된 FVIII-057(rFVIIIFc)에 대한 결합 친화도를 바이오레이어 간섭법(biolayer interferometry) 기반 측정(옥테트 검정)을 이용하여 시험하였다. 도 7A는 부동화된 hVWF에 대한 FVIII169 및 FVIIIFc 약물 물질(양성 대조군)의 나노몰에서의 결합 반응을 나타낸다. 도 7B는 부동화된 인간 VWF에 대한 인간 IgG1(음성 대조군)의 결합 반응을 나타낸다.

도 8. HemA 및 FVIII:VWF 이중 넉아웃(DKO) 마우스에서의 FVIII-169의 약동학적(PK) 프로필. 도 8a는 HemA 마우스에서의 FVIII-169/VWF-031 및 FVIIIFc의 PK 프로필을 나타낸다. HemA 마우스를 200IU/kg에서의 FVIII-169/VWF-031의 단일 정맥내 용량으로 시험하였다. 마우스로부터 수집된 혈장 샘플을 FVIII 발색 검정에 의해 처리하였다. FVIII-169/VWF-031의 반감기를 윈논린(WinNonlin) 프로그램을 이용하여 계산하였다. 도 8b는 FVIII/VWF DKO 마우스에서의 FVIII-169/VWF-031, FVIII-169/Fc 및 FVIIIFc의 PK 프로필을 나타낸다.

도 9. D'D3을 발현하는 FVIII/VWF DKO 마우스에서의 FVIII-XTEN 변이체의 PK 프로필. 도 9a는 1개의 XTEN을 갖는 FVIII, 2개의 XTEN을 갖는 FVIII 및 3개의 XTEN을 갖는 FVIII의 FVIII-XTEN 변이체의 PK 프로필의 비교를 나타낸다. 1개, 2개 또는 3개의 XTEN이 B 도메인 및 C 말단을 포함하는 FVIII의 다양한 부분에서 삽입된다. CT는 XTEN이 FVIII의 C 말단에 연결된다는 것을 나타낸다. 삽입 자리 B/CT는 1개의 XTEN이 FVIII 단백질의 745번 아미노산 잔기와 746번 아미노산 잔기 사이에 삽입되고, 또 다른 XTEN이 FVIII 단백질의 C 말단에 연결된다는 것을 나타낸다. 아미노산 잔기 넘버링은 SQ BDD FVIII 단백질 서열에 상응한다. 삽입 자리 1900/B/CT는 제1 XTEN이 FVIII의 1900번 아미노산 잔기와 1901번 아미노산 잔기 사이에 삽입되고, 제2 XTEN이 FVIII의 745번 아미노산 잔기와 746번 아미노산 잔기 사이에 삽입되고, 제3 XTEN이 FVIII의 C 말단에 연결된다는 것을 나타낸다. FVIII-XTEN 변이체를 투여하기 위해 사용된 마우스 균주는 D'D3 도메인을 발현하는 DKO 마우스 균주이다. 도 9b는 3개의 XTEN 삽입을 갖는 FVIII-XTEN의 PK 프로필을 나타낸다. FVIII-XTEN(1900/B/CT) 변이체를 FVIII/VWF DKO 마우스 또는 HemA 마우스 중 어느 하나에 투여하였다. FVIII-XTEN(1900/B/CT)의 반감기를 비교하였다.

도 10. 발색 검정에 의해 측정된 마우스 DKO 혈장에서의 FVIIIFc(빈 삼각형), FVIII169:Fc(채워진 원형) 및 FVIII169:VWF31(빈 삼각형)의 FVIII 활성. FVIII:Fc는 Fc 이합체에 융합된 이중 사슬 FVIII(중쇄 및 경쇄)을 포함한다(즉, 단량체-이합체 하이브리드). FVIII169는 상기 기재되어 있다(성숙 FVIII 서열에 상응하는 745번 아미노산의 바로 하류의, B 도메인에서 AE288을 포함). FVIII169:Fc는 Fc 이합체에 융합된 FVIII169를 포함한다. FVIII169:VWF31은 Fc 이합체 이외의 VWF31, 제1 Fc 구역에 융합된 FVIII169 및 제2 Fc 구역에 융합된 VWF31을 포함하고, 제1 Fc 구역 및 제2 Fc 구역은 공유 결합, 예를 들면, 하나 이상의 이황화 결합을 형성한다.

도 11. FVIII 반감기 연장에 대한 Fc, XTEN 및 VWF-D'D3 단편의 효과. BDD-FVIII(레팍토(REFACTO)(등록상표))(사각형), FVIIFc(원형), FVIII169/Fc(삼각형) 및 FVIII169/VWF031(역삼각형)을 FVIII 및 VWF 이중 넉아웃(DKO) 마우스에 투여하였다. FVIII 활성을 발색 검정에 의해 측정하고, 반감기를 윈논린-휘닉스 프로그램을 이용하여 계산하였다. X축은 시간을 나타내고, Y축은 mU/㎖ 단위의 FVIII 혈장 활성을 나타낸다.

도 12a 내지 도 12c. HemA 마우스에서 rFVIII-XTEN/VWF 이종이합체에서의 상이한 XTEN의 효과. 도 12a는, 성숙 FVIII 서열에 상응하는 745번 잔기의 바로 하류의 XTEN을 포함하는 FVIII-169와 비교하여, 성숙 FVIII 서열에 상응하는 1900번 및 1656번 잔기의 바로 하류에 삽입된 2개의 XTEN(즉, FVIII-195(이중 사슬 FVIII 동형) 및 FVIII-199(단일 사슬 FVIII 동형))의 5분 값으로 정규화된 FVIII 혈장 활성(%)을 나타낸다. FVIII-169/VWF-031(채워진 원형), FVIII-199/VWF-031(채워진 사각형) 및 FVIII-195/VWF031(빈 사각형)을 HemA 마우스에 투여하여 FVIII 혈장 활성을 측정하였다. 도 12b는 FVIII-169(B 도메인에서만 XTEN 삽입)와 비교하여 성숙 FVIII 서열에 상응하는 403번 잔기(A2 도메인) 및 745번 잔기(B 도메인)(즉, FVIII-203) 및 745번 잔기(B 도메인) 및 1900번 잔기(A3 도메인)(FVIII-204)의 바로 하류의 제2 XTEN 삽입의 반감기 연장 효과를 나타낸다. FVIII-204/VWF031(채워진 삼각형), FVIII-169/VWF-031(채워진 원형), FVIII-203/VWF-031(채워진 사각형) 및 scBDD-

FVIII(채워진 다이아몬드형)을 HemA 마우스에 투여하였다. X축은 5분 값으로 정규화된 FVIII 혈장 활성(%)을 나타내고, y축은 hr 단위의 시간을 나타낸다. 도 12c는 FVIII-169(B 도메인에서의 단일 XTEN 삽입) 및 임의의 Fc 구역 또는 임의의 XTEN이 없는 단일 사슬 FVIII(즉, FVIII-207)과 비교하여 18번 잔기(A1 도메인) 및 745번 잔기(B 도메인)의 바로 하류의 2개의 XTEN 삽입(즉, FVIII-205)의 반감기 연장 효과를 나타낸다. 도 12c는 FVIII-169(745번 잔기의 바로 하류의 단일 XTEN 삽입)와 비교하여 26번 잔기(A1 도메인), 1656번 잔기(A3 도메인) 및 1900번 잔기(A3 도메인)의 바로 하류에 편입된 3개의 XTEN 삽입(즉, FVIII-201)의 반감기 연장 효과를 추가로 나타낸다. FVIII-205/VWF-031(채워진 사각형), FVIII-201/VWF-031(역삼각형), FVIII-169/VWF-031(채워진 원형) 및 FVIII-207(빈 다이아몬드형)을 HemA 마우스에 투여하였다. 5분 값으로 정규화된 FVIII 혈장 활성(%)(X축)을 hr 단위로 시간(Y축)에 따라 측정하였다.

도 13. FVIII/VWF DKO 마우스에서의 rFVIII-XTEN/VWF-XTEN 이종이합체의 FVIII 활성. 혈장 샘플의 FVIII 활성을 FVIII 발색 검정에 의해 분석하고, 시간(Y축)의 함수로서의 혈장 FVIII 활성(X축)의 회귀 곡선을 작도하였다. FVIII-155(임의의 XTEN이 없는 scFVIIIFc)를 VWF-034(AE 288 XTEN와 함께 35개의 잔기 트롬빈 개열 가능한 링커를 갖는 VWF-Fc)와 동시 발현시켰다. FVIII-155/VWF-034의 반감기를 FVIII의 B 도메인 연접부(성숙 FVIII 폴리펩타이드에 상응하는 745번 잔기의 바로 하류)에 삽입된 AE 288 XTEN을 갖는 FVIII-169/VWF-031의 반감기와 비교하였다.

도 14A 내지 도 14H. 다양한 rFVIII-XTEN/VWF 작제물의 개략적 다이어그램. 이 작제물은 또한 본 명세서의 다른 부문에 기재되어 있다. 도 14A는 단일 사슬 B 도메인 결실 FVIII 단백질(때때로 본 명세서에서 scBDD-FVIII으로 표시됨)을 나타낸다. scBDD-FVIII 작제물은 Arg로부터의 Ala로의 1645번 및 1648번 잔기에서의 2개의 치환을 포함한다. 도 14B는 2개의 폴리펩타이드 사슬 작제물(FVIII155/VWF031)을 나타내고, 제1 사슬은 임의의 XTEN 없이 Fc 구역에 연결된 단일 사슬 FVIII을 포함하고, 제2 사슬은 Fc 구역에 연결된 VWF D'D3 단편을 포함한다. 이 작제물은 대조군으로서 사용된다. 도 14C는 2개의 폴리펩타이드 사슬 작제물(FVIII199/VWF031)을 나타내며, 제1 사슬은 제1 XTEN이 성숙 FVIII 서열에 상응하는 1900번 잔기의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN이 성숙 FVIII 서열에 상응하는 1656번 잔기의 바로 하류에 삽입된, Fc 구역에 연결된 단일 사슬 FVIII을 포함하며, 제2 사슬은 Fc 구역에 연결된 VWF D'D3 단편을 포함한다. 도 14D는 2개의 폴리펩타이드 사슬 작제물(FVIII201/VWF031)을 나타내며, 제1 사슬은 제1 XTEN이 성숙 FVIII 서열에 상응하는 26번 잔기의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN이 성숙 FVIII 서열에 상응하는 1656번 잔기의 바로 하류에 삽입되며, 제3 XTEN이 성숙 FVIII 서열에 상응하는 1900번 잔기의 바로 하류에 삽입된, Fc 구역에 연결된 단일 사슬 FVIII 단백질을 포함하고, 제2 사슬은 Fc 구역에 연결된 VWF D'D3 단편을 포함한다. 도 14E는 2개의 폴리펩타이드 사슬 작제물(FVIII169/VWF031)을 나타내고, 제1 사슬은 XTEN이 성숙 FVIII 서열에 상응하는 745번 잔기("B"로 표시됨)의 바로 하류에 삽입된, Fc 구역에 연결된 단일 사슬 FVIII 단백질을 포함하고, 제2 사슬은 Fc 구역에 연결된 VWF D'D3 단편을 포함한다. 도 14F는 2개의 폴리펩타이드 사슬 작제물(FVIII203/VWF031)을 나타내며, 제1 사슬은 제1 XTEN이 성숙 FVIII 서열에 상응하는 745번 잔기("B")에 삽입되고, 제2 XTEN이 성숙 FVIII 서열에 상응하는 1900번 잔기에 삽입된, 단일 사슬 FVIII 단백질을 포함하며, 제2 사슬은 Fc 구역에 연결된 VWF D'D3 단편을 포함한다. 도 14G는 2개의 폴리펩타이드 사슬 작제물(FVIII204/VWF031)을 나타내고, 제1 사슬은 제1 XTEN이 성숙 FVIII 서열에 상응하는 403번 잔기의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN이 성숙 FVIII 서열에 상응하는 745번 잔기("B")의 바로 하류에 삽입된, Fc 구역에 연결된 단일 사슬 FVIII 단백질을 포함하고, 제2 사슬은 Fc 구역에 연결된 VWF D'D3 단편을 포함한다. 도 14H는 2개의 폴리펩타이드 사슬 작제물(FVIII205/VWF031)을 나타내며, 제1 사슬은 제1 XTEN이 성숙 FVIII 서열에 상응하는 18번 잔기의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN이 성숙 FVIII 서열에 상응하는 745번 잔기("B")의 바로 하류에 삽입된, 단일 사슬 FVIII을 포함하고, 제2 사슬은 Fc 구역에 연결된 VWF D'D3 단편을 포함한다.

도 15. FVIII/VWF DKO 마우스에서의 rFVIII-XTEN/VWF 및 BDD-FVIII의 FVIII 활성. 혈장 샘플의 FVIII 활성을 FVIII 발색 검정에 의해 분석하고, 시간(Y축)의 함수로서의 혈장 FVIII 활성(X축)의 회귀 곡선을 작도하였다. rFVIII-XTEN/VWF(FVIII-205/VWF-031)의 반감기를 BDD-FVIII 및 rFVIIIFc의 반감기와 비교하였다.

도 16. 꼬리 클립 출혈 모델을 이용한 HemA 마우스에서의 FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 이종이합체의 효율. FVIII169/VWF034, FVIII205/VWF031 및 BDD-FVIII의 효율을 비교하기 위해 HemA 마우스 꼬리 클립 출혈 모델을 이용하였다. 200IU/kg의 FVIII169/VWF034 및 FVIII205/VWF031에 대한 mℓ 단위의 중앙 혈액 손실을 200IU/kg의 BDD-FVIII, 65IU/kg의 BDD-FVIII, 20IU/kg의 BDD-FVIII 및 비히클과 비교하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0105] 정의

[0106] 용어 "하나의" 또는 "일" 물체는 하나 이상의 그 물체를 의미하는 것에 유의하고; 예를 들면, "일 뉴클레오타이드 서열"은 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 나타내는 것으로 이해된다. 그러므로, 용어 "일"(또는 "하나"), "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본 명세서에 상호 교환되어 사용될 수 있다.

[0107] 용어 "폴리뉴클레오타이드" 또는 "뉴클레오타이드"는 단일의 핵산, 및 복수의 핵산을 포괄하도록 의도되고, 단리된 핵산 분자 또는 작제물, 예를 들면, 메신저 RNA(mRNA) 또는 플라스미드 DNA(pDNA)를 의미한다. 소정의 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 종래의 포스포다이에스터 결합 또는 비통상적인 결합(예를 들면, 펩타이드 핵산(PNA)에서 발견되는 것과 같은 아마이드 결합)을 포함한다. 용어 "핵산"은 폴리뉴클레오타이드에 존재하는 임의의 하나 이상의 핵산 분절, 예를 들면, DNA 또는 RNA 단편을 의미한다. "단리된" 핵산 또는 폴리뉴클레오타이드란 이의 네이티브 환경으로부터 제거된 핵산 분자, DNA 또는 RNA를 의도한다. 예를 들면, 벡터에 포함된 VIII 인자 폴리펩타이드를 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오타이드는 본 발명의 목적을 위해 단리된 것으로 생각된다. 단리된 폴리뉴클레오타이드의 추가의 예는 비상동성 숙주 세포에 유지되거나, 용액 중에 다른 폴리뉴클레오타이드로부터 (부분적으로 또는 실질적으로) 정제된 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 단리된 RNA 분자는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드의 *생체내* 또는 *실험실내* RNA 전사물을 포함한다. 본 발명에 따른 단리된 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산은 합성으로 생성된 이러한 분자를 추가로 포함한다. 또한, 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산은 조절 구성요소, 예컨대 프로모터, 인핸서, 리보솜 결합 자리 또는 전사 종결 신호를 포함할 수 있다.

[0108] 본 명세서에 사용되는 바대로, "코딩 구역" 또는 "코딩 서열"은 아미노산으로 번역 가능한 코돈으로 이루어진 폴리뉴클레오타이드의 부분이다. "중지 코돈"(TAG, TGA 또는 TAA)이 통상적으로 아미노산으로 번역되지 않지만, 이는 코딩 구역의 일부인 것으로 생각될 수 있지만, 임의의 플랭킹 서열, 예를 들면 프로모터, 리보솜 결합 자리, 전사 종결자, 인트론 등은 코딩 구역의 일부가 아니다. 코딩 구역의 경계는 통상적으로 생성된 폴리펩타이드의 아미노 말단을 코딩하는 5' 말단에서의 시작 코돈 및 생성된 폴리펩타이드의 카복실 말단을 코딩하는 3' 말단에서의 번역 중지 코돈에 의해 결정된다. 본 발명의 2개 이상의 코딩 구역은 예를 들면 단일 벡터에서의 단일 폴리뉴클레오타이드 작제물 또는 예를 들면 별개의(상이한) 벡터에서의 별개의 폴리뉴클레오타이드 작제물에 존재할 수 있다. 그 결과 단일 벡터가 단지 단일 코딩 구역을 함유하거나 2개 이상의 코딩 구역을 포함할 수 있고, 예를 들면, 단일 벡터는 하기 기재된 바대로 결합 도메인-A 및 결합 도메인-B를 별도로 코딩할 수 있다. 또한, 본 발명의 벡터, 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산은, 본 발명의 결합 도메인을 코딩하는 핵산에 융합되거나 융합되지 않은 채, 비상동성 코딩 구역을 코딩할 수 있다. 비상동성 코딩 구역은 제한 없이 특수 구성요소 또는 모티프, 예컨대 분비 신호 펩타이드 또는 비상동성 기능성 도메인을 포함한다.

[0109] 포유동물 세포에 의해 분비된 소정의 단백질은, 조면소포체를 통한 성장하는 단백질 사슬의 배출이 개시되면, 성숙 단백질로부터 개열된 분비 신호 펩타이드와 회합된다. 당해 분야의 당업자는 신호 펩타이드가 일반적으로 폴리펩타이드의 N 말단에 융합되고 완전한 또는 "전장" 폴리펩타이드로부터 개열되어 폴리펩타이드의 분비된 또는 "성숙" 형태를 생성시킨다는 것을 알 것이다. 소정의 실시형태에서, 그 서열의 네이티브 신호 펩타이드 또는 기능성 유도체는 이것과 작동적으로 회합된 폴리펩타이드의 분비를 지시하는 능력을 보유한다. 대안적으로, 비상동성 포유동물 신호 펩타이드, 예를 들면, 인간 조직 플라스미노겐 활성화인자(tissue plasminogen activator: TPA) 또는 마우스 β-글루쿠로니다제 신호 펩타이드 또는 이의 기능성 유도체를 사용할 수 있다.

[0110] 용어 "하류"는 기준 뉴클레오타이드 서열의 3'에 위치한 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 소정의 실시형태에서, 하류 뉴클레오타이드 서열은 전사의 출발점 이후의 서열을 의미한다. 예를 들면, 유전자의 번역 개시 코돈은 전사의 출발 자리의 하류에 위치한다.

[0111] 용어 "상류"는 기준 뉴클레오타이드 서열의 5'에 위치한 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 소정의 실시형태에서, 상류 뉴클레오타이드 서열은 전사의 출발점 또는 코딩 구역의 5' 측에 위치한 서열을 의미한다. 예를 들면, 대부분의 프로모터는 전사의 출발 자리의 상류에 위치한다.

[0112] 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "조절 구역"은 코딩 구역의 상류(5' 비코딩 서열)에, 이것 내에 또는 이것의 하류(3' 비코딩 서열)에 위치하고, 회합된 코딩 구역의 전사, RNA 처리, 안정성 또는 번역에 영향을 미치는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 조절 구역은 프로모터, 번역 선도 서열, 인트론, 폴리아데닐화 인식 서열, RNA 처리 자리, 이펙터 결합 자리 및 줄기-루프 구조를 포함할 수 있다. 코딩 구역이 진핵생물 세포에서의 발현에 의도되는 경우, 폴리아데닐화 신호 및 전사 종결 서열은 일반적으로 코딩 서열의 3'에 위치할 것이다.

[0113] 폴리펩타이드와 같은 유전자 생성물을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 프로모터 및/또는 하나 이상의 코딩 구역과 작동적으로 회합된 다른 전사 또는 번역 조절 구성요소를 포함할 수 있다. 작동적 회합 시, 폴리펩타이드와 같은 유전자 생성물에 대한 코딩 구역은 조절 구역(들)의 영향 또는 제어 하에 유전자 생성물의 발현을 발생시

키는 방식으로 하나 이상의 조절 구역과 회합된다. 예를 들면, 코딩 구역 및 프로모터는 프로모터 기능의 유도가 코딩 구역에 의해 코딩된 유전자 생성물을 코딩하는 mRNA의 전사를 발생시키는 경우 및 프로모터와 코딩 구역 사이의 연결의 성질이 유전자 생성물의 발현을 지시하는 프로모터의 능력을 방해하지 않거나 전사되는 DNA 주형의 능력을 방해하지 않는 경우 "작동적으로 회합"된다. 프로모터, 예를 들면 인핸서, 오퍼레이터(operator), 리프레서(repressor) 및 전사 종료 신호 이외의 다른 전사 구성요소는 또한 코딩 구역과 작동적으로 회합되어 유전자 생성물 발현을 지시할 수 있다.

[0114] 다양한 전사 조절 구역은 당해 분야의 당업자에게 공지되어 있다. 이는, 제한 없이, 척추동물 세포에서 작용하는 전사 조절 구역, 예컨대, 사이토메갈로바이러스(극초기 프로모터와 함께 인트론-A), 유인원 바이러스 40(초기 프로모터) 및 레트로바이러스(예컨대, 라우스 육종 바이러스)로부터의 프로모터 및 인핸서 분절(이들로 제한되지는 않음)을 포함한다. 다른 전사 조절 구역은 척추동물 유전자, 예컨대 액틴, 열 충격 단백질, 소 성장 호르몬 및 토끼 β-글로빈으로부터 유도된 것, 및 진핵생물 세포에서 유전자 발현을 조절할 수 있는 다른 서열을 포함한다. 추가의 적합한 전사 조절 구역은 조직 특이적 프로모터 및 인핸서, 및 림포카인 유도성 프로모터(예를 들면, 인터페론 또는 인터류킨에 의해 유도된 프로모터)를 포함한다.

[0115] 유사하게, 다양한 번역 조절 구성요소가 당해 분야의 당업자에게 공지되어 있다. 이것은 리보솜 결합 자리, 번역 개시 및 종결 코돈 및 피코르나바이러스로부터 유도된 구성요소(특히 내부 리보솜 진입 자리 또는 IRES(또한 CITE 서열이라고 칭함))를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0116] 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "발현"은 폴리뉴클레오타이드가 유전자 생성물, 예를 들면, RNA 또는 폴리펩타이드를 생성하는 과정을 의미한다. 이는 제한 없이 폴리뉴클레오타이드의 메신저 RNA(mRNA), 운반 RNA(tRNA), 소형 헤어핀 RNA(shRNA), 소형 간섭 RNA(siRNA) 또는 임의의 다른 RNA 생성물로의 전사 및 mRNA의 폴리펩타이드로의 번역을 포함한다. 발현은 "유전자 생성물"을 생성한다. 본 명세서에 사용되는 바대로, 유전자 생성물은 핵산, 예를 들면, 유전자의 전사에 의해 생성된 메신저 RNA 또는 전사물로부터 번역된 폴리펩타이드일 수 있다. 본 명세서에 기재된 유전자 생성물은 추가로 전사 후 변형, 예를 들면, 폴리아데닐화 또는 스플라이싱을 갖는 핵산 또는 번역 후 변형, 예를 들면, 메틸화, 글라이코실화, 지질의 첨가, 다른 단백질 아단위와의 회합 또는 단백분해 개열을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다.

[0117] "벡터"는 숙주 세포로의 핵산의 클로닝 및/또는 운반을 위한 임의의 비히클을 의미한다. 벡터는 부착된 분절의 복제를 발생시키도록 또 다른 핵산 분절이 부착될 수 있는 레플리콘일 수 있다. "레플리콘"은 *생체내* 복제의 자율 단위로서 작용하는, 즉 자체의 조절 하에 복제할 수 있는 임의의 유전자 구성요소(예를 들면, 플라스미드, 파지, 코스미드, 염색체, 바이러스)를 의미한다. 용어 "벡터"는 *실험실내*, *생체외* 또는 *생체내* 핵산을 세포로 도입하기 위한 바이러스 및 비바이러스 비히클 둘 다를 포함한다. 예를 들면, 플라스미드, 변형 진핵생물 바이러스 또는 변형 박테리아 바이러스를 포함하는 다수의 벡터가 당해 분야에 공지되어 있고 사용된다. 적합한 벡터로의 폴리뉴클레오타이드의 삽입은 적절한 폴리뉴클레오타이드 단편을 상보성 응집 말단을 갖는 선택된 벡터에 결찰함으로써 성취될 수 있다.

[0118] 벡터는 벡터로 편입된 세포의 선택 또는 동정을 제공하는 선택 가능한 마커 또는 리포터를 코딩하도록 조작될 수 있다. 선택 가능한 마커 또는 리포터의 발현은 벡터에 포함된 다른 코딩 구역을 편입시키거나 발현시키는 숙주 세포의 동정 및/또는 선택을 허용한다. 당해 분야에 공지되고 사용되는 선택 가능한 마커 유전자의 예는 암피실린, 스트렙토마이신, 젠타마이신, 카나마이신, 하이그로마이신, 비알라포스 제초제, 설폰아마이드 등에 내성을 제공하는 유전자; 및 표현형 마커로서 사용되는 유전자, 즉, 안토시아닌 조절 유전자, 아이소펜타닐 트랜스퍼라제 유전자 등을 포함한다. 당해 분야에 공지되고 사용되는 리포터의 예는 루시퍼라제(Luc), 녹색 형광 단백질(GFP), 클로르암페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT), -갈락토시다제(LacZ), -글루쿠로니다제(Gus) 등을 포함한다. 선택 가능한 마커는 또한 리포터인 것으로 생각될 수 있다.

[0119] 용어 "플라스미드"는 일반적으로 원형 이중 가닥 DNA 분자의 형태이고 세포의 중추 대사의 일부가 아닌 유전자를 대개 보유하는 염색체외 구성요소를 의미한다. 이러한 구성요소는 임의의 공급원으로부터 유래한, 단일 또는 이중 가닥 DNA 또는 RNA의, 자율적으로 복제하는 서열, 게놈 통합 서열, 파지 또는 뉴클레오타이드 서열(선형, 원형 또는 초나선)일 수 있고, 여기서 다수의 뉴클레오타이드 서열은 결합되거나 재조합되어 선택된 유전자 생성물에 대한 프로모터 단편 및 DNA 서열을 적절한 3' 비번역 서열과 함께 세포로 도입할 수 있는 독특한 구성이 된다.

[0120] 사용될 수 있는 진핵생물 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터 및 수두 바이러스, 예를 들면, 백시니아 바이러스 벡터, 바큘로바이러스 벡터 또는 헤르페스 바이러스 벡

터를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 비바이러스 벡터는 플라스미드, 리포솜, 전기 하전 지질(사이토펙틴), DNA-단백질 복합체 및 생물중합체를 포함한다.

[0121] "클로닝 벡터"는 순차적으로 복제하는 핵산의 단위 길이이고, 부착된 분절의 복제를 발생시키도록 또 다른 핵산 분절이 부착될 수 있는 복제 기원을 포함하는 "레플리콘", 예컨대 플라스미드, 파지 또는 코스미드를 의미한다. 소정의 클로닝 벡터는 하나의 세포 유형, 예를 들면, 박테리아에서 복제할 수 있고 또 다른 세포 유형, 예를 들면, 진핵생물 세포에서 발현할 수 있다. 클로닝 벡터는 통상적으로 벡터를 포함하는 세포의 선택에 사용될 수 있는 하나 이상의 서열 및/또는 관심 있는 핵산 서열의 삽입을 위한 하나 이상의 다수의 클로닝 자리를 포함한다.

[0122] 용어 "발현 벡터"는 숙주 세포로의 삽입 후의 삽입된 핵산 서열의 발현이 가능하게 설계된 비히클을 의미한다. 삽입된 핵산 서열은 상기 기재된 조절 구역과 작동적 회합에 놓인다.

[0123] 벡터는 당해 분야에 널리 공지된 방법, 예를 들면, 형질감염, 전기천공, 미량주사, 형질도입, 세포 융합, DEAE 덱스트란, 인산칼슘 침강, 리포펙션(리소좀 융합), 유전자 총의 사용 또는 DNA 벡터 수송체에 의해 숙주 세포로 도입된다.

[0124] 본 명세서에 사용되는 바대로, "배양한다", "배양하는 것" 및 "배양하는"은 세포 성장 또는 분열을 허용하는 *실험실내* 조건 하에 세포를 항온처리하거나 살아 있는 상태에서 세포를 유지시키는 것을 의미한다. 본 명세서에 사용되는 바대로, "배양된 세포"는 *실험실내* 증식되는 세포를 의미한다.

[0125] 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "폴리펩타이드"는 단일의 "폴리펩타이드" 및 복수의 "폴리펩타이드"를 포괄하도록 의도되고, 아마이드 결합(또한 펩타이드 결합으로 공지됨)에 의해 선형 연결된 단량체(아미노산)로 이루어진 분자를 의미한다. 용어 "폴리펩타이드"는 2개 이상의 아미노산의 임의의 사슬 또는 사슬들을 의미하고, 특정한 길이의 생성물을 의미하지 않는다. 따라서, 펩타이드, 다이펩타이드, 트라이펩타이드, 올리고펩타이드, "단백질", "아미노산 사슬" 또는 2개 이상의 아미노산의 사슬 또는 사슬들을 의미하기 위해 사용된 임의의 다른 용어는 "폴리펩타이드"의 정의 내에 포함되고, 용어 "폴리펩타이드"는 임의의 이 용어 대신에 또는 이 용어와 상호 교환되어 사용될 수 있다. 용어 "폴리펩타이드"는 또한 제한 없이 글라이코실화, 아세틸화, 포스포릴화, 아미드화, 공지된 보호기/차단기에 의한 유도체화, 단백분해 개열 또는 비천연 발생 아미노산에 의한 변형을 포함하는 폴리펩타이드의 발현 후 변형의 생성물을 의미하도록 의도된다. 폴리펩타이드는 천연의 생물학적 공급원 또는 생성된 재조합 기술로부터 유래할 수 있지만, 반드시 지정된 핵산 서열로부터 번역되지는 않는다. 이는 화학 합성을 포함하여 임의의 방식으로 생성될 수 있다.

[0126] "단리된" 폴리펩타이드 또는 이의 단편, 변이체 또는 유도체는 천연 환경에 있지 않는 폴리펩타이드를 의미한다. 특정한 수준의 정제가 필요하지 않다. 예를 들면, 단리된 폴리펩타이드는 이의 네이티브 또는 천연 환경으로부터 단순히 제거될 수 있다. 재조합으로 생성된 폴리펩타이드 및 숙주 세포에서 발현된 단백질은, 임의의 적합한 기법에 의해 분리되거나, 분획화되거나, 부분적으로 또는 실질적으로 정제된 네이티브 또는 재조합 폴리펩타이드인 것처럼, 본 발명의 목적상 단리된 것으로 생각된다.

[0127] 폴리펩타이드의 단편 또는 변이체 및 이들의 임의의 조합이 본 발명에서 또한 포함된다. 용어 "단편" 또는 "변이체"는, 본 발명의 폴리펩타이드 결합 도메인 또는 결합 분자를 의미할 때, 기준 폴리펩타이드의 적어도 몇몇 특성(예를 들면, FcRn 결합 도메인 또는 Fc 변이체에 대한 FcRn 결합 친화도, FVIII 변이체에 대한 응고 활성 또는 VWF 단편에 대한 FVIII 결합 활성)을 보유하는 임의의 폴리펩타이드를 포함한다. 폴리펩타이드의 단편은 단백분해 단편, 및 본 명세서의 그외 기재된 특이적 항체 단편 이외의 결실 단편을 포함하지만, 천연 발생 전장 폴리펩타이드(또는 성숙 폴리펩타이드)를 포함하지 않는다. 본 발명의 폴리펩타이드 결합 도메인 또는 결합 분자의 변이체는 상기 기재된 단편 및 또한 아미노산 치환, 결실 또는 삽입으로 인해 변경된 아미노산 서열을 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 변이체는 천연 또는 비천연 발생일 수 있다. 비천연 발생 변이체는 분야 공지 돌연변이유발 기법을 이용하여 생산될 수 있다. 변이체 폴리펩타이드는 보존적 또는 비보존적 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 포함할 수 있다.

[0128] 본 명세서에 사용된 용어 "VWF 단편" 또는 "VWF 단편"은 FVIII과 상호작용하고, 예를 들면, FVIIIa에 대한 조기 활성화를 방지하고/하거나 조기 단백분해를 방지하고/하거나 조기 청소를 발생시키는 인지질 막과의 회합을 방지하고/하거나 VWF 결합된 FVIII이 아닌 네이키드 FVIII에 결합할 수 있는 FVIII 청소 수용체에 대한 결합을 방지하고/하거나 FVIII 중쇄 및 경쇄 상호작용을 안정화시키는 것과 같은, 전장 VWF에 의해 FVIII에 보통 제공되는 적어도 하나 이상의 특성을 보유하는 임의의 VWF 단편을 의미한다.

[0129] "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 잔기가 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 대체된 것이다. 염기성 측쇄(예를 들면, 라이신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들면, 아스파르트산, 글루탐산), 비하전 극성 측쇄(예를 들면, 글라이신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 타이로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들면, 알라닌, 발린, 류신, 아이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지 측쇄(예를 들면, 트레오닌, 발린, 아이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들면, 타이로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 포함하는 유사한 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리가 당해 분야에 정의되어 있다. 따라서, 폴리펩타이드에서의 아미노산이 동일한 측쇄 패밀리로부터의 또 다른 아미노산으로부터 대체된 경우, 치환은 보존적인 것으로 생각된다. 또 다른 실시형태에서, 아미노산의 스트링이 측쇄 패밀리 구성원의 순서 및/또는 조성이 다른 구조적으로 유사한 스트링으로 보존적으로 대체될 수 있다.

[0130] 당해 분야에 공지된 바대로, 2개의 폴리펩타이드 사이의 "서열 동일성"은 하나의 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 제2 폴리펩타이드의 서열과 비교함으로써 결정된다. 본 명세서에 기재될 때, 임의의 특정한 폴리펩타이드가 또 다른 폴리펩타이드와 적어도 약 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100% 동일한지의 여부는 베스트피트(BESTFIT) 프로그램(위스콘신 서열 분석 패키지(Wisconsin Sequence Analysis Package), 유닉스용 8판, 제네틱스 컴퓨터 그룹(위스콘신주 53711 매드슨 575 사이언스 드라이브 유니버시티 리서치 파크))(이것으로 제한되지는 않음)과 같은 당해 분야에 공지된 컴퓨터 프로그램/소프트웨어 및 방법을 이용하여 결정될 수 있다. 베스트피트는 스미스(Smith) 및 워터만(Waterman)의 국소 상동성 알고리즘(Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981))을 이용하여, 2개의 서열 사이의 상동성의 최고의 분절을 찾는다. 특정한 서열이 본 발명에 따른 기준 서열과 예를 들면 95% 동일한지의 여부를 결정하기 위해 베스트피트 또는 임의의 다른 서열 정렬 프로그램을 이용할 때, 동일성의 백분율이 기준 폴리펩타이드 서열의 전장에 걸쳐 계산되고 기준 서열에서의 아미노산의 전체 수의 최대 5%의 상동성의 갭이 허용되도록 매개변수가 물론 설정된다.

[0131] 본 명세서에 사용되는 바대로, VWF 서열 또는 FVIII 단백질 서열에서의 "상응하는 아미노산" 또는 "동등한 아미노산"은 제1 VWF 또는 FVIII 서열과 제2 VWF 또는 FVIII 서열 사이의 동일성 또는 유사성을 최대화하도록 정렬에 의해 확인된다. 제2 VWF 또는 FVIII 서열에서의 동등한 아미노산을 확인하기 위해 사용된 번호는 제1 VWF 또는 FVIII 서열에서의 상응하는 아미노산을 확인하기 위해 사용된 번호에 기초한다.

[0132] 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "삽입 자리"는 비상동성 모이어티가 삽입될 수 있는 위치의 바로 상류의 FVIII 폴리펩타이드 또는 이의 단편, 변이체 또는 유도체에서의 위치를 의미한다. "삽입 자리"는 숫자로 표시되고, 숫자는 삽입의 위치에 바로 N 말단인 삽입 자리가 상응하는 성숙 네이티브 FVIII(서열 번호 4)에서의 아미노산의 숫자이다. 예를 들면, 구절 "a3는 서열 번호 4의 1656번 아미노산에 상응하는 삽입 자리에서의 XTEN을 포함한다"는 비상동성 모이어티가 서열 번호 4의 1656번 아미노산 및 1657번 아미노산에 상응하는 2개의 아미노산 사이에 위치한다는 것을 나타낸다.

[0133] 본 명세서에 사용되는 바대로, 구절 "아미노산의 바로 하류"는 아미노산의 말단 카복실기에 바로 오른쪽의 위치를 의미한다. 유사하게, 구절 "아미노산의 바로 상류"는 아미노산의 말단 아민기에 바로 오른쪽의 위치를 의미한다. 따라서, 본 명세서에 사용되는 바대로 구절 "삽입 자리의 2개의 아미노산 사이"는 XTEN 또는 임의의 다른 폴리펩타이드가 2개의 인접한 아미노산 사이에 삽입된 위치를 의미한다. 따라서, 구절 "아미노산의 바로 하류에 삽입된" 및 "삽입 자리의 2개의 아미노산 사이에 삽입된"은 "삽입 자리에서 삽입된"과 동의어로 사용된다.

[0134] 본 명세서에 사용되는 바대로 용어 "삽입된", "삽입된다", "로 삽입된다" 또는 문법적 관련 용어는 네이티브 성숙 인간 FVIII에서 유사한 위치에 대한 키메라 폴리펩타이드에서의 XTEN의 위치를 의미한다. 본 명세서에 사용되는 바대로 상기 용어는 네이티브 성숙 인간 FVIII에 대한 재조합 FVIII 폴리펩타이드의 특징을 의미하고, 키메라 폴리펩타이드가 제조되는 임의의 방법 또는 처리를 나타내거나, 함축하거나, 암시하지 않는다. 예를 들면, 본 명세서에 제공된 키메라 폴리펩타이드를 언급시, 구절 "XTEN은 FVIII 폴리펩타이드의 745번 잔기의 바로 하류에 삽입된다"는 키메라 폴리펩타이드가 네이티브 성숙 인간 FVIII에서의 745번 아미노산에 상응하는 아미노산의 바로 하류의, 예를 들면, 네이티브 성숙 인간 FVIII의 745번 및 746번 아미노산에 상응하는 아미노산에 의해 결합된 XTEN을 포함한다는 것을 의미한다.

[0135] "융합" 또는 "키메라" 단백질은 자연에서 자연적으로 연결되지 않은 제2 아미노산 서열에 연결된 제1 아미노산 서열을 포함한다. 보통 별개의 단백질로 존재하는 아미노산 서열은 융합 폴리펩타이드에서 함께 있을 수 있거나, 보통 동일한 단백질에 존재하는 아미노산 서열은 융합 폴리펩타이드에서 새로운 배치, 예를 들면, 본 발명의 VIII 인자 도메인과 Ig Fc 도메인과의 융합에 있을 수 있다. 융합 단백질은 예를 들면 화학 합성에 의해 또는 펩타이드 구역이 원하는 관계로 코딩된 폴리뉴클레오타이드를 생성하고 번역함으로써 생성된다. 키메라 단

백질은 공유, 비펩타이드 결합 또는 비공유 결합에 의해 제1 아미노산 서열과 회합된 제2 아미노산 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[0136] 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "반감기"는 *생체내* 특정한 폴리펩타이드의 생물학적 반감기를 의미한다. 반감기는 대상체에 투여되는 분량의 절반이 동물에서 순환 및/또는 다른 조직으로부터 청소되는 데 필요한 시간으로 표시될 수 있다. 소정의 폴리펩타이드의 청소 곡선이 시간의 함수로서 작도될 때, 곡선은 일반적으로 신속한 α상 및 더 긴 β상을 갖는 2상이다. α상은 통상적으로 맥관 내 공간과 맥관 외 공간 사이의 투여된 Fc 폴리펩타이드의 평형을 나타내고, 부분적으로 폴리펩타이드의 크기에 의해 결정된다. β상은 통상적으로 맥관 내 공간에서의 폴리펩타이드의 이화작용을 나타낸다. 몇몇 실시형태에서, FVIII 및 FVIII을 포함하는 키메라 단백질은 단상이고 따라서 알파 상이 아니라 단지 단일 베타 상을 갖는다. 따라서, 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 사용되는 바대로 용어 반감기는 β상에서의 폴리펩타이드의 반감기를 의미한다. 인간에서의 인간 항체의 통상적인 β상 반감기는 21일이다.

[0137] 본 명세서에 사용되는 바대로 용어 "연결된"은 각각 제2 아미노산 서열 또는 뉴클레오타이드 서열에 공유 또는 비공유 결합된 제1 아미노산 서열 또는 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 제1 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열은 제2 아미노산 또는 뉴클레오타이드 서열에 직접 결합되거나 인접할 수 있거나, 대안적으로 개재한 서열은 제1 서열을 제2 서열에 공유 결합시킬 수 있다. 용어 "연결된"은 C 말단 또는 N 말단에서의 제2 아미노산 서열에 대한 제1 아미노산 서열의 융합을 의미할 뿐만 아니라, 제2 아미노산 서열(또는 각각 제1 아미노산 서열)에서의 임의의 2개의 아미노산으로의 전체 제1 아미노산 서열(또는 제2 아미노산 서열)의 삽입을 포함한다. 일 실시형태에서, 제1 아미노산 서열은 펩타이드 결합 또는 링커에 의해 제2 아미노산 서열에 연결될 수 있다. 제1 뉴클레오타이드 서열은 포스포다이에스터 결합 또는 링커에 의해 제2 뉴클레오타이드 서열에 연결될 수 있다. 링커는 펩타이드 또는 폴리펩타이드(폴리펩타이드 사슬의 경우) 또는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 사슬(뉴클레오타이드 사슬의 경우) 또는 임의의 화학적 모이어티(폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드 사슬 둘 다의 경우)일 수 있다. 용어 "연결된"은 또한 하이픈(-)으로 표시된다.

[0138] 본 명세서에 사용되는 바대로 용어 "회합된"은 제1 아미노산 사슬과 제2 아미노산 사슬 사이에 형성된 공유 또는 비공유 결합을 의미한다. 일 실시형태에서, 용어 "회합된"은 공유, 비펩타이드 결합 또는 비공유 결합을 의미한다. 이 회합은 콜론, 즉 (:)로 표시될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 이는 펩타이드 결합 이외의 공유 결합을 의미한다. 예를 들면, 아미노산 시스테인은 제2 시스테인 잔기 상의 티올기와 이황화 결합 또는 브릿지를 형성할 수 있는 티올기를 포함한다. 대부분의 천연 발생 IgG 분자에서, CH1 및 CL 구역은 이황화 결합에 의해 회합되고, 2개의 중쇄는 카밧(Kabat) 넘버링 시스템(226번 또는 229번 위치, EU 넘버링 시스템)을 이용하여 239번 및 242번에 상응하는 위치에서 2개의 이황화 결합에 의해 회합된다. 공유 결합의 예는 펩타이드 결합, 금속 결합, 수소 결합, 이황화 결합, 시그마 결합, 파이 결합, 델타 결합, 글라이코시드 결합, 아그노스틱(agnostic) 결합, 굽은 결합, 이극성 결합, 파이 백결합, 이중 결합, 삼중 결합, 사중 결합, 오중 결합, 육중 결합, 공액, 초공액, 방향족성, 촉각성(hapticity) 또는 반결합을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 비공유 결합의 비제한적인 예는 이온 결합(예를 들면, 양이온-파이 결합 또는 염 결합), 금속 결합, 수소 결합(예를 들면, 이수소 결합, 이수소 복합체, 저장벽 수소 결합 또는 대칭 수소 결합), 반 데르 발스 힘, 런던 분산력, 기계적 결합, 할로겐 결합, 오로필릭시티(aurophilicity), 치윤법, 적층(stacking), 엔트로피력 또는 화학 극성을 포함한다.

[0139] 본 명세서에 사용되는 용어 "단량체-이합체 하이브리드"는 이황화 결합에 의해 서로 회합된 제1 폴리펩타이드 사슬 및 제2 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 키메라 단백질을 의미하고, 제1 사슬은 응고 인자, 예를 들면, VIII 인자 및 제1 Fc 구역을 포함하고, 제2 사슬은 응고 인자 없이 제2 Fc 구역을 포함하거나, 이것으로 실질적으로 이루어지거나, 이것으로 이루어진다. 단량체-이합체 하이브리드 작제물은 따라서 오직 하나의 응고 인자를 갖는 단량체 양상 및 2개의 Fc 구역을 갖는 이합체 양상을 포함하는 하이브리드이다.

[0140] 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "개열 자리" 또는 "효소 개열 자리"는 효소에 의해 인식된 자리를 의미한다. 소정의 효소 개열 자리는 세포내 처리 자리를 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드는 이러한 자리의 개열이 혈전 형성의 자리에서 발생하도록 응고 과정 동안 활성화된 효소에 의해 개열된 효소 개열 자리를 갖는다. 예시적인 이러한 자리는 예를 들면 트롬빈, XIa 인자 또는 Xa 인자에 의해 인식된 것을 포함한다. 예시적인 FXIa 개열 자리는 예를 들면 TQSFNDFTR(서열 번호 45) 및 SVSQTSKLTR(서열 번호 46)을 포함한다. 예시적인 트롬빈 개열 자리는 예를 들면 DFLAEGGGVR(서열 번호 47), TTKIKPR(서열 번호 48), LVPRG(서열 번호 49) 및 ALRPR(서열 번호 50의 1번 내지 5번 아미노산)을 포함한다. 다른 효소 개열 자리는 당해 분야에 공지되어 있다.

[0141] 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "처리 자리" 또는 "세포내 처리 자리"는 폴리펩타이드의 번역 후 작용하는 효소에 대한 표적인 폴리펩타이드 내의 일 유형의 효소 개열 자리를 의미한다. 일 실시형태에서, 이러한 효소는 골지 내강으로부터 트랜스 골지 구획으로의 수송 동안 작용한다. 세포내 처리 효소는 세포로부터의 단백질의 분비 전에 폴리펩타이드를 개열시킨다. 이러한 처리 자리의 예는 예를 들면 엔도펩티다제의 PACE/퓨린(여기서, PACE는 쌍 지은 염기성 아미노산 개열 효소의 두문자어임) 패밀리에 의해 표적화된 것을 포함한다. 이 효소는 골지 막에 편재화되고 서열 모티프 Arg-[임의의 잔기]-(Lys 또는 Arg)-Arg의 카복시 말단 측 상의 단백질을 개열시킨다. 본 명세서에 사용되는 바대로 효소의 "퓨린" 패밀리는 예를 들면 PCSK1(또한 PC1/Pc3으로 공지됨), PCSK2(또한 PC2로 공지됨), PCSK3(또한 퓨린 또는 PACE로 공지됨), PCSK4(또한 PC4로 공지됨), PCSK5(또한 PC5 또는 PC6으로 공지됨), PCSK6(또한 PACE4로 공지됨) 또는 PCSK7(또한 PC7/LPC, PC8 또는 SPC7로 공지됨)을 포함한다. 다른 처리 자리는 당해 분야에 공지되어 있다.

[0142] 하나 초과의 처리 또는 개열 자리를 포함하는 작제물에서, 이러한 자리가 동일하거나 상이할 수 있는 것으로 이해될 것이다.

[0143] 용어 "퓨린"은 EC 3.4.21.75호에 상응하는 효소를 의미한다. 퓨린은 PACE(쌍 지은 염기성 아미노산 개열 효소)로도 공지된 서브틸리신 유사 프로단백질 전환효소이다. 퓨린은 불활성 전구체 단백질의 부분을 결실시켜 이를 생물학적 활성 단백질로 전환시킨다. 이의 세포내 수송 동안, VWF의 프로펩타이드는 퓨린 효소에 의해 성숙 VWF 분자로부터 개열될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 퓨린은 VWF의 D'D3으로부터 D1D2를 개열시킨다. 다른 실시형태에서, 퓨린을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 VWF 단편을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열과 함께 발현될 수 있어서 D1D2 도메인은 세포내 퓨린에 의해 개열될 수 있다.

[0144] 하나 초과의 처리 또는 개열 자리를 포함하는 작제물에서, 이러한 자리가 동일하거나 상이할 수 있는 것으로 이해될 것이다.

[0145] 본 명세서에 사용되는 바대로 "처리 가능한 링커"는 본 명세서에 그외 기재된 적어도 하나의 세포내 처리 자리를 포함하는 링커를 의미한다.

[0146] 본 명세서에 사용되는 바대로 지혈 장애는 자발적으로 또는 외상의 결과로서 피브린괴를 형성하는 손상된 능력 또는 불능으로 인한 출혈의 경향을 특징으로 하는 유전되는 유전적 또는 후천성 병증을 의미한다. 이러한 장애의 예는 혈우병을 포함한다. 3가지 주요 형태는 A형 혈우병(VIII 인자 결핍증), B형 혈우병(IX 인자 결핍증 또는 "크리스마스 질환") 및 C 혈우병(XI 인자 결핍증, 경증 출혈 경향)이다. 다른 지혈 장애는 예를 들면 폰 빌레브란트 질환, XI 인자 결핍증(PTA 결핍증), XII 인자 결핍증, 피브리노겐, 프로트롬빈, V 인자, VII 인자, X 인자 또는 XIII 인자에서의 결핍증 또는 구조 이상, 베르나르-술리에(Bernard-Soulier) 증후군(GPIb에서의 결함 또는 결핍증임)을 포함한다. VWF에 대한 수용체인 GPIb는 결함이 있을 수 있고 원발성 혈전 형성(원발성 지혈) 결여 및 출혈 경향 증가, 및 글란즈만(Glanzman) 및 네겔리(Naegeli)의 혈소판무력증(글란즈만 혈소판무력증)을 발생시킬 수 있다. 간부전(급성 및 만성 형태)에서, 간에 의한 응고 인자의 생산이 불충분하고; 이는 출혈 위험을 증가시킬 수 있다.

[0147] 본 발명의 키메라 분자는 예방학적으로 사용될 수 있다. 본 명세서에 사용되는 바대로 용어 "예방학적 치료"는 출혈 삽화 전의 분자의 투여를 의미한다. 일 실시형태에서, 일반적 지혈제를 필요로 하는 대상체는 수술을 겪었거나 수술 예정이다. 본 발명의 키메라 단백질은 예방으로서 수술 전에 또는 후에 투여될 수 있다. 본 발명의 키메라 단백질은 급성 출혈 삽화를 조절하기 위해 수술 동안에 또는 수술 후에 투여될 수 있다. 수술은 간 이식, 간 절제, 치과 처치 또는 줄기 세포 이식을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0148] 본 발명의 키메라 단백질은 또한 수요대응형 치료에 사용된다. 용어 "수요대응형 치료"는 출혈 삽화의 증상에 대해 반응한 또는 출혈을 발생시킬 수 있는 활동 전의 키메라 분자의 투여를 의미한다. 일 양상에서, 수요대응형 치료는 출혈이 시작할 때, 예컨대 상해 후 또는 출혈이 예상될 때, 예컨대 수술 전에 대상체에 제공될 수 있다. 또 다른 양상에서, 수요대응형 치료는 출혈의 위험을 증가시킬 수 있는 활동, 예컨대 접촉 스포츠 전에 제공될 수 있다.

[0149] 본 명세서에 사용되는 바대로 용어 "급성 출혈"은 기초 원인과 무관하게 출혈 삽화를 의미한다. 예를 들면, 대상체는 외상, 요독증, 유전적 출혈 장애(예를 들면, VII 인자 결핍증), 혈소판 장애 또는 응고 인자에 대한 항체의 발생으로 인한 내성을 가질 수 있다.

[0150] 본 명세서에 사용되는 바대로 치료한다, 치료, 치료하는은 예를 들면 질환 또는 병증의 중증도의 감소; 질환 진행의 기간의 감소; 질환 또는 병증과 관련된 하나 이상의 증상의 경감; 질환 또는 병증을 반드시 치유할 필요

없이 질환 또는 병증을 앓는 대상체에 대한 유리한 효과의 제공, 또는 질환 또는 병증과 관련된 하나 이상의 증상의 예방을 의미한다. 일 실시형태에서, 용어 "치료하는" 또는 "치료"는 본 발명의 키메라 단백질 또는 VWF 단편을 투여함으로써 대상체에서 적어도 약 1IU/dℓ, 2IU/dℓ, 3IU/dℓ, 4IU/dℓ, 5IU/dℓ, 6IU/dℓ, 7IU/dℓ, 8IU/dℓ, 9IU/dℓ, 10IU/dℓ, 11IU/dℓ, 12IU/dℓ, 13IU/dℓ, 14IU/dℓ, 15IU/dℓ, 16IU/dℓ, 17IU/dℓ, 18IU/dℓ, 19IU/dℓ 또는 20IU/dℓ의 FVIII 트로프 수준을 유지시키는 것을 의미한다. 또 다른 실시형태에서, "치료하는" 또는 "치료"는 약 1 내지 약 20IU/dℓ, 약 2 내지 약 20IU/dℓ, 약 3 내지 약 20IU/dℓ, 약 4 내지 약 20IU/dℓ, 약 5 내지 약 20IU/dℓ, 약 6 내지 약 20IU/dℓ, 약 7 및 내지 20IU/dℓ, 약 8 내지 약 20IU/dℓ, 약 9 내지 약 20IU/dℓ 또는 약 10 내지 약 20IU/dℓ의 FVIII 트로프 수준을 유지시키는 것을 의미한다. 질환 또는 병증의 치료, 또는 질환 또는 병증을 치료하는은 또한 비혈우병 대상체에서의 FVIII 활성의 적어도 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% 또는 20%에 필적하는 수준으로 대상체에서의 FVIII 활성을 유지시키는 것을 포함할 수 있다. 치료에 필요한 최소 트로프 수준은 하나 이상의 공지된 방법에 의해 측정될 수 있고, 각각의 사람에 대해 조정(증가 또는 감소)될 수 있다.

[0151] **키메라 단백질**

[0152] 본 발명은 FVIII 반감기 제한 인자, 즉 내인성 VWF가 FVIII 단백질과 회합되는 것을 방지하거나 억제함으로써 VWF 단편 및 XTEN 서열을 사용하여 VIII 인자 단백질의 반감기를 연장하는 것에 관한 것이다. 내인성 VWF는 비공유 복합체에서 약 95% 내지 약 98%의 FVIII과 회합된다. 내인성 VWF가 FVIII 반감기 제한 인자이지만, FVIII 단백질에 결합된 내인성 VWF는 다양한 방식으로 FVIII을 보호하는 것으로 또한 공지되어 있다. 예를 들면, (약 250kDa를 갖는 다합체로서의) 전장 VWF는 프로테아제 개열 및 FVIII 활성화로부터 FVIII을 보호하고/하거나, FVIII 중쇄 및/또는 경쇄를 안정화시키고/시키거나, 스캐빈저 수용체에 의한 FVIII의 청소를 방지할 수 있다. 그러나, 동시에, 내인성 VWF는 음세포작용을 방지하고 VWF 청소 경로를 통해 시스템으로부터 FVIII-VWF 복합체를 청소함으로써 FVIII 반감기를 제한한다. 이론에 구속됨이 없이, 내인성 VWF는 반감기 연장제에 융합된 FVIII 단백질의 반감기가 야생형 FVIII의 반감기의 약 2배를 초과하는 것을 방지하는 반감기 제한 인자인 것으로 생각된다. 따라서, 본 발명은 VWF 단편을 사용하여 내인성 VWF와 FVIII 단백질 사이의 상호작용을 방지하거나 억제하여, XTEN 서열 단독 또는 Ig 불변 구역 또는 이의 일부와 조합된 XTEN 서열을 사용함으로써 FVIII 단백질의 반감기를 증가시키는 것에 관한 것이다. XTEN 서열은 FVIII 단백질 또는 VWF 단편에 연결될 수 있다. VWF 단편과 회합된 FVIII 단백질은 따라서 하나 이상의 VWF 청소 수용체에 의해 더 서서히 순환으로부터 청소되고, 이후 야생형 FVIII 또는 VWF 단편이 없는 FVIII 단백질과 비교하여 XTEN 서열 또는 Ig 불변 구역과 조합된 XTEN 서열의 완전한 반감기 연장을 가질 수 있다.

[0153] 일 실시형태에서, VWF 단편은 공유 또는 비공유 결합에 의해 FVIII 단백질과 회합(또는 이에 연결)된다. 몇몇 경우에, 그러나, VWF 단편과 FVIII 단백질 사이의 물리적 봉쇄 또는 화학적 회합(예를 들면, 비공유 결합)은 내인성 VWF의 존재 하에 FVIII 단백질 및 VWF 단편을 포함하는 안정한 복합체를 제공하기에 충분히 강하지 않을 수 있다. 예를 들면, 임의의 다른 연결 없이 FVIII 단백질과 비공유 결합을 형성하는 VWF 단편은, VWF 단편(예를 들면, 재조합 VWF, 즉 rVWF)을 내인성 VWF로 대체하면서, 내인성 VWF의 존재 하에 FVIII 단백질로부터 *생체내* 쉽게 분해될 수 있다. 따라서, 내인성 VWF에 비공유 결합된 FVIII 단백질은 VWF 청소 경로에 놓이고 시스템으로부터 쉽게 청소될 것이다. FVIII 단백질에 의한 VWF 단편의 분해를 방지하기 위해, 몇몇 실시형태에서, FVIII 단백질과 VWF 단편 사이의 회합 또는 연결은 공유 결합, 예를 들면, 펩타이드 결합, 하나 이상의 아미노산 또는 이황화 결합이다. 소정의 실시형태에서, 부수적 모이어티와 FVIII 단백질 사이의 회합(즉, 연결)은 펩타이드 결합 또는 FVIII 단백질과 VWF 단편 사이의 링커("FVIII/VWF 링커")이다. 링커의 비제한적인 예는 본 명세서에서 그외 기재되어 있다. 몇몇 실시형태에서, VWF 단편은 적어도 약 10개, 100개, 200개, 300개, 400개, 500개, 600개, 700개, 800개, 900개, 1000개, 1100개, 1200개, 1300개, 1400개, 1500개, 1600개, 1700개, 1800개, 1900개, 2000개, 2500개, 3000개 또는 4000개의 아미노산를 포함하거나, 이것으로 실질적으로 이루어지거나, 이것으로 이루어진 폴리펩타이드이다. VWF 단편의 비제한적인 예는 본 명세서에서 그외 기재되어 있다.

[0154] 소정의 실시형태에서, VWF 단편은 FVIII 단백질 상의 하나 이상의 VWF 결합 자리에 화학적으로(예를 들면, 비공유로) 결합하거나 이를 물리적으로 차단한다. FVIII 단백질 상의 VWF 결합 자리는 FVIII 단백질의 A3 도메인 또는 C2 도메인 내에 위치한다. 또 다른 실시형태에서, FVIII 단백질 상의 VWF 결합 자리는 A3 도메인 및 C2 도메인 내에 위치한다. 예를 들면, FVIII 단백질 상의 VWF 결합 자리는 서열 번호 4[전장 성숙 FVIII]의 1669번 내지 1689번 및/또는 2303번 내지 2332번 아미노산에 상응할 수 있다.

[0155] 본 발명은 또한 하나 이상의 XTEN 서열을 추가로 포함하는 (FVIII 단백질 및 VWF 단편을 포함하는) 키메라 단백

질을 제공하되, 이것은 추가의 반감기 연장 특성을 제공한다. 하나 이상의 XTEN 서열은 FVIII 단백질 또는 VWF 단편 내에 삽입되거나 FVIII 단백질 또는 VWF 단편의 N 말단 또는 C 말단에 연결될 수 있다. 본 발명은 또한 XTEN 서열(제1 반감기 연장 모이어티) 및 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(제2 반감기 연장 모이어티)에 연결된 FVIII 단백질을 포함하여, 2개의 반감기 연장 모이어티는 2개의 상이한 기전을 통해 FVIII 단백질의 반감기를 연장시킨다.

[0156] 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(예를 들면, 제1 FcRn 결합 파트너)에 연결된 FVIII 단백질, 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(예를 들면, 제2 FcRn 결합 파트너)에 연결된 VWF 단편 및 FVIII 단백질 또는 VWF 단편에 삽입되거나 연결된 하나 이상의 XTEN 서열을 포함하되, VWF 단편은 FVIII 반감기 제한 인자(예를 들면, 내인성 VWF)가 FVIII 단백질에 결합하는 것을 방지하고, 제1 및 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 공유 결합, 예를 들면, 이황화 결합을 형성하며, 하나 이상의 XTEN 서열은 FVIII 단백질의 반감기를 연장시킨다.

[0157] 소정의 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 임의의 링커(즉, FVIII/VWF 링커)에 의해 VWF 단편에 연결된 FVIII 단백질 및 FVIII 단백질 또는 VWF 단편에 삽입되거나 연결된 하나 이상의 XTEN 서열을 포함하되, VWF 단편은 FVIII 반감기 제한 인자(예를 들면, 내인성 VWF)가 FVIII 단백질에 결합하는 것을 방지하고, 하나 이상의 XTEN 서열은 FVIII 단백질의 반감기를 연장시킨다. 일 양상에서, 임의의 링커(FVIII/VWF 링커)는 소타제 인식 모티프를 포함한다. 또 다른 양상에서, 임의의 링커(FVIII/VWF 링커)는 개열 가능한 자리를 포함한다. 개열 링커(즉, 하나 이상의 개열 자리를 함유하는 링커)의 예는 본 명세서에서 그외 기재되어 있다.

[0158] 본 발명의 키메라 단백질은 하기를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다:

[0159] (1) D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 VWF 단편, XTEN 서열 및 FVIII(여기서, XTEN 서열은 VWF 단편에 연결됨);

[0160] (2) FVIII 단백질, XTEN 서열 및 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(여기서, FVIII 단백질은 XTEN 서열 및 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 연결됨), 또는

[0161] (3) FVIII 단백질, XTEN 서열 및 VWF 단편(여기서, XTEN 서열은 C 말단 또는 N 말단에서 FVIII 단백질에 연결되거나 FVIII의 하나 이상의 아미노산(예를 들면, 하나 이상의 XTEN 삽입 자리)의 바로 하류에 삽입되고, VWF 단편 및 FVIII 단백질은 서로 회합됨).

[0162] **(1) XTEN에 연결된 폰 빌레브란트 인자(VWF) 단편 및 FVIII**

[0163] 본 발명은 (ⅰ) VWF의 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 VWF 단편, (ii) XTEN 서열 및 (iii) FVIII 단백질을 포함하는 키메라 단백질에 관한 것으로, 여기서 (ⅰ), (ii) 및 (iii)은 서로 연결되거나 회합된다. 본 발명에서 키메라 단백질의 일부로서, XTEN 서열에 연결된 VWF 단편은 FVIII 단백질과 회합되어, 내인성 VWF와 FVIII 단백질 사이의 상호작용을 방지하거나 억제한다. 소정의 실시형태에서, FVIII 단백질과 내인성 VWF의 결합을 방지하거나 억제할 수 있는 VWF 단편은 동시에 적어도 하나의 VWF 유사 FVIII 보호 특성을 가질 수 있다. VWF 유사 FVIII 보호 특성의 예는 프로테아제 개열 및 FVIII 활성화로부터 FVIII을 보호하는 것, FVIII 중쇄 및/또는 경쇄를 안정화시키는 것 및 스캐빈저 수용체에 의한 FVIII의 청소를 방지하는 것을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 그 결과, VWF 단편은 VWF 청소 경로를 통한 FVIII 단백질의 청소를 방지하여, 순환계로부터 FVIII의 청소를 감소시킬 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 VWF 단편은 FVIII 단백질에 결합하거나 이것과 회합되고/되거나 FVIII 단백질 상의 VWF 결합 자리를 물리적으로 또는 화학적으로 차단한다. VWF 단편과 회합된 FVIII 단백질은 따라서 야생형 FVIII 또는 VWF 단편과 회합되지 않는 FVIII과 비교하여 더 천천히 순환으로부터 청소된다.

[0164] 일 실시형태에서, 본 발명은 (ⅰ) VWF의 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 VWF 단편, (ii) XTEN 서열 및 (iii) FVIII 단백질을 포함하는 키메라 단백질에 관한 것으로, 여기서 XTEN 서열은 VWF 단편에 연결되고(예를 들면, (a1) V-X 또는 (a2) X-V, 여기서 V는 VWF 단편을 포함하고 X는 XTEN 서열을 포함함), VWF 단편은 FVIII 단백질에 연결되거나 이것과 회합된다. 또 다른 실시형태에서, VWF 단편 및 XTEN 서열은 링커 또는 펩타이드 결합에 의해 연결될 수 있다(예를 들면, (a3) V-L-X 또는 (a4) X-L-V). 링커는 개열 가능한 링커, 예를 들면, 응고 자리에서 개열될 수 있는 트롬빈 개열 가능한 링커일 수 있다. 다른 실시형태에서, VWF 단편, XTEN 서열 및 FVIII 단백질은 단일 폴리펩타이드 사슬에 위치한다. 또 다른 실시형태에서, 키메라 단백질은 2개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하되, 제1 사슬은 VWF 단편 및 XTEN 서열을 포함하고, 제2 사슬은 FVIII 단백질을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 키메라 단백질은 3개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하되, 제1 사슬은 VWF 단편 및 XTEN 서열을 포

함하고, 제2 사슬은 FVIII의 경쇄를 포함하며, 제3 사슬은 FVIII의 중쇄를 포함하고, 제1 사슬 및 제2 사슬은 서로 회합(예를 들면, 공유 결합, 예를 들면, 이황화 결합)되고, 제2 사슬 및 제3 사슬은 서로 회합(예를 들면, 금속 결합)된다. 또 다른 실시형태에서, XTEN 서열은 VWF 단편의 N 말단 또는 C 말단에 연결되거나 VWF 단편에서 하나 이상의 아미노산의 바로 하류에 삽입될 수 있다.

[0165] 소정의 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은,

[0166] (a) V-X-FVIII,

[0167] (b) FVIII-X-V,

[0168] (c) V-X:FVIII,

[0169] (d) X-V:FVIII,

[0170] (e) FVIII:V-X,

[0171] (f) FVIII:X-V, 또는

[0172] (a5) X-V-FVIII

[0173] 을 포함하는 식을 포함하되,

[0174] 식 중, V는 VWF 단편을 포함하고,

[0175] X는 하나 이상의 XTEN 서열을 포함하며,

[0176] FVIII은 FVIII 단백질을 포함하고,

[0177] (-)는 펩타이드 결합 또는 하나 이상의 아미노산을 나타내며,

[0178] (:)은 화학적 회합 또는 물리적 회합이다. 일 실시형태에서, (:)은 화학적 회합, 예를 들면, 적어도 하나의 비펩타이드 결합을 나타낸다. 또 다른 실시형태에서, 화학적 회합, 즉 (:)은 공유 결합이다. 다른 실시형태에서, 화학적 회합, 즉 (:)은 비공유 상호작용, 예를 들면, 이온 상호작용, 소수성 상호작용, 친수성 상호작용, 반 데르 발스 상호작용 또는 수소 결합이다. 다른 실시형태에서, (:)은 비펩타이드 공유 결합이다. 또 다른 실시형태에서, (:)은 펩타이드 결합이다. 또 다른 실시형태에서, (:)은 2개의 서열 사이의 물리적 회합을 나타내고, 제1 서열의 일부는 제2 서열에 매우 근접하여, 제1 서열은 제2 서열의 일부가 또 다른 모이어티와 상호작용하는 것을 차폐하거나 차단하고, 추가로 제2 서열이 다른 모이어티와 상호작용하는 것을 허용하지 않으면서 물리적 회합은 유지된다. 본 명세서의 폴리펩타이드 식의 배향은 N 말단(왼쪽)으로부터 C 말단(오른쪽)으로 기재되어 있다. 예를 들면, V-X-FVIII 식은 NH2-V-X-FVIII-COOH 식을 의미한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 식은 2개의 모이어티 사이의 임의의 추가의 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, V-X-FVIII 식은, 달리 기재되지 않은 한, V와 X 사이의 V의 N 말단에서, X와 FVIII 사이에 또는 FVIII의 C 말단에서 임의의 서열을 추가로 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 하이픈(-)은 펩타이드 결합을 나타낸다.

[0179] 다른 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은,

[0180] (a) V(X1)-X2-FVIII,

[0181] (b) FVIII-X2-V(X1),

[0182] (c) V(X1):FVIII,

[0183] (d) FVIII:V(X1), 또는

[0184] (a5) X2-V(X1)-FVIII

[0185] 을 포함하는 식을 포함하되,

[0186] 식 중, V(X1)는 VWF 단편 및 제1 XTEN 서열(X1)을 포함하고,

[0187] XTEN 서열은 VWF 단편에서 하나 이상의 아미노산의 바로 하류에 삽입되며,

[0188] X2는 하나 이상의 임의의 XTEN 서열을 포함하고,

[0189] FVIII은 FVIII 단백질을 포함하며,

[0190] (-)는 펩타이드 결합 또는 하나 이상의 아미노산이고,

[0191] (:)은 화학적 회합 또는 물리적 회합이다.

[0192] 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질은 (ⅰ) VWF의 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 VWF 단편, (ii) XTEN 서열, (iii) FVIII 단백질, (iv) 제1 임의의 링커 및 (ⅴ) 제2 임의의 링커를 포함하되, XTEN 서열은 링커에 의해 VWF 단편 및/또는 FVIII 단백질에 연결된다. 소정의 실시형태에서, 키메라 단백질은,

[0193] (b1) V-L1-X-L2-FVIII,

[0194] (b2) FVIII-L2-X-L1-V,

[0195] (b3) V-L1-X:FVIII,

[0196] (b4) X-L1-V:FVIII,

[0197] (b5) FVIII:V-L1-X,

[0198] (b6) FVIII:X-L1-V,

[0199] (b7) X-L1-V-L2-FVIII, 또는

[0200] (b8) FVIII-L2-V-L1-X

[0201] 를 포함하는 식을 포함하되,

[0202] 식 중, V는 VWF 단편을 포함하고,

[0203] X는 하나 이상의 XTEN 서열을 포함하며,

[0204] FVIII은 FVIII 단백질을 포함하고,

[0205] L1은 제1 임의의 링커, 예를 들면, 제1 개열 가능한 링커를 포함하며,

[0206] L2는 제2 임의의 링커, 예를 들면, 제2 개열 가능한 링커 또는 임의의 처리 가능한 링커를 포함하고,

[0207] (-)는 펩타이드 결합 또는 하나 이상의 아미노산이며,

[0208] (:)은 화학적 회합 또는 물리적 회합이다. 일 실시형태에서, (:)은 화학적 회합, 예를 들면, 적어도 하나의 비펩타이드 결합을 나타낸다. 또 다른 실시형태에서, 화학적 회합, 즉 (:)은 공유 결합이다. 다른 실시형태에서, 화학적 회합, 즉 (:)은 비공유 상호작용, 예를 들면, 이온 상호작용, 소수성 상호작용, 친수성 상호작용, 반 데르 발스 상호작용 또는 수소 결합이다. 다른 실시형태에서, (:)은 비펩타이드 공유 결합이다. 또 다른 실시형태에서, (:)은 펩타이드 결합이다. 또 다른 실시형태에서, (:)은 2개의 서열 사이의 물리적 회합을 나타내고, 제1 서열의 일부는 제2 서열에 매우 근접하여, 제1 서열은 제2 서열의 일부가 또 다른 모이어티와 상호작용하는 것을 차폐하거나 차단하고, 추가로 제2 서열이 다른 모이어티와 상호작용하는 것을 허용하지 않으면서 물리적 회합은 유지된다. 본 명세서의 폴리펩타이드 식의 배향은 N 말단(왼쪽)으로부터 C 말단(오른쪽)으로 기재되어 있다. 예를 들면, (b1) V-L1-X-L2-FVIII 식은 NH2-V-L1-X-L2-FVIII-COOH 식을 의미한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 식은 2개의 모이어티 사이의 임의의 추가의 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 하이픈(-)은 펩타이드 결합을 나타낸다.

[0209] 본 발명의 또 다른 양상은 FVIII 반감기 제한 인자, 예를 들면, 내인성 VWF와의 상호작용이 감소하거나 이를 갖지 않고, 동시에 FVIII 단백질과 VWF 단편 사이의 공유 결합을 제공하는 제2 반감기 연장제 또는 모이어티, 예를 들면, Ig 불변 구역 또는 이의 일부와 조합하여 XTEN 서열(제1 반감기 연장제)을 사용하여 FVIII 단백질의 반감기를 최대화시키는 FVIII 키메라 단백질을 제공하는 것이다. 일 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 (ⅰ) VWF의 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 VWF 단편, (ii) XTEN 서열, (iii) FVIII 단백질 및 (iv) Ig 불변 구역 또는 이의 일부(또한 본 명세서에서 F라 칭함)를 포함하되, (1) VWF 단편은 임의의 링커, 예를 들면, 개열 가능한 링커에 의해 XTEN 서열에 연결되고, (2) VWF 단편은 추가의 임의의 링커, 예를 들면, 개열 가능한 링커에 의해 FVIII 단백질과 회합되거나 이것에 연결되며, (3) Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 VWF 단편, XTEN 서열 또는 FVIII 단백질에 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 (ⅰ) VWF의 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 VWF 단편, (ii) XTEN 서열, (iii) FVIII 단백질, (iv) Ig 불변 구역 또는 이의 일부(F1 또는 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부) 및 (ⅴ) 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(F2 또는 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부)를 포함하되, (1) VWF 단편은 임의의 링커, 예를 들면, 개열 가능한 링커에 의해 XTEN 서

열에 연결되고, (2) XTEN 서열 또는 VWF 단편은 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 연결되며, (3) FVIII은 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 연결되고, (4) Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부와 회합되거나 이것에 연결된다. 일 실시형태에서, 2개의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부 사이의 회합 또는 연결은 공유 결합, 예를 들면, 이황화 결합이다. 또 다른 실시형태에서, 2개의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부 사이의 회합 또는 연결은 처리 가능한 링커이고, 처리 가능한 링커는 프로테아제에 의해 세포내 처리된다. 예를 들면, 키메라 단백질은,

[0210] (g) V-L2-X-L1-F1:FVIII-L3-F2;

[0211] (h) V-L2-X-L1-F1:F2-L3-FVIII;

[0212] (i) F-L1-X-L2-V:FVIII-L3-F2;

[0213] (j) F-L1-X-L2-V:F2-L3-FVIII;

[0214] (k) V-L2-X-L1-F1-L4-FVIII-L3-F2;

[0215] (l) F2-L3-FVIII-L4-F1-L1-X-L2-V;

[0216] (m) FVIII-L2-F2-L4-V-L2-X-L1-F1; 또는

[0217] (n) F1-L1-X-L2-V-L4-F2-L2-FVIII

[0218] 을 포함하는 식을 포함하되,

[0219] 식 중, V는 VWF 단편을 포함하고,

[0220] L1 및 L3은 각각 임의의 링커를 포함하며,

[0221] L2는 임의의 링커, 예를 들면, 개열 가능한 링커를 포함하고,

[0222] L4는 임의의 링커, 예를 들면, 처리 가능한 링커이며,

[0223] FVIII은 FVIII 단백질을 포함하고,

[0224] X는 하나 이상의 XTEN 서열을 포함하며,

[0225] F1은 임의의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 포함하고,

[0226] F2는 임의의 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 포함하며,

[0227] (-)는 펩타이드 결합 또는 하나 이상의 아미노산이고,

[0228] (:)은 화학적 회합 또는 물리적 회합이다.

[0229] 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 임의의 작제물 또는 식에서의 FVIII 단백질은 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개 또는 적어도 6개의 XTEN 서열을 추가로 포함할 수 있고, XTEN 서열은 각각 FVIII 단백질 내의 하나 이상의 아미노산의 바로 하류에 삽입되거나 FVIII 단백질의 N 말단 또는 C 말단에 연결된다. XTEN 삽입 자리의 비제한적인 예는 본 명세서에서 그외 개시되어 있다.

[0230] 일 실시형태에서, (:)은 화학적 회합, 예를 들면, 적어도 하나의 비펩타이드 결합을 나타낸다. 또 다른 실시형태에서, 화학적 회합, 즉 (:)은 공유 결합이다. 다른 실시형태에서, 화학적 회합, 즉 (:)은 비공유 상호작용, 예를 들면, 이온 상호작용, 소수성 상호작용, 친수성 상호작용, 반 데르 발스 상호작용 또는 수소 결합이다. 다른 실시형태에서, (:)은 비펩타이드 공유 결합이다. 또 다른 실시형태에서, (:)은 펩타이드 결합이다. 또 다른 실시형태에서, (:)은 2개의 서열 사이의 물리적 회합을 나타내고, 제1 서열의 일부는 제2 서열에 매우 근접하여, 제1 서열은 제2 서열의 일부가 또 다른 모이어티와 상호작용하는 것을 차폐하거나 차단하고, 추가로 제2 서열이 다른 모이어티와 상호작용하는 것을 허용하지 않으면서 물리적 회합은 유지된다. 본 명세서의 폴리펩타이드 식의 배향은 N 말단(왼쪽)으로부터 C 말단(오른쪽)으로 기재되어 있다. 예를 들면, (n) F1-L1-X-L2-V-L4-F2-L2-FVIII 식은 NH2-F1-L1-X-L2-V-L4-F2-L2-FVIII-COOH 식을 의미한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 식은 2개의 모이어티 사이의 임의의 추가의 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 하이픈(-)은 펩타이드 결합을 나타낸다.

[0231] 일 실시형태에서, Ig 불변 구역 또는 이의 일부(때때로 본 명세서에서 "F" 또는 "F1"로 표시됨) 중 어느 하나 또는 둘 다, 및 VWF 단편 또는 FVIII 단백질에 연결된 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(때때로 본 명세서에

서 "F2"로 표시됨)는 VWF 단편, FVIII 단백질 또는 둘 다의 반감기를 연장시킬 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 한 쌍의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(때때로 본 명세서에서 "F" 또는 "F1"로 표시됨) 및 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(때때로 본 명세서에서 "F2"로 표시됨)(이들 중 각각은 VWF 단편 및 FVIII 단백질에 연결됨)는 FVIII 단백질과 VWF 단편 사이의 비공유 결합보다 강한 결합, 즉 공유 결합, 예를 들면, 이황화 결합을 제공하여, 내인성 VWF가 *생체내* VWF 단편을 대체하는 것을 방지한다. F1 또는 F2는 Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, VWF 단편 및/또는 FVIII 단백질에 연결된 F1 및 F2 중 어느 하나 또는 둘 다는 F1과 F2 사이에 공유 결합(예를 들면, 이황화 결합)을 형성하여, FVIII 단백질과 VWF 단편의 상호작용을 방지하기에 매우 근접하게 VWF 단편 및 FVIII 단백질은 위치한다. 몇몇 실시형태에서, F1 및 F2는 동일하거나 상이하다. F1 및 F2의 비제한적인 예는 CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인, CH4 도메인, 힌지 도메인, 임의의 기능성 단편, 유도체 또는 이들의 유사체, 및 이들의 2개 이상의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, F1, F2 또는 둘 다는 적어도 하나의 CH1 도메인, 적어도 하나의 CH2 도메인, 적어도 하나의 CH3 도메인, 적어도 하나의 CH4 도메인, 또는 기능성 단편, 유도체 또는 이들의 유사체를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, F1, F2 또는 둘 다는 (예를 들면, 힌지-CH2 배향에서) 적어도 하나의 힌지 도메인 또는 이의 일부 및 적어도 하나의 CH2 도메인 또는 이의 일부를 포함한다. 다른 실시형태에서, F1, F2 또는 둘 다는 (예를 들면, CH2-CH3 배향에서) 적어도 하나의 CH2 도메인 또는 이의 일부 및 적어도 하나의 CH3 도메인 또는 이의 일부를 포함한다. 조합의 예는 CH2 도메인, CH3 도메인 및 힌지 도메인을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않고, 이는 또한 Fc 구역(또는 Fc 도메인), 예를 들면, F1에 대한 제1 Fc 구역 또는 제1 FcRn 결합 파트너 및 F2에 대한 제2 Fc 구역 또는 제2 FcRn 결합 파트너로 공지되어 있다. 다른 실시형태에서, F1은 링커에 의해 VWF 단편에 연결되고/되거나, F2는 링커에 의해 FVIII 단백질에 연결된다. 몇몇 실시형태에서, F1 및/또는 F2는 힌지 구역을 포함하거나, 이것으로 실질적으로 이루어지거나, 이것으로 이루어진다. Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너의 추가의 비제한적인 예는 본 명세서에서 그외 기재되어 있다.

[0232] 소정의 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 2개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하고, 제1 폴리펩타이드 사슬은 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 VWF 단편, XTEN 서열, 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(예를 들면, 제1 Fc 구역), 및 VWF 단편과 XTEN 서열 또는 XTEN 서열 또는 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부 사이의 임의의 링커를 포함하거나, 이들로 실질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어지고, 제2 폴리펩타이드 사슬은 FVIII 단백질 및 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(예를 들면, 제2 Fc 구역)를 포함하거나, 이들로 실질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어진다. VWF 단편과 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부 사이의 링커는 개열 가능한 링커, 예를 들면, 응고 자리에서 개열될 수 있는 트롬빈 개열 가능한 링커일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드 사슬 및 제2 폴리펩타이드 사슬은 서로 회합된다. 제1 사슬과 제2 사슬 사이의 회합은 *생체내* 내인성 VWF에 의한 VWF 단편을 포함하는 제1 사슬의 교체를 방지한다. 일 실시형태에서, 제1 사슬과 제2 사슬 사이의 회합은 공유 결합일 수 있다. 특정한 실시형태에서, 공유 결합은 이황화 결합이다. 몇몇 실시형태에서, 제2 사슬에서의 FVIII 단백질은 FVIII 단백질의 C 말단 또는 N 말단에 연결되거나, FVIII 단백질 내의 하나 이상의 아미노산(예를 들면, 본 명세서에 개시된 적어도 하나의 삽입 자리)의 바로 하류에 삽입된 하나 이상의 XTEN 서열을 추가로 포함한다. 삽입 자리의 비제한적인 예는 본 명세서에서 그외 기재되어 있다.

[0233] 다른 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 3개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하고, 제1 폴리펩타이드 사슬은 FVIII 단백질의 중쇄를 포함하거나, 이것으로 실질적으로 이루어지거나, 이것으로 이루어지고, 제2 폴리펩타이드 사슬은 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(예를 들면, 제1 Fc 구역)에 융합된 FVIII 단백질의 경쇄를 포함하거나, 이것으로 실질적으로 이루어지거나, 이것으로 이루어지며, 제3 폴리펩타이드 사슬은 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 VWF 단편, XTEN 서열, 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(예를 들면, 제2 Fc 구역), 및 XTEN 서열과 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부 또는 VWF 단편 및 XTEN 서열 사이의 임의의 링커를 포함하거나, 이들로 실질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어진다. 제3 사슬에서의 링커는 응고 자리에서 개열된 개열 가능한 링커, 예를 들면, 트롬빈 개열 자리일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 중쇄 FVIII 또는 경쇄 FVIII은 하나 이상의 XTEN 서열에 연결되고, 이것은 N 말단, C 말단에 연결되거나, FVIII 서열 내의 하나 이상의 삽입 자리 내에 삽입될 수 있다. 삽입 자리의 비제한적인 예는 본 명세서에서 그외 개시되어 있다.

[0234] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 2개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하되, 제1 폴리펩타이드 사슬은 FVIII 단백질의 중쇄를 포함하거나, 이것으로 실질적으로 이루어지거나, 이것으로 이루어지고, 제2 폴리펩타이드 사슬은 FVIII 단백질의 경쇄, 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(예를 들면, 제1 Fc 구역), 제1 링커(예를 들면, 하나 이상의 세포내 처리 자리를 포함하는 하나 이상의 프로테아제 개열 자리를 포함하는 처리 가능한 링커), VWF 단편, 제2 링커(예를 들면, 트롬빈 개열 가능한 링커), XTEN 서열 및 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(예를 들면, 제2 Fc 구역)를 포함하거나, 이들로 실질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어지며, FVIII 단백

질의 경쇄는 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(예를 들면, 제1 Fc 구역)에 연결되고, 이것은 제1 링커에 의해 VWF 단편에 추가로 연결되며, VWF 단편은 XTEN 서열에 연결되고, 이것은 제2 링커에 의해 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 추가로 연결된다. 소정의 실시형태에서, 제1 링커는 처리 가능한 링커이고, 제2 링커는 개열 가능한 링커이다. 발현 시, 키메라 단백질은 처리 가능한 링커를 개열시키는 세포내 처리 효소에 의해 처리될 수 있고, 따라서 키메라 단백질은 3개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하거나, 이들로 실질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어질 수 있다. 또한, VWF 단편은 개열 가능한 링커로 인해 응고 자리에서 개열될 수 있다.

[0235] 소정의 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 1개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하고, 이 사슬은 단일 사슬 FVIII 단백질, 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(예를 들면, 제1 Fc 구역), 제1 링커(예를 들면, 처리 가능한 링커), VWF 단편, XTEN 서열, 제2 링커(예를 들면, 트롬빈 개열 가능한 링커) 및 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(예를 들면, 제2 Fc 구역)를 포함하고, 단일 사슬 FVIII 단백질은 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 연결되고, 이것은 제1 링커에 의해 VWF 단편에 또한 연결되고, VWF 단편은 XTEN 서열에 연결되고, 이것은 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 추가로 연결된다. 일 실시형태에서, VWF 단편 및 XTEN 서열은 제2 링커에 의해 연결된다. 또 다른 실시형태에서, XTEN 서열 및 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 제2 링커에 의해 연결된다. 다른 실시형태에서, 제2 사슬은 제3 링커를 추가로 포함한다. 단일 폴리펩타이드 사슬은 따라서 제2 링커에 의해 XTEN 서열에 연결된 VWF 단편 및 제3 링커에 의해 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 연결된 XTEN을 포함할 수 있다. 제2 링커 및 제3 링커는 동일하거나 상이할 수 있다. 일 실시형태에서, 제1 링커는 처리 가능한 링커이다. 또 다른 실시형태에서, 제2 링커 또는 제3 링커는 1개 또는 2개의 개열 가능한 자리를 포함하는 개열 가능한 링커이다. 특정한 실시형태에서, 제2 링커는 트롬빈 개열 가능한 링커이다. 본 발명에 유용한 링커는 본 명세서에서 그외 기재되어 있다.

[0236] **(2) FVIII, XTEN 및 Fc**

[0237] 본 발명의 키메라 단백질은 또한 (i) FVIII 단백질, (ii) XTEN 서열(제1 반감기 연장제) 및 (iii) Ig 불변 구역 또는 이의 일부(제2 반감기 연장제)를 포함하되, XTEN 서열은 임의의 링커에 의해 FVIII 단백질에 연결되고 추가의 임의의 링커에 의해 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 연결된다. XTEN 서열 및 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 FVIII 단백질의 반감기를 연장시키도록 함께 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 키메라 단백질은 단량체이다. 또 다른 실시형태에서, 키메라 단백질은 이합체(동종이합체 또는 이종이합체)이다.

[0238] 본 발명은 또한 (i) FVIII 단백질, (ii) XTEN 서열, (iii) Ig 불변 구역 또는 이의 일부(즉, 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부, "F," 또는 "F1") 및 (iv) 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(즉, 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부 또는 "F2")를 포함하는 키메라 단백질에 관한 것이다. 일 실시형태에서, XTEN 서열은 C 말단 또는 N 말단에서 FVIII 단백질에 연결되거나, FVIII 단백질 내의 하나 이상의 아미노산(예를 들면, 하나 이상의 XTEN 삽입 자리)의 바로 하류에 삽입되고, FVIII 단백질은 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 연결되고, 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부 및 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 임의의 링커에 의해 서로 회합되거나 서로에 연결된다. 소정의 양상에서, 키메라 단백질은 제1 폴리펩타이드 사슬 및 제2 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 단량체-이합체 하이브리드이고, 제1 폴리펩타이드 사슬은 FVIII 단백질, XTEN 서열 및 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 포함하며, 제2 폴리펩타이드 사슬은 FVIII 단백질 없이 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 포함하거나, 이것으로 실질적으로 이루어지거나, 이것으로 이루어지고, 제1 사슬 및 제2 사슬은 서로 회합된다. Ig 불변 구역 또는 이의 일부(예를 들면, 제1 Fc 구역)와 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(예를 들면, 제2 Fc 구역) 사이의 회합은 화학적 회합 또는 물리적 회합이다. 소정의 실시형태에서, 화학적 회합은 공유 결합이다. 다른 실시형태에서, 화학적 회합은 비공유 상호작용, 예를 들면, 이온 상호작용, 소수성 상호작용, 친수성 상호작용, 반 데르 발스 상호작용 또는 수소 결합이다. 다른 실시형태에서, 회합은 비펩타이드 공유 결합이다. 또 다른 실시형태에서, 회합은 펩타이드 결합이다.

[0239] 다른 양상에서, 키메라 단백질은 FVIII 단백질, XTEN 서열, 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부, 링커, 예를 들면, 처리 가능한 링커 및 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 포함하는 단일 폴리펩타이드 사슬이며, 단일 폴리펩타이드 사슬은 세포내 효소에 의해 발현 후 처리되고 2개의 폴리펩타이드 사슬이 된다.

[0240] 일 실시형태에서, FVIII 단백질에 연결된 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(때때로 본 명세서에서 "F" 또는 "F1"로 표시됨)는 XTEN 서열과 함께 FVIII 단백질의 반감기를 연장시킬 수 있다. 또 다른 실시형태에서, Ig 불변 구역 또는 이의 일부("F" 또는 "F1")는 본 명세서에서 그외 기재된 Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너이다.

[0241] 다른 실시형태에서, 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부와 회합되거나 이것에 연결된 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(때때로 본 명세서에서 "F2" 또는 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부로 표시됨)는 또한 FVIII 단백질의

반감기를 연장시킬 수 있다. 다른 실시형태에서, 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부 및 XTEN 서열과 함께 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부("F2")는 FVIII 단백질의 반감기를 연장시킬 수 있다. 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 본 명세서에서 그외 기재된 Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너일 수 있다.

[0242] 소정의 실시형태에서, 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부와 회합된 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 본 명세서에서 그외 기재된 VWF 단편 및 임의의 XTEN 서열에 추가로 연결된다.

[0243] 몇몇 실시형태에서, Ig 불변 구역 또는 이의 일부("F" 또는 "F1" 또는 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부) 및 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(즉, 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부 또는 "F2")(이 문단에서 "Ig 불변 구역 또는 이의 일부"로 표시됨) 중 어느 하나 또는 둘 다는 CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인, CH4 도메인, 힌지 도메인, 이들의 임의의 기능성 단편, 유도체 또는 유사체, 또는 이들의 2개 이상의 조합(이들로 제한되지는 않음)을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 적어도 하나의 CH1 도메인, 적어도 하나의 CH2 도메인, 적어도 하나의 CH3 도메인, 적어도 하나의 CH4 도메인 또는 이들의 기능성 단편, 유도체 또는 유사체를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 (예를 들면, 힌지-CH2 배향에서) 적어도 하나의 힌지 도메인 또는 이의 일부 및 적어도 하나의 CH2 도메인 또는 이의 일부를 포함한다. 다른 실시형태에서, Ig 불변 도메인 또는 이의 일부는 (예를 들면, CF2-CH3 배향에서) 적어도 하나의 CH2 도메인 또는 이의 일부 및 적어도 하나의 CH3 도메인 또는 이의 일부를 포함한다. 조합의 예는 CH2 도메인, CH3 도메인 및 힌지 도메인(또한 Fc 구역(또는 Fc 도메인), 예를 들면, 제1 Fc 구역으로 공지됨)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. Ig 불변 구역 또는 이의 일부의 추가의 예는 본 명세서에서 그외 기재되어 있다.

[0244] 본 발명의 키메라 단백질은 야생형 FVIII과 비교하여 FVIII 단백질의 연장된 반감기를 가질 수 있다. 일 실시형태에서, FVIII 단백질의 반감기는 야생형 FVIII의 반감기보다 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 적어도 약 11배 또는 적어도 약 12배 길게 연장된다. 또 다른 실시형태에서, FVIII 단백질의 반감기는 적어도 약 10시간, 적어도 약 11시간, 적어도 약 12시간, 적어도 약 13시간, 적어도 약 14시간, 적어도 약 15시간, 적어도 약 16시간, 적어도 약 17시간, 적어도 약 18시간, 적어도 약 19시간, 적어도 약 20시간, 적어도 약 21시간, 적어도 약 22시간, 적어도 약 23시간, 적어도 약 24시간, 적어도 약 36시간, 적어도 약 48시간, 적어도 약 60시간, 적어도 약 72시간, 적어도 약 84시간, 적어도 약 96시간 또는 적어도 약 108시간이다.

[0245] **(3) FVIII, XTEN 및 VWF**

[0246] 일 양상에서, 본 발명의 키메라 단백질은 (ⅰ) FVIII 단백질, (ii) XTEN 서열 및 (iii) VWF의 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 VWF 단편을 포함하되, FVIII 단백질은 XTEN 서열에 연결되고, FVIII 단백질은 VWF 단편과 회합되거나 이것에 연결된다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 키메라 단백질의 VWF 단편은 VWF 청소 수용체에 결합 가능하지 않다. 또 다른 실시형태에서, VWF 단편은 하나 이상의 프로테아제 개열로부터 FVIII 단백질을 보호하거나, 활성화로부터 FVIII 단백질을 보호하거나, FVIII 단백질의 중쇄 및/또는 경쇄를 안정화시키거나, 하나 이상의 스캐빈저 수용체에 의해 FVIII 단백질의 청소를 방지할 수 있다. 다른 실시형태에서, VWF 단편은 FVIII 단백질 내의 VWF 결합 자리에 대한 내인성 VWF의 결합을 방지하거나 억제한다. VWF 결합 자리는 FVIII 단백질의 A3 도메인 또는 C2 도메인 또는 A3 도메인 및 C2 도메인 둘 다에 위치할 수 있다. 특정한 실시형태에서, VWF 결합 자리는 서열 번호 2의 1669번 내지 1689번 아미노산 및/또는 2303번 내지 2332번 아미노산에 해당하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0247] 또 다른 양상에서, 키메라 단백질은 (ⅰ) FVIII 단백질, (ii) XTEN 서열, (iii) VWF의 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 VWF 단편 및 (iv) Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 포함하되, XTEN 서열은 C 말단 또는 N 말단에서 FVIII 단백질에 연결되거나, FVIII 단백질 내의 하나 이상의 아미노산(예를 들면, 본 명세서에 개시된 하나 이상의 XTEN 삽입 자리)의 바로 하류에 삽입되고, VWF 단편은 FVIII 단백질 또는 XTEN 서열에 연결되거나 이것과 회합되며, Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 FVIII 단백질, XTEN 서열, VWF 단편 또는 이들의 임의의 조합에 연결된다. 본 발명의 키메라 단백질에 유용한 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 본 명세서에서 그외 기재되어 있다. 일 실시형태에서, Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 FVIII 단백질의 반감기를 연장시킬 수 있다. 또 다른 실시형태에서, Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 제1 Fc 구역 또는 제1 FcRn 결합 파트너를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 임의의 링커에 의해 FVIII 단백질에 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 링커는 개열 가능한 링커를 포함한다. 키메라 단백질은 (ⅰ), (ii), (iii) 및 (iv)를 포함하는 단일 폴리펩타이드 사슬, 즉 단량체(즉, 단일 사슬) 또는 (ⅰ) 및 (ii)를 포함하는 제1 사슬 및 (iii) 및 (iv)를 포함하는 제2 사슬

을 포함하는 2개의 사슬일 수 있다. 다른 양상에서, 키메라 단백질은 이합체(예를 들면, 단독이합체 또는 이종이합체)이다. 일 실시형태에서, 키메라 단백질은 각각 (ⅰ), (ii), (iii) 및 (iv)를 포함하는 2개의 사슬을 포함한다.

[0248] 소정의 실시형태에서, 키메라 단백질은 (ⅰ) FVIII 단백질, (ii) XTEN 서열, (iii) VWF의 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 VWF 단편, (iv) Ig 불변 구역 또는 이의 일부(때때로 또한 "F", "제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부" 또는 "F2"로 표시됨) 및 (v) 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(때때로 또한 "F2" 또는 "제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부"로 표시됨)를 포함하되, (1) FVIII 단백질은 FVIII 단백질의 C 말단 또는 N 말단에서 XTEN 서열에 연결되거나, FVIII 단백질 내의 하나 이상의 아미노산(예를 들면, 본 명세서에 개시된 하나 이상의 XTEN 삽입 자리)의 바로 하류에 삽입되고, (2) XTEN 서열 또는 FVIII 단백질 중 어느 하나는 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 연결되며, (3) VWF 단편은 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 연결되고, (4) Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부와 회합된다. 일 실시형태에서, FVII 단백질 또는 XTEN 서열에 연결된 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 링커, 예를 들면, 처리 가능한 링커에 의해 VWF 단편에 추가로 연결된다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질에 유용한 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 임의의 링커, 예를 들면, 처리 가능한 링커에 의해 FVIII 단백질 또는 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 추가로 연결될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 한 쌍의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부 및 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(이들 중 각각은 VWF 단편 및 FVIII 단백질에 연결됨)는 FVIII 단백질과 VWF 단편 사이의 비공유 결합보다 강한 결합, 즉 공유 결합, 예를 들면, 이황화 결합을 제공하여, 내인성 VWF가 *생체내* VWF 단편을 대체하는 것을 방지한다. 다른 실시형태에서, Ig 불변 구역 또는 이의 일부 및 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부 중 어느 하나 또는 둘 다는 FVIII 단백질 또는 VWF 단편의 반감기를 연장시킬 수 있다. 다른 실시형태에서, 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 제2 Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너를 포함한다. 키메라 단백질에서의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부 및 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 동일하거나 상이하다.

[0249] 소정의 실시형태에서, Ig 불변 구역 또는 이의 일부 및 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 화학적 회합 또는 물리적 회합에 의해 회합된다. 일 실시형태에서, 화학적 회합, 즉 (:)은 적어도 하나의 비펩타이드 결합이다. 소정의 실시형태에서, 화학적 회합, 즉 (:)은 공유 결합이다. 다른 실시형태에서, 화학적 회합, 즉 (:)은 비공유 상호작용, 예를 들면, 이온 상호작용, 소수성 상호작용, 친수성 상호작용, 반 데르 발스 상호작용 또는 수소 결합이다. 다른 실시형태에서, (:)은 비펩타이드 공유 결합이다. 또 다른 실시형태에서, (:)은 펩타이드 결합이다. 또 다른 실시형태에서, (:)은 2개의 서열 사이의 물리적 회합을 나타내고, 제1 서열의 일부는 제2 서열에 매우 근접하여, 제1 서열은 제2 서열의 일부가 또 다른 모이어티와 상호작용하는 것을 차폐하거나 차단한다. 몇몇 실시형태에서, Ig 불변 구역 또는 이의 일부와 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부 사이의 회합은, VWF 단편 또는 VWF 단편을 포함하는 폴리펩타이드의 교체를 방지하는, 공유 결합, 예를 들면, 이황화 결합일 수 있다. 따라서, FVIII 단백질과 내인성 VWF 사이의 상호작용의 방지는 FVIII 단백질에 대한 이 반감기 제한 인자를 제거하거나 감소시키고, 따라서 FVIII 단백질의 반감기는 VWF 단백질이 없는 FVIII 단백질 또는 야생형 FVIII과 비교하여 연장된다.

[0250] 다른 양상에서, 키메라 단백질은,

[0251] (1) FVIII(X1)-L1-F1:V-L2-X2-L3-F2;

[0252] (2) FVIII(X1)-L1-F1:F2-L3-X2-L2-V;

[0253] (3) F1-L1-FVIII(X1):V-L2-X2-L3-F2;

[0254] (4) F1-L1-FVIII(X1):F2-L3-X2-L2-V;

[0255] (5) FVIII(X1)-L1-F1-L4-V-L2-X2-L3-F2;

[0256] (6) FVIII(X1)-L1-F1-L4-F2-L3-X2-L2-V;

[0257] (7) F1-L1-FVIII(X1)-L4-V-L2-X2-L3-F2; 또는

[0258] (8) F1-L1-FVIII(X1)-L4-F2-L3-X2-L2-V

[0259] 를 포함하는 식을 포함하되,

[0260] 식 중, FVIII(X1)은 FVIII 단백질 및 하나 이상의 XTEN 서열을 포함하고,

[0261] 하나 이상의 XTEN 서열은 FVIII 단백질의 N 말단 또는 C 말단에 연결되거나, FVIII 단백질 내의 하나 이상의 아

미노산(예를 들면, 본 명세서에 개시된 하나 이상의 XTEN 삽입 자리)의 바로 하류에 삽입되며;

[0262] L1, L2 또는 L3은 각각 임의의 링커, 예를 들면, 개열 가능한 링커를 포함하고;

[0263] L4는 링커, 예를 들면, 처리 가능한 링커이며;

[0264] X2는 하나 이상의 임의의 XTEN 서열을 포함하고;

[0265] F1은 Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 포함하며;

[0266] F2는 임의의 추가의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 포함하고;

[0267] V는 VWF 단편을 포함하며;

[0268] (-)는 펩타이드 결합 또는 하나 이상의 아미노산이고;

[0269] (:)은 화학적 회합 또는 물리적 회합을 포함한다. 일 실시형태에서, (:)은 화학적 회합, 예를 들면, 적어도 하나의 비펩타이드 결합을 나타낸다. 또 다른 실시형태에서, 화학적 회합, 즉 (:)은 공유 결합이다. 다른 실시형태에서, 화학적 회합, 즉 (:)은 비공유 상호작용, 예를 들면, 이온 상호작용, 소수성 상호작용, 친수성 상호작용, 반 데르 발스 상호작용 또는 수소 결합이다. 다른 실시형태에서, (:)은 비펩타이드 공유 결합이다. 또 다른 실시형태에서, (:)은 펩타이드 결합이다. 또 다른 실시형태에서, (:)은 2개의 서열 사이의 물리적 회합을 나타내고, 제1 서열의 일부는 제2 서열에 매우 근접하여, 제1 서열은 제2 서열의 일부가 또 다른 모이어티와 상호작용하는 것을 차폐하거나 차단하고, 추가로 제2 서열이 다른 모이어티와 상호작용하는 것을 허용하지 않으면서 물리적 회합은 유지된다. 본 명세서의 폴리펩타이드 식의 배향은 N 말단(왼쪽)으로부터 C 말단(오른쪽)으로 기재되어 있다. 예를 들면, V-X-FVIII 식은 NH2-V-X-FVIII-COOH 식을 의미한다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 식은 2개의 모이어티 사이의 임의의 추가의 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, V-X-FVIII 식은, 달리 기재되지 않은 한, V와 X 사이의 V의 N 말단에서, X와 FVIII 사이에 또는 FVIII의 C 말단에서 임의의 서열을 추가로 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 하이픈(-)은 펩타이드 결합을 나타낸다.

[0270] 일 양상에서, 키메라 단백질은 2개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하되, (A) 제1 사슬은 (ⅰ) 단일 사슬 FVIII 단백질, (ⅱ) XTEN 서열 및 (ⅲ) 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부, 예를 들면, 제1 Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너를 포함하고, XTEN 서열은 N 말단 또는 C 말단에서 FVIII 단백질에 연결되거나, FVIII 단백질의 하나 이상의 아미노산(예를 들면, 본 명세서에 개시된 하나 이상의 XTEN 삽입 자리)의 바로 하류에 삽입되며, 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 XTEN 서열이 N 말단 또는 C 말단에서 FVIII 단백질에 연결될 때 XTEN 서열에 또는 XTEN 서열이 FVIII 단백질 내에 삽입될 때 FVIII 단백질에 연결되고, (B) 제2 사슬은 (ⅳ) D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 VWF 단편, (ⅴ) 링커 및 (ⅵ) 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부, 예를 들면, 제2 Fc 구역 또는 제2 FcRn 결합 파트너를 포함하고, VWF 단편은 링커, 예를 들면, 개열 가능한 링커에 연결되며, 이것은 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 추가로 연결되고, 제1 폴리펩타이드 사슬 및 제2 폴리펩타이드 사슬은 서로 회합되며, 예를 들면, 공유 결합, 예를 들면, 이황화 결합된다. 일 실시형태에서, 링커는 본 명세서에서 그외 기재된 개열 가능한 링커, 예를 들면, 트롬빈 개열 가능한 링커이다. 몇몇 실시형태에서, 제2 사슬은 (ⅳ)와 (ⅴ) 또는 (ⅴ)와 (ⅵ) 사이에 하나 이상의 XTEN 서열을 포함한다.

[0271] 다른 양상에서, 키메라 단백질은 (ⅰ) 단일 사슬 FVIII 단백질, (ⅱ) XTEN 서열, (ⅲ) 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부, 예를 들면, 제1 Fc 구역 또는 제1 FcRn 결합 파트너, (ⅳ) 제1 링커, (ⅴ) D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 VWF 단편, (ⅵ) 제2 링커 및 (ⅶ) 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부, 예를 들면, 제2 Fc 구역 또는 제2 FcRn 결합 파트너를 포함하는 1개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하되, (ⅰ) 내지 (ⅶ)은 순서대로 또는 임의의 순서로 연결된다. 일 실시형태에서, 제1 링커는 발현 후 세포내 처리되거나 개열될 수 있는 처리 가능한 링커이고, 단일 폴리펩타이드 사슬이 2개의 폴리펩타이드 사슬이 되게 한다. 또 다른 실시형태에서, 제2 링커는 본 명세서에 기재된 개열 가능한 링커, 예를 들면, 트롬빈 개열 가능한 링커이다. 본 명세서에 사용된 XTEN 서열은 FVIII 단백질의 N 말단 또는 C 말단에서 임의의 링커에 의해 FVIII 단백질에 연결되거나, FVIII 단백질 내의 하나 이상의 아미노산(예를 들면, 하나 이상의 XTEN 삽입 자리)의 바로 하류에 삽입될 수 있다.

[0272] 소정의 양상에서, 키메라 단백질은 3개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하되, (A) 제1 폴리펩타이드 사슬은 서로 연결된 (ⅰ) FVIII 단백질의 중쇄 및 (ⅱ) XTEN 서열을 포함하고, (B) 제2 폴리펩타이드 사슬은 서로 연결된 (ⅲ) FVIII 단백질의 경쇄 및 (ⅳ) 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부, 예를 들면, 제1 Fc 구역 또는 제1 FcRn 결합 파트너를 포함하며, (C) 제3 폴리펩타이드 사슬은 (ⅴ) D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 VWF 단편, (ⅵ) 링커 및 (ⅶ) 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부, 예를 들면, 제2 Fc 구역 또는 제2 FcRn 결합 파트너를 포함하고,

제2 사슬은 제1 사슬 및 제3 사슬과 회합된다. 일 실시형태에서, 제1 사슬과 제2 사슬 사이의 회합은 화학적 회합 또는 물리적 회합이다. 예를 들면, 제1 사슬과 제2 사슬 사이의 회합은 금속 결합일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 제2 사슬과 제3 사슬 사이의 회합은 또한 화학적 회합 또는 물리적 회합, 예를 들면, 공유 결합 또는 비공유 결합이다. 소정의 실시형태에서, 제2 사슬과 제3 사슬 사이의 회합은 2개의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 통하고, 이황화 결합이다. 제2 사슬과 제3 사슬 사이의 결합은 FVIII 단백질과 내인성 VWF의 결합을 방지하거나 억제하여, FVIII 단백질이 VWF 청소 경로에 의해 청소되는 것을 방지한다. 몇몇 실시형태에서, 링커는 숙주 세포에서 발현 후 세포내 개열된 처리 가능한 링커이다. 본 명세서에 사용된 XTEN 서열은 FVIII 단백질의 N 말단 또는 C 말단에서 임의의 링커에 의해 FVIII 단백질에 연결되거나, FVIII 단백질 내의 하나 이상의 아미노산(예를 들면, 하나 이상의 XTEN 삽입 자리)의 바로 하류에 삽입된다.

[0273] 소정의 실시형태에서, VWF 단편은 펩타이드 결합 또는 링커에 의해 하나 이상의 XTEN을 포함하는 FVIII 단백질에 직접 연결된다. 직접 연결(예를 들면, 펩타이드 결합) 또는 링커를 통해 하나 이상의 XTEN이 삽입되거나 연결되는, VWF 단편 및 FVIII 단백질을 연결하는 일 방식으로서, 효소 결찰(예를 들면, 소타제)을 이용할 수 있다. 예를 들면, 소타제는 카복실 말단 분류 신호를 인식하고 개열시킴으로써 표면 단백질을 변형시키는 일군의 원핵생물 효소를 의미한다. 소타제 효소의 대부분의 기질의 경우, 인식 신호는 모티프 LPXTG(Leu-Pro-any-Thr-Gly(서열 번호 51), 이어서 고 소수성 막관통 서열, 이어서 염기성 잔기, 예컨대 아르기닌의 클러스터로 이루어진다. 결찰 파트너의 활성 자리 Cys 잔기에 대한 Thr 잔기를 통한 일시적 부착, 이후 단백질을 세포벽에 공유 부착시키는 펩타이드 전이(transpeptidation)에 의해 Thr와 Gly 사이에 개열이 발생한다. 몇몇 실시형태에서, 결찰 파트너는 Gly(n)을 포함한다. 다른 실시형태에서, 키메라 단백질은 소타제 인식 모티프를 추가로 포함한다. 몇몇 실시형태에서, VWF 단편은 소타제 매개 *실험실내* 단백질 결찰을 이용하여 하나 이상의 XTEN이 삽입되거나 연결된 FVIII에 부착된다.

[0274] 일 실시형태에서, 임의의 링커에 의해 소타제 인식 모티프에 연결된 VWF 단편은 소타제에 의해 Gly(n)(n은 임의의 정수일 수 있음)에 연결된 FVIII 단백질에 융합될 수 있고, 하나 이상의 XTEN은 FVIII 단백질 내에 삽입되거나 이에 연결된다. 결찰 작제물은 VWF 단편(작제물의 N 말단 부분) 및 FVIII 단백질을 포함하고, 하나 이상의 XTEN은 삽입되거나 연결(작제물의 C 말단 부분)되며, 소타제 인식 모티프는 사이에 삽입된다. 또 다른 결찰 작제물은 VWF 단편(작제물의 N 말단 부분), 링커, 소타제 인식 모티프 및 FVIII 단백질을 포함하고, 하나 이상의 XTEN은 삽입되거나 연결(작제물의 C 말단 부분)된다. 또 다른 실시형태에서, 임의의 링커에 의해 소타제 인식 모티프에 연결된 FVIII 단백질은 소타제에 의해 Gly(n)(n은 임의의 정수일 수 있음)에 연결된 VWF 단편에 융합될 수 있다. 생성된 결찰 작제물은 FVIII 단백질(작제물의 N 말단 부분)(여기서, 하나 이상의 XTEN은 삽입되거나 연결됨) 및 VWF 단편(작제물의 C 말단 부분)을 포함하고, 소타제 인식 모티프는 사이에 삽입된다. 또 다른 생성된 결찰 작제물은 FVIII 단백질(작제물의 N 말단 부분)(여기서, 하나 이상의 XTEN은 삽입되거나 연결됨), 링커, 소타제 인식 모티프 및 VWF 단편(작제물의 C 말단 부분)을 포함한다. 다른 실시형태에서, 제1 임의의 링커에 의해 소타제 인식 모티프에 연결된 VWF 단편은, 제2 임의의 링커에 의해 트롬빈 개열 자리에 연결된, 비상동성 모이어티, 예를 들면, 면역글로불린 불변 구역 또는 이의 일부, 예를 들면, Fc 구역에 융합될 수 있다. 생성된 작제물은 VWF 단편(N 말단 부분), 제1 링커, 소타제 인식 모티프, 프로테아제 개열 자리, 제2 임의의 링커 및 비상동성 모이어티를 포함할 수 있다.

[0275] 몇몇 실시형태에서, VWF 단편은 FVIII 단백질과 회합된다. VWF 단편과 FVIII 단백질 사이의 회합은 화학적 회합 또는 물리적 회합일 수 있다. 화학적 회합은 비공유 상호작용, 예를 들면, 이온 상호작용, 소수성 상호작용, 친수성 상호작용, 반 데르 발스 상호작용 또는 수소 결합일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, FVIII 단백질과 VWF 단편 사이의 회합은 예를 들면 FVIII 단백질을 갖는 서열과 VWF 단편을 갖는 서열 사이의 추가의 회합으로 인해 2개의 서열 사이의 물리적 회합이고, 제1 서열의 일부는 제2 서열에 매우 근접하여, 제1 서열은 제2 서열의 일부가 또 다른 모이어티와 상호작용하는 것을 차폐하거나 차단한다.

[0276] VWF 단편에 의한 FVIII 단백질과의 내인성 VWF 상호작용을 방지하거나 억제하는 것의 결과로서, 본 명세서에 기재된 키메라 단백질은 야생형 FVIII 또는 VWF 단편이 없는 상응하는 키메라 단백질과 비교하여 연장된 반감기를 갖는다. 일 실시형태에서, FVIII 단백질의 반감기는 VWF 단편이 없는 FVIII 단백질보다 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 적어도 약 11배 또는 적어도 약 12배 길게 연장된다. 또 다른 실시형태에서, FVIII 단백질의 반감기는 적어도 약 10시간, 적어도 약 11시간, 적어도 약 12시간, 적어도 약 13시간, 적어도 약 14시간, 적어도 약 15시간, 적어도 약 16시간, 적어도 약 17시간, 적어도 약 18시간, 적어도 약 19시간, 적어도 약 20시간, 적어도 약 21시간, 적어도 약 22시간, 적어도 약 23시간, 적어도 약 24시간, 적

어도 약 36시간, 적어도 약 48시간, 적어도 약 60시간, 적어도 약 72시간, 적어도 약 84시간, 적어도 약 96시간 또는 적어도 약 108시간이다. 특정한 실시형태에서, FVIII 단백질의 반감기는 HemA 마우스에서 적어도 10시간, 적어도 약 11시간, 적어도 약 12시간, 적어도 약 13시간, 적어도 약 14시간, 적어도 약 15시간, 적어도 약 16시간, 적어도 약 17시간, 적어도 약 18시간, 적어도 약 19시간, 적어도 약 20시간, 적어도 약 21시간, 적어도 약 22시간, 적어도 약 23시간, 적어도 약 24시간, 적어도 약 25시간, 적어도 약 26시간 또는 적어도 약 27시간 연장된다.

[0277] **A) 폰 빌레브란트 인자(VWF) 단편**

[0278] VWF(또한 F8VWF로 공지됨)는 (바이벨펠라드 소체(Weibel-Palade body)에서) 내피, 거핵세포(혈소판의 α-과립) 및 내피하(subendothelian) 연결 조직에서 구성적으로 생성되고 혈액 혈장에 존재하는 대형 다합체 글라이코단백질이다. 염기성 VWF 단량체는 2813개의 아미노산 단백질이다. 모든 단량체는 특이적 기능을 갖는 다수의 특이적 도메인, (VIII 인자에 결합하는) D'/D3 도메인, (혈소판 GPIb-수용체, 헤파린 및/또는 가능하게는 콜라겐에 결합하는) A1 도메인, (콜라겐에 결합하는) A3 도메인, C1 도메인(여기서, RGD 도메인이 활성화될 때 이것은 혈소판 인테그린 αIIbβ3에 결합함) 및 단백질의 C 말단 끝에서의 "시스테인 매듭" 도메인(여기서, VWF는 혈소판 유래 성장 인자(PDGF), 형질전환 성장 인자-β(TGFβ) 및 β-인간 융모성 고나도트로핀(βHCG)과 공유함)을 포함한다.

[0279] 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "VWF 단편"은 FVIII에 대한 내인성 VWF의 결합을 억제할 수 있는 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 기능성 VWF 단편을 포함하지만, 이것으로 제한되지는 않는다. 일 실시형태에서, VWF 단편은 FVIII 단백질에 결합한다. 또 다른 실시형태에서, VWF 단편은 FVIII 단백질 상의 VWF 결합 자리를 차단하여, FVIII 단백질과 내인성 VWF의 상호작용을 억제한다. VWF 단편은 VWF의 이 활성을 보유하는 유도체, 변이체, 돌연변이체 또는 유사체를 포함한다.

[0280] 인간 VWF에 대한 2813개의 단량체 아미노산 서열은 유전자은행(Genbank)에서 수탁 번호 _NP_000543.2__로 등록되어 있다. 인간 VWF를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 유전자은행에서 수탁 번호 __NM_000552.3_으로 등록되어 있다. 인간 VWF의 뉴클레오타이드 서열은 서열 번호 1로 지칭된다. 서열 번호 2는 서열 번호 1에 의해 코딩된 아미노산 서열이다. VWF의 각각의 도메인은 표 1에 기재되어 있다.

표 1

VWF 서열

VWF 도메인	아미노산 서열
VWF 신호 펩타이드 (서열 번호 2 의 1 번 내지 22 번 아미노산)	1 MIPARFAGVL LALALILPGT LC 22
VWF D1D2 구역 (서열 번호 2 의 23 번 내지 763 번 아미노산)	23 AEGTRGRS STARCSLFGS 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 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 IQLPLLKGDL RIQHTVTASV RLSYGEDLQM 501 DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG 551 NAWKLHGDCQ DLQKQHSDPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS 601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCEL 651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD 701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD 751 AVLSSPLSHR SKR 763
VWF D' 도메인	764 SLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM 801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV 851 CRDRKWNCTD HVCDAT 866
VWF D3 도메인	867 CSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ YVLVQDYCGS 901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE VNVKRPMKDE 951 THFEVVESGR YIILLLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD

[0281]

	1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI 1051 MKQTMVDSSC RILTSDVFQD CNKLVDPEPY LDVCIYDTCS CESIGDCACF 1101 CDTIAAYAHV CAQHGKVVTW RTATLCPQSC EERNLRENGY ECEWRYNSCA 1151 PACQVTCQHP EPLACPVQCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE 1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP 1240
VWF A1 도메인	1241 GGLVVPPTDA 1251 PVSPTTLYVE DISEPPLHDF YCSRLLDLVF 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 KRNSMVLDVA 1501 FVLEGSDKIG EADFNRSKEF MEEVIQRMDV GQDSIHVTVL QYSYMVTVEY 1551 PFSEAQSKGD ILQRVREIRY QGGNRTNTGL ALRYLSDHSF LVSQGDREQA 1600 1601 PNLVYMVTGN PASDEIKRLP GDIQVVPIGV GPNANVQELE RIGWPNAPIL 1651 IQDFETLPRE APDLVLQRCC SGEGLQIPTL SPAPDCSQPL DVILLLDGSS 1701 SFPASYFDEM KSFAKAFISK ANIGPRLTQV SVLQYGSITT IDVPWNVVPE 1751 KAHLLSLVDV MQREGGPSQI GDALGFAVRY LTSEMHGARP GASKAVVILV 1801 TDVSVDSVDA AADAARSNRV TVFPIGIGDR YDAAQLRILA GPAGDSNVVK 1851 LQRIEDLPTM VTLGNSFLHK LCSGFVRICM DEDGNEKRPG DVWTLPDQCH 1901 TVTCQPDGQT LLKSHRVNCD RGLRPSCPNS QSPVKVEETC GCRWTCPCVC 1951 TGSSTRHIVT FDGQNFKLTG SCSYVLFQNK EQDLEVILHN GACSPGARQG 2001 CMKSIEVKHS ALSVEXHSDM EVTVNGRLVS VPYVGGNMEV NVYGAIMHEV 2051 RFNHLGHIFT FTPQNNEFQL QLSPKTFASK TYGLCGICDE NGANDFMLRD 2101 GTVTTDWKTL VQEWTVQRPG QTCQPILEEQ CLVPDSSHCQ VLLLPLFAEC 2151 HKVLAPATFY AICQQDSCHQ EQVCEVIASY AHLCRTNGVC VDWRTPDFCA

[0282]

[0283]

	2201 MSCPPSLVYN HCEHGCPRHC DGNVSSCGDH PSEGCFCPPD KVMLEGSCVP 2251 EEACTQCIGE DGVQHQFLEA WVPDHQPCQI CTCLSGRKVN CTTQPCPTAK 2301 APTCGLCEVA RLRQNADQCC PEYECVCDPV SCDLPPVPHC ERGLQPTLTN 2351 PGECRPNFTC ACRKEECKRV SPPSCPPHRL PTLRKTQCCD EYECACNCVN 2401 STVSCPLGYL ASTATNDCGC TTTTCLPDKV CVHRSTIYPV GQFWEEGCDV 2451 CTCTDMEDAV MGLRVAQCSQ KPCEDSCRSG FTYVLHEGEC CGRCLPSACE 2501 VVTGSPRGDS QSSWKSVGSQ WASPENPCLI NECVRVKEEV FIQQRNVSCP 2551 QLEVPVCPSG FQLSCKTSAC CPSCRCERME ACMLNGTVIG PGKTVMIDVC 2601 TTCRCMVQVG VISGFKLECR KTTCNPCPLG YKEENNTGEC CGRCLPTACT 2651 IQLRGGQIMT LKRDETLQDG CDTHFCKVNE RGEYFWEKRV TGCPPFDEHK 2701 CLAEGGKIMK IPGTCCDTCE EPECNDITAR LQYVKVGSCK SEVEVDIHYC 2751 QGKCASKAMY SIDINDVQDQ CSCCSPTRTE PMQVALHCTN GSVVYHEVLN 2801 AMECKCSPRK CSK
	뉴클레오타이드 서열 (서열 번호 1)
전장 VWF	1 ATGATTCCTG CCAGATTTGC 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 TTGCCCGCTG CCACCCTCTG

	GTGGACCCCG AGCCTTTTGT GGCCCTGTGT 751 GAGAAGACTT TGTGTGAGTG TGCTGGGGGG CTGGAGTGCG CCTGCCCTGC 801 CCTCCTGGAG TACGCCCGGA CCTGTGCCCA GGAGGGAATG GTGCTGTACG 851 GCTGGACCGA CCACAGCGCG TGCAGCCCAG TGTGCCCTGC TGGTATGGAG 901 TATAGGCAGT GTGTGTCCCC TTGCGCCAGG ACCTGCCAGA GCCTGCACAT 951 CAATGAAATG TGTCAGGAGC GATGCGTGGA TGGCTGCAGC TGCCCTGAGG 1001 GACAGCTCCT GGATGAAGGC CTCTGCGTGG AGAGCACCGA 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 TGCGGCCTGT 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 AACTGCCCGA AAGGCCAGGT GTACCTGCAG TGCGGGACCC CCTGCAACCT 2001 GACCTGCCGC TCTCTCTCTT ACCCGGATGA GGAATGCAAT GAGGCCTGCC 2051 TGGAGGGCTG CTTCTGCCCC CCAGGGCTCT ACATGGATGA GAGGGGGGAC 2101 TGCGTGCCCA AGGCCCAGTG

[0284]

[0285]

	CCCCTGTTAC TATGACGGTG AGATCTTCCA 2151 GCCAGAAGAC ATCTTCTCAG ACCATCACAC CATGTGCTAC TGTGAGGATG 2201 GCTTCATGCA CTGTACCATG AGTGGAGTCC CCGGAAGCTT GCTGCCTGAC 2251 GCTGTCCTCA GCAGTCCCCT GTCTCATCGC AGCAAAAGGA GCCTATCCTG 2301 TCGGCCCCCC ATGGTCAAGC TGGTGTGTCC CGCTGACAAC CTGCGGGCTG 2351 AAGGGCTCGA GTGTACCAAA ACGTGCCAGA ACTATGACCT GGAGTGCATG 2401 AGCATGGGCT GTGTCTCTGG CTGCCTCTGC CCCCCGGGCA TGGTCCGGCA 2451 TGAGAACAGA TGTGTGGCCC TGGAAAGGTG TCCCTGCTTC CATCAGGGCA 2501 AGGAGTATGC CCCTGGAGAA ACAGTGAAGA TTGGCTGCAA CACTTGTGTC 2551 TGTCGGGACC GGAAGTGGAA 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 AGAGGCCCAT GAAGGATGAG 2851 ACTCACTTTG AGGTGGTGGA GTCTGGCCGG TACATCATTC 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 CGATGGTGGA TTCCTCCTGT AGAATCCTTA CCAGTGACGT 3201 CTTCCAGGAC TGCAACAAGC TGGTGGACCC CGAGCCATAT CTGGATGTCT 3251 GCATTTACGA CACCTGCTCC TGTGAGTCCA TTGGGGACTG CGCCTGCTTC 3301 TGCGACACCA TTGCTGCCTA TGCCCACGTG TGTGCCCAGC ATGGCAAGGT 3351 GGTGACCTGG AGGACGGCCA CATTGTGCCC CCAGAGCTGC GAGGAGAGGA 3401 ATCTCCGGGA GAACGGGTAT GAGTGTGAGT GGCGCTATAA CAGCTGTGCA 3451 CCTGCCTGTC AAGTCACGTG TCAGCACCCT GAGCCACTGG CCTGCCCTGT 3501 GCAGTGTGTG GAGGGCTGCC

	ATGCCCACTG CCCTCCAGGG AAAATCCTGG 3551 ATGAGCTTTT GCAGACCTGC GTTGACCCTG AAGACTGTCC AGTGTGTGAG 3601 GTGGCTGGCC GGCGTTTTGC CTCAGGAAAG AAAGTCACCT TGAATCCCAG 3651 TGACCCTGAG CACTGCCAGA TTTGCCACTG TGATGTTGTC AACCTCACCT 3701 GTGAAGCCTG CCAGGAGCCG GGAGGCCTGG TGGTGCCTCC CACAGATGCC 3751 CCGGTGAGCC CCACCACTCT GTATGTGGAG GACATCTCGG AACCGCCGTT 3801 GCACGATTTC 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 GCCCCTGAAG CCCCTCCTCC 4401 TACTCTGCCC CCCGACATGG CACAAGTCAC TGTGGGCCCG GGGCTCTTGG 4451 GGGTTTCGAC CCTGGGGCCC AAGAGGAACT CCATGGTTCT GGATGTGGCG 4501 TTCGTCCTGG AAGGATCGGA CAAAATTGGT GAAGCCGACT TCAACAGGAG 4551 CAAGGAGTTC ATGGAGGAGG TGATTCAGCG 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

[0286]

	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 GGCCTCGTCT CACTCAGGTG TCAGTGCTGC 5201 AGTATGGAAG CATCACCACC ATTGACGTGC CATGGAACGT GGTCCCGGAG 5251 AAAGCCCATT TGCTGAGCCT 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 GATTTGCATG GATGAGGATG 5651 GGAATGAGAA GAGGCCCGGG GACGTCTGGA CCTTGCCAGA CCAGTGCCAC 5701 ACCGTGACTT GCCAGCCAGA TGGCCAGACC TTGCTGAAGA GTCATCGGGT 5751 CAACTGTGAC CGGGGGCTGA GGCCTTCGTG CCCTAACAGC CAGTCCCCTG 5801 TTAAAGTGGA AGAGACCTGT GGCTGCCGCT GGACCTGCCC CTGYGTGTGC 5851 ACAGGCAGCT CCACTCGGCA CATCGTGACC TTTGATGGGC AGAATTTCAA 5901 GCTGACTGGC AGCTGTTCTT ATGTCCTATT TCAAAACAAG 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 TTCACTCCAC AAAACAATGA 6201 GTTCCAACTG CAGCTCAGCC CCAAGACTTT TGCTTCAAAG ACGTATGGTC 6251 TGTGTGGGAT CTGTGATGAG AACGGAGCCA ATGACTTCAT GCTGAGGGAT 6301 GGCACAGTCA CCACAGACTG

[0287]

	GAAAACACTT GTTCAGGAAT GGACTGTGCA 6351 GCGGCCAGGG CAGACGTGCC AGCCCATCCT GGAGGAGCAG TGTCTTGTCC 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 CCCTCCGAAG 6701 GCTGTTTCTG CCCTCCAGAT AAAGTCATGT TGGAAGGCAG CTGTGTCCCT 6751 GAAGAGGCCT GCACTCAGTG CATTGGTGAG GATGGAGTCC AGCACCAGTT 6801 CCTGGAAGCC TGGGTCCCGG ACCACCAGCC CTGTCAGATC TGCACATGCC 6851 TCAGCGGGCG GAAGGTCAAC TGCACAACGC AGCCCTGCCC CACGGCCAAA 6901 GCTCCCACGT GTGGCCTGTG TGAAGTAGCC CGCCTCCGCC AGAATGCAGA 6951 CCAGTGCTGC CCCGAGTATG AGTGTGTGTG TGACCCAGTG AGCTGTGACC 7001 TGCCCCCAGT GCCTCACTGT GAACGTGGCC TCCAGCCCAC ACTGACCAAC 7051 CCTGGCGAGT GCAGACCCAA CTTCACCTGC 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 TTCACTTACG 7451 TTCTGCATGA AGGCGAGTGC TGTGGAAGGT GCCTGCCATC TGCCTGTGAG 7501 GTGGTGACTG GCTCACCGCG GGGGGACTCC CAGTCTTCCT GGAAGAGTGT 7551 CGGCTCCCAG TGGGCCTCCC CGGAGAACCC CTGCCTCATC AATGAGTGTG 7601 TCCGAGTGAA GGAGGAGGTC TTTATACAAC AAAGGAACGT CTCCTGCCCC 7651 CAGCTGGAGG TCCCTGTCTG CCCCTCGGGC TTTCAGCTGA GCTGTAAGAC 7701 CTCAGCGTGC TGCCCAAGCT

[0288]

```
          GTCGCTGTGA GCGCATGGAG GCCTGCATGC
      7751  TCAATGGCAC TGTCATTGGG
          CCCGGGAAGA CTGTGATGAT CGATGTGTGC
      7801  ACGACCTGCC GCTGCATGGT
          GCAGGTGGGG GTCATCTCTG GATTCAAGCT
      7851  GGAGTGCAGG AAGACCACCT
          GCAACCCCTG CCCCCTGGGT TACAAGGAAG
      7901  AAAATAACAC AGGTGAATGT
          TGTGGGAGAT GTTTGCCTAC GGCTTGCACC
      7951  ATTCAGCTAA GAGGAGGACA
          GATCATGACA CTGAAGCGTG ATGAGACGCT
      8001  CCAGGATGGC TGTGATACTC
          ACTTCTGCAA GGTCAATGAG AGAGGAGAGT
      8051  ACTTCTGGGA GAAGAGGGTC
          ACAGGCTGCC CACCCTTTGA TGAACACAAG
      8101  TGTCTTGCTG AGGGAGGTAA
          AATTATGAAA ATTCCAGGCA CCTGCTGTGA
      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 GGTTCTCAAT
      8401   GCCATGGAGT GCAAATGCTC
CCCCAGGAAG TGCAGCAAGT GA
```

[0289]

[0290] 본 명세서에 사용되는 VWF 단편은 VWF의 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 VWF 단편일 수 있고, VWF 단편은 VIII 인자(FVIII)에 결합하고 FVIII에 대한 내인성 VWF(전장 VWF)의 결합을 억제한다. D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 VWF 단편은 A1 도메인, A2 도메인, A3 도메인, D1 도메인, D2 도메인, D4 도메인, B1 도메인, B2 도메인, B3 도메인, C1 도메인, C2 도메인, CK 도메인, 이들의 하나 이상의 단편 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 VWF 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, VWF 단편은 (1) VWF의 D' 및 D3 도메인 또는 이의 단편; (2) VWF의 D1, D' 및 D3 도메인 또는 이의 단편; (3) VWF의 D2, D' 및 D3 도메인 또는 이의 단편; (4) VWF의 D1, D2, D' 및 D3 도메인 또는 이의 단편; 또는 (5) VWF의 D1, D2, D', D3 및 A1 도메인 또는 이의 단편을 포함하거나, 이들로 실질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어진다. 본 명세서에 기재된 VWF 단편은 VWF 청소 수용체에 대한 자리 결합을 함유하지 않는다. 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 VWF 단편은 서열 번호 2의 764번 내지 1274번 아미노산이 아니다. 본 발명의 VWF 단편은 VWF 단편에 연결되거나 융합된 임의의 다른 서열을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 명세서에 기재된 VWF 단편은 신호 펩타이드를 추가로 포함할 수 있다.

[0291] 일 실시형태에서, VWF 단편은 FVIII 단백질에 결합하거나 이것과 회합된다. FVIII 단백질에 대한 결합 또는 이와의 회합에 의해, 본 발명의 VWF 단편은 프로테아제 개열 및 FVIII 활성화로부터 FVIII을 보호하고, FVIII의 중쇄 및 경쇄를 안정화시키며, 스캐빈저 수용체에 의한 FVIII의 청소를 방지한다. 또 다른 실시형태에서, VWF 단편은 FVIII 단백질에 결합하거나 이것과 회합되고, 인지질 및 활성화 단백질 C에 대한 FVIII 단백질의 결합을 차단하거나 방지한다. FVIII 단백질과 내인성, 전장 VWF의 결합을 방지하거나 억제함으로써, 본 발명의 VWF 단편은 VWF 청소 수용체에 의한 FVIII의 청소를 감소시키고 따라서 FVIII 단백질의 반감기를 연장시킨다. 일 실시형태에서, FVIII 단백질의 반감기 연장은 따라서 FVIII 단백질에 대한 VWF 청소 수용체 결합 자리가 결여된 VWF 단편의 결합 또는 이와의 회합, 및 VWF 청소 수용체 결합 자리를 함유하는 내인성 VWF로부터의 VWF 단편에 의한 FVIII 단백질의 차폐 또는 보호로 인한다. VWF 단편에 결합하거나 이에 의해 보호된 FVIII 단백질은 또한 FVIII 단백질의 재순환을 허용할 수 있다. 전장 VWF 분자에 함유된 VWF 청소 경로 수용체 결합 자리를 제거함으로써, 본 발명의 FVIII/VWF 이종이합체는 VWF 청소 경로로부터 차폐되어, FVIII 반감기를 추가로 연장시킨다.

[0292] 일 실시형태에서, 본 발명의 VWF 단편은 VWF의 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하되, D' 도메인은 서열 번호 2의 764번 내지 866번 아미노산과 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일하고, VWF 단편은 FVIII에 대한 내인성 VWF의 결합을 방지한다. 또 다른 실시형태에서, VWF 단편은 VWF의 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하되, D3 도메인은 서열 번호 2의 867번 내지 1240번 아미노산과 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일하고, VWF 단편은 FVIII에 대한 내인성 VWF의 결합을 방지한다. 몇몇 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 VWF 단편은 서열 번호 2의 764번 내지 1240번 아미노산과 적어도

60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 VWF의 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하거나, 이들로 실질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어지고, VWF 단편은 FVIII에 대한 내인성 VWF의 결합을 방지한다. 다른 실시형태에서, VWF 단편은 서열 번호 2의 23번 내지 1240번 아미노산과 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 D1, D2, D' 및 D3 도메인을 포함하거나, 이들로 실질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어지고, VWF 단편은 FVIII에 대한 내인성 VWF의 결합을 방지한다. 또 다른 실시형태에서, VWF 단편은 이에 연결된 작동적으로 신호 펩타이드를 추가로 포함한다.

[0293] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 VWF 단편은 (1) D'D3 도메인, D1D'D3 도메인, D2D'D3 도메인 또는 D1D2D'D3 도메인 및 (2) 최대 약 10개의 아미노산(예를 들면, 서열 번호 2의 764번 내지 1240번 아미노산으로부터 서열 번호 2의 764번 내지 1250번 아미노산의 임의의 서열), 최대 약 15개의 아미노산(예를 들면, 서열 번호 2의 764번 내지 1240번 아미노산으로부터 서열 번호 2의 764번 내지 1255번 아미노산의 임의의 서열), 최대 약 20개의 아미노산(예를 들면, 서열 번호 2의 764번 내지 1240번 아미노산으로부터 서열 번호 2의 764번 내지 1260번 아미노산의 임의의 서열), 최대 약 25개의 아미노산(예를 들면, 서열 번호 2의 764번 내지 1240번 아미노산으로부터 서열 번호 2의 764번 내지 1265번 아미노산의 임의의 서열) 또는 최대 약 30개의 아미노산(예를 들면, 서열 번호 2의 764번 내지 1240번 아미노산으로부터 서열 번호 2의 764번 내지 1260번 아미노산의 임의의 서열)의 추가의 VWF 서열로 실질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어진다. 특정한 실시형태에서, D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하거나 이들로 실질적으로 이루어진 VWF 단편은 서열 번호 2의 764번 내지 1274번 아미노산도 전장 성숙 VWF도 아니다. 몇몇 실시형태에서, D1D2 도메인은 D'D3 도메인과 트랜스로 발현된다. 몇몇 실시형태에서, D1D2 도메인은 D'D3 도메인과 시스로 발현된다.

[0294] 다른 실시형태에서, D1D2 도메인에 연결된 D'D3 도메인을 포함하는 VWF 단편은 세포내 개열 자리, 예를 들면, (PACE(퓨린) 또는 PC5에 의한 개열 자리)를 추가로 포함하여, 발현 시 D'D3 도메인으로부터 D1D2 도메인의 개열을 허용한다. 세포내 개열 자리의 비제한적인 예는 본 명세서에서 그외 개시되어 있다.

[0295] 또 다른 실시형태에서, VWF 단편은 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하지만, (1) 서열 번호 2의 1241번 내지 2813번 아미노산, (2) 서열 번호 2의 1270번 아미노산 내지 2813번 아미노산, (3) 서열 번호 2의 1271번 아미노산 내지 2813번 아미노산, (4) 서열 번호 2의 1272번 아미노산 내지 2813번 아미노산, (5) 서열 번호 2의 1273번 아미노산 내지 2813번 아미노산, (6) 서열 번호 2의 1274번 아미노산 내지 2813번 아미노산 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하지 않는다.

[0296] 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 VWF 단편은 D' 도메인, D3 도메인 및 A1 도메인에 상응하는 아미노산 서열을 포함하거나, 이들로 실질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어지고, 이 아미노산 서열은 서열 번호 2의 764번 내지 1479번 아미노산과 적어도 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일하고, VWF 단편은 FVIII에 대한 내인성 VWF의 결합을 방지한다. 특정한 실시형태에서, VWF 단편은 서열 번호 2의 764번 내지 1274번 아미노산이 아니다.

[0297] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 VWF 단편은 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하지만, (1) A1 도메인, (2) A2 도메인, (3) A3 도메인, (4) D4 도메인, (5) B1 도메인, (6) B2 도메인, (7) B3 도메인, (8) C1 도메인, (9) C2 도메인, (10) CK 도메인, (11) CK 도메인 및 C2 도메인, (12) CK 도메인, C2 도메인 및 C1 도메인, (13) CK 도메인, C2 도메인, C1 도메인, B3 도메인, (14) CK 도메인, C2 도메인, C1 도메인, B3 도메인, B2 도메인, (15) CK 도메인, C2 도메인, C1 도메인, B3 도메인, B2 도메인 및 B1 도메인, (16) CK 도메인, C2 도메인, C1 도메인, B3 도메인, B2 도메인, B1 도메인 및 D4 도메인, (17) CK 도메인, C2 도메인, C1 도메인, B3 도메인, B2 도메인, B1 도메인, D4 도메인 및 A3 도메인, (18) CK 도메인, C2 도메인, C1 도메인, B3 도메인, B2 도메인, B1 도메인, D4 도메인, A3 도메인 및 A2 도메인, (19) CK 도메인, C2 도메인, C1 도메인, B3 도메인, B2 도메인, B1 도메인, D4 도메인, A3 도메인, A2 도메인 및 A1 도메인 및 (20) 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 VWF 도메인을 포함하지 않는다.

[0298] 또 다른 실시형태에서, VWF 단편은 D'D3 도메인 및 하나 이상의 도메인 또는 모듈을 포함한다. 이러한 도메인 또는 모듈의 예는 문헌[Zhour et al., Blood 2012년 4월 6일 온라인 공개: DOI 10.1182/blood-2012-01-405134]에 개시된 도메인 및 모듈을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 예를 들면, VWF 단편은 D'D3 도메인, 및 A1 도메인, A2 도메인, A3 도메인, D4N 모듈, VWD4 모듈, C8-4 모듈, TIL-4 모듈, C1 모듈, C2 모듈, C3 모듈, C4 모듈, C5 모듈, C5 모듈, C6 모듈 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 도메인 또는 모듈을 포함할 수 있다.

[0299] 또 다른 실시형태에서, VWF 단편은 비상동성 모이어티에 연결되고, 비상동성 모이어티는 VWF 단편의 N 말단 또

는 C 말단에 연결되거나, VWF 단편에서 FVIII 단백질 내의 하나 이상의 아미노산(예를 들면, 하나 이상의 XTEN 삽입 자리)의 바로 하류에 삽입된다. 예를 들면, VWF 단편 내의 비상동성 모이어티에 대한 삽입 자리는 D' 도메인, D3 도메인 또는 둘 다에 있을 수 있다. 비상동성 모이어티는 반감기 연장제일 수 있다.

[0300] 소정의 실시형태에서, 본 발명의 VWF 단편은 다합체, 예를 들면, 이합체, 삼합체, 사합체, 오합체, 육합체, 칠합체 또는 더 고차의 다합체를 형성한다. 다른 실시형태에서, VWF 단편은 오직 하나의 VWF 단편을 갖는 단량체이다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 VWF 단편은 하나 이상의 아미노산 치환, 결실, 부가 또는 변형을 가질 수 있다. 일 실시형태에서, VWF 단편은 아미노산 치환, 결실, 부가 또는 변형을 포함할 수 있어서, VWF 단편은 이황화 결합을 형성하거나 이합체 또는 다합체를 형성할 수 없다. 또 다른 실시형태에서, 아미노산 치환은 D' 도메인 및 D3 도메인 내에 있다. 특정한 실시형태에서, 본 발명의 VWF 단편은 서열 번호 2의 1099번 잔기, 1142번 잔기 또는 1099번 및 1142번 잔기 둘 다에 상응하는 잔기에서 적어도 하나의 아미노산 치환을 함유한다. 적어도 하나의 아미노산 치환은 야생형 VWF에서 자연에서 발생하지 않는 임의의 아미노산일 수 있다. 예를 들면, 아미노산 치환은 시스테인 이외의 임의의 아미노산, 예를 들면, 아이소류신, 알라닌, 류신, 아스파라긴, 라이신, 아스파르트산, 메티오닌, 페닐알라닌, 글루탐산, 트레오닌, 글루타민, 트립토판, 글라이신, 발린, 프롤린, 세린, 타이로신, 아르기닌 또는 히스티딘일 수 있다. 또 다른 예에서, 아미노산 치환은 VWF 단편이 다합체를 형성하는 것을 방지하거나 억제하는 하나 이상의 아미노산을 갖는다.

[0301] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 유용한 VWF 단편은 이의 FVIII과의 상호작용을 개선하기 위해, 예를 들면, FVIII에 대한 결합 친화도를 개선하기 위해 추가로 변형될 수 있다. 비제한적인 예로서, VWF 단편은 서열 번호 2의 764번 아미노산에 상응하는 잔기에서의 세린 잔기 및 서열 번호 2의 773번 아미노산에 상응하는 잔기에서의 라이신 잔기를 포함한다. 764번 및/또는 773번 잔기는 FVIII에 대한 VWF 단편의 결합 친화도에 기여할 수 있다. 다른 실시형태에서, 본 발명에 유용한 VWF 단편은 다른 변형을 가질 수 있고, 예를 들면, 단백질은 페길화, 글라이코실화, 헤실화 또는 폴리시알릴화될 수 있다.

[0302] **B) XTEN 서열**

[0303] 본 명세서에 사용되는, "XTEN 서열"은 주로 작은 친수성 아미노산으로 이루어진 비천연 발생하는, 실질적으로 비반복인 서열을 갖는 연장된 길이의 폴리펩타이드를 의미하고, 이 서열은 생리학적 조건 하에 낮은 정도의 2차 또는 3차 구조를 갖거나 이 구조를 갖지 않는다. 키메라 단백질 파트너로서, XTEN은, 본 발명의 VWF 단편 또는 FVIII 서열에 연결되어 키메라 단백질을 생성할 때, 소정의 바람직한 약동학적, 생리화학적 및 약제학적 특성을 부여하는 운반체로서 작용할 수 있다. 이러한 바람직한 특성은 증대된 약동학적 매개변수 및 용해도 특징을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 본 명세서에 사용되는 바대로, "XTEN"은 항체 또는 항체 단편, 예컨대 단일 사슬 항체 또는 경쇄 또는 중쇄의 Fc 단편을 구체적으로 배제한다.

[0304] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 XTEN 서열은 약 20개 초과, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 150개, 200개, 250개, 300개, 350개, 400개, 450개, 500개, 550개, 600개, 650개, 700개, 750개, 800개, 850개, 900개, 950개, 1000개, 1200개, 1400개, 1600개, 1800개 또는 2000개의 아미노산 잔기를 갖는 펩타이드 또는 폴리펩타이드이다. 소정의 실시형태에서, XTEN은 약 20개 초과 내지 약 3000개의 아미노산 잔기, 30개 초과 내지 약 2500개의 잔기, 40개 초과 내지 약 2000개의 잔기, 50개 초과 내지 약 1500개의 잔기, 60개 초과 내지 약 1000개의 잔기, 70개 초과 내지 약 900개의 잔기, 80개 초과 내지 약 800개의 잔기, 90개 초과 내지 약 700개의 잔기, 100개 초과 내지 약 600개의 잔기, 110개 초과 내지 약 500개의 잔기 또는 120개 초과 내지 약 400개의 잔기를 갖는 펩타이드 또는 폴리펩타이드이다.

[0305] 본 발명의 XTEN 서열은 9개 내지 14개의 아미노산 잔기의 하나 이상의 서열 모티프 또는 서열 모티프와 적어도 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 이 모티프는 글라이신(G), 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T), 글루타메이트(E) 및 프롤린(P)으로 이루어진 군으로부터 선택된 4개 내지 6개 유형의 아미노산을 포함하거나, 이들로 실질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어진다. US 2010-0239554 A1을 참조한다.

[0306] 몇몇 실시형태에서, XTEN은 비중첩 서열 모티프를 포함하되, 여기서 서열의 약 80% 또는 적어도 약 85% 또는 적어도 약 90% 또는 약 91% 또는 약 92% 또는 약 93% 또는 약 94% 또는 약 95% 또는 약 96% 또는 약 97% 또는 약 98% 또는 약 99% 또는 약 100%는 패밀리 서열을 발생시키는 표 2A로부터 선택된 단일 모티프 패밀리로부터 선택된 비중첩 서열의 다수의 단위로 이루어진다. 본 명세서에 사용되는 바대로, "패밀리"는 XTEN이 오직 표 2A로부터의 단일 모티프 카테고리; 즉, AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC 또는 BD XTEN으로부터 선택된 모티프를 갖고, 필요한 특성을 성취하기 위해, 예컨대 코딩 뉴클레오타이드에 의한 제한 자리의 편입, 개열 서열의 편입을 허용하

기 위해 또는 FVIII 또는 VWF에 대한 더 우수한 연결을 성취하기 위해 패밀리 모티프로부터가 아닌 XTEN 내의 임의의 다른 아미노산이 선택된다는 것을 의미한다. XTEN 패밀리의 몇몇 실시형태에서, XTEN 서열은 AD 모티프 패밀리 또는 AE 모티프 패밀리 또는 AF 모티프 패밀리 또는 AG 모티프 패밀리 또는 AM 모티프 패밀리 또는 AQ 모티프 패밀리 또는 BC 패밀리 또는 BD 패밀리의 비중첩 서열 모티프의 다수의 단위를 포함하고, 생성된 XTEN은 상기 기재된 상동성의 범위를 나타낸다. 다른 실시형태에서, XTEN은 표 2A의 2개 이상의 모티프 패밀리의 모티프 서열의 다수의 단위를 포함한다. 이 서열은 순전하, 친수화도, 2차 구조 결여 또는 하기 더 자세히 기재된 모티프의 아미노산 조성에 의해 부여된 반복도 결여와 같은 특성을 포함하는 원하는 물리적/화학적 특징을 성취하도록 선택될 수 있다. 이 문단에서 상기 본 명세서에 기재된 실시형태에서, XTEN으로 편입된 모티프는 약 36 내지 약 3000개의 아미노산 잔기의 XTEN을 성취하기 위해 본 명세서에 기재된 방법을 이용하여 선택되고 조립될 수 있다.

[0307] [표 2a]

12 개의 아미노산의 XTEN 서열 모티프 및 모티프 패밀리

모티프 부류*	모티프 서열
AD	GESPGGSSGSES
AD	GSEGSSGPGESS
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	GTGEPSSTPASE
AQ	GSGPSTESAPTE
AQ	GSETPSGPSETA
AQ	GPSETSTSEPGA
AQ	GSPSEPTEGTSA
BC	GSGASEPTSTEP
BC	GSEPATSGTEPS
BC	GTSEPSTSEPGA
BC	GTSTEPSEPGSA
BD	GSTAGSETSTEA
BD	GSETATSGSETA
BD	GTSESATSESGA
BD	GTSTEASEGSAS

• 다양한 순열로 함께 사용될 때, "패밀리 서열"을 발생시키는 개별 모티프 서열을 나타냄

[0308]

[0309] XTEN은 FVIII 또는 VWF에 대한 삽입 또는 연결을 위해 다양한 길이를 가질 수 있다. 일 실시형태에서, XTEN 서열(들)의 길이는 융합 단백질에서 성취하고자 하는 특성 또는 기능에 기초하여 선택된다. 의도되는 특성 또는 기능에 따라, XTEN은 짧은 또는 중간 길이의 서열 또는 운반체로서 작용할 수 있는 더 긴 서열일 수 있다. 소정의 실시형태에서, XTEN은 약 6개 내지 약 99개의 아미노산 잔기의 짧은 분절, 약 100개 내지 약 399개의 아미노산 잔기의 중간 길이 및 약 400 내지 약 1000개 및 약 3000개 이하의 아미노산 잔기의 더 긴 길이를 포함한다. 따라서, FVIII 또는 VWF에 삽입되거나 연결된 XTEN은 약 6개, 약 12개, 약 36개, 약 40개, 약 42개, 약 72개,

약 96개, 약 144개, 약 288개, 약 400개, 약 500개, 약 576개, 약 600개, 약 700개, 약 800개, 약 864개, 약 900개, 약 1000개, 약 1500개, 약 2000개, 약 2500개 또는 약 3000개 이하의 길이의 아미노산 잔기의 길이를 가질 수 있다. 다른 실시형태에서, XTEN 서열은 약 6개 내지 약 50개, 약 50개 내지 약 100개, 약 100개 내지 150개, 약 150개 내지 250개, 약 250개 내지 400개, 약 400개 내지 약 500개, 약 500개 내지 약 900개, 약 900개 내지 1500개, 약 1500개 내지 2000개 또는 약 2000개 내지 약 3000개의 길이의 아미노산 잔기이다. FVIII 또는 VWF에 삽입되거나 연결된 XTEN의 정확한 길이는 FVIII 또는 VWF의 활성에 부정적으로 영향을 미치는 일 없이 변할 수 있다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 사용된 하나 이상의 XTEN은 36개의 아미노산, 42개의 아미노산, 72개의 아미노산, 144개의 아미노산, 288개의 아미노산, 576개의 아미노산 또는 864개의 아미노산 길이를 갖고, 하나 이상의 XTEN 패밀리 서열; 즉, AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC 또는 BD로부터 선택될 수 있다.

[0310] 몇몇 실시형태에서, 본 발명에 사용된 XTEN 서열은 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 및 AG2004로 이루어진 군으로부터 선택된 서열과 적어도 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일하다. US 2010-0239554 A1을 참조한다.

[0311] 일 실시형태에서, XTEN 서열은 AE42(서열 번호 36), AE72(서열 번호 127), AE144_2A(서열 번호 128), AE144_3B(서열 번호 129), AE144_4A(서열 번호 130), AE144_5A(서열 번호 131), AE144_6B(서열 번호 132), AG144_A(서열 번호 133), AG144_B(서열 번호 134), AG144_C(서열 번호 135), AG144_F(서열 번호 136), AE864(서열 번호 43), AE576(서열 번호 41), AE288(서열 번호 39), AE288_2(서열 번호 137), AE144(서열 번호 37), AG864(서열 번호 44), AG576(서열 번호 42), AG288(서열 번호 40), AG144(서열 번호 38) 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일하다.

[0312] 몇몇 실시형태에서, XTEN의 아미노산의 100% 미만은 글라이신(G), 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T), 글루타메이트(E) 및 프롤린(P)으로부터 선택되거나, 서열의 100% 미만은 표 2A로부터의 서열 모티프 또는 표 2B의 XTEN 서열로 이루어진다. 이러한 실시형태에서, XTEN의 남은 아미노산 잔기는 임의의 다른 14개의 천연 L-아미노산으로부터 선택되지만, 우선적으로 친수성 아미노산으로부터 선택될 수 있어서, XTEN 서열은 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 적어도 약 99%의 친수성 아미노산을 함유한다. 접합 작제물에서 사용되는 XTEN 내의 소수성 아미노산의 함량은 5% 미만 또는 2% 미만 또는 1% 미만의 소수성 아미노산 함량일 수 있다. XTEN의 작제에서 덜 선호되는 소수성 잔기는 트립토판, 페닐알라닌, 타이로신, 류신, 아이소류신, 발린 및 메티오닌을 포함한다. 추가로, XTEN 서열은 5% 미만 또는 4% 미만 또는 3% 미만 또는 2% 미만 또는 1% 미만의 메티오닌(예를 들면, 산화를 피하기 위해) 또는 아스파라긴 및 글루타민(탈아미드화를 피하기 위해)의 아미노산을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다.

[0313] 또 다른 실시형태에서, XTEN 서열은 AE42(서열 번호 36), AE72(서열 번호 127), AE144_2A(서열 번호 128), AE144_3B(서열 번호 129), AE144_4A(서열 번호 130), AE144_5A(서열 번호 131), AE144_6B(서열 번호 132), AG144_A(서열 번호 133), AG144_B(서열 번호 134), AG144_C(서열 번호 135), AG144_F(서열 번호 136), AE864(서열 번호 43), AE576(서열 번호 41), AE288(서열 번호 39), AE288_2(서열 번호 137), AE144(서열 번호 37), AG864(서열 번호 44), AG576(서열 번호 42), AG288(서열 번호 40), AG144(서열 번호 38) 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정한 실시형태에서, XTEN 서열은 AE288이다. 본 발명의 소정의 XTEN 서열에 대한 아미노산 서열은 표 2B에 기재되어 있다.

[0314] [표 2b]

XTEN 서열

XTEN	아미노산 서열
AE42 서열 번호 36	GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS
AE72 서열 번호 127	GAPTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP A TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGASS
AE144 서열 번호 37	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSESA PESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
AE144_2A (서열 번호 128)	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPG
AE144_3B (서열 번호 129)	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPG
AE144_4A (서열 번호 130)	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPG
AE144_5A (서열 번호 131)	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEG
AE144_6B (서열 번호 132)	TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPG
AG144 서열 번호 38	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSA STGTGPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP
AG144_A (서열 번호 133)	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSP
AG144_B (서열 번호 134)	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSP
AG144_C	GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSP

[0315]

[0316]

(서열 번호 135)	GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSP
AG144_F (서열 번호 136)	GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSP
AE288 서열 번호 39	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAP
AE288_2 (서열 번호 137)	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG288 서열 번호 40	PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGSSPSASTG TGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGS STPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGS
AE576 서열 번호 41	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAP
AG576	PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS

[0317]

서열 번호 42	ASTGTGPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS PSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGS STPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGS
AE864 서열 번호 43	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG864 서열 번호 44	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSS PSASTGTGPGSSTPSGA

[0318]

	TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG SSPSASTGTGPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPS ASTGTGPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP

[0319] 추가의 실시형태에서, 본 발명에 사용되는 XTEN 서열은 본 발명의 키메라 단백질의 물리적 또는 화학적 특성, 예를 들면, 약동학에 영향을 미친다. 본 발명에 사용되는 XTEN 서열은 하나 이상의 하기 유리한 특성을 나타낼 수 있다: 배좌 유연성, 증대된 수성 용해도, 높은 정도의 프로테아제 내성, 낮은 면역원성, 포유동물 수용체에 대한 낮은 결합 또는 증가된 유체역학(또는 스토크) 반경. 특정한 실시형태에서, 본 발명에서 FVIII 단백질에 연결된 XTEN 서열은 증가된 약동학적 특성, 예컨대 더 긴 말단 반감기 또는 증가된 곡선 하 면적(AUC)을 가져, 본 명세서에 기재된 키메라 단백질은 야생형 FVIII과 비교하여 증가된 기간 동안 *생체내* 머무른다. 추가의 실시형태에서, 본 발명에 사용되는 XTEN 서열은 증가된 약동학적 특성, 예컨대 더 긴 말단 반감기 또는 증가된 곡선 하 면적(AUC)을 가져, FVIII 단백질은 야생형 FVIII과 비교하여 증가된 기간 동안 *생체내* 머무른다.

[0320] XTEN 서열을 포함하는 단백질의 물리적/화학적 특성을 결정하기 위해 다양한 방법 및 검정을 이용할 수 있다. 이러한 방법은 분석적 원심분리, EPR, HPLC-이온 교환, HPLC-크기 배제, HPLC-역상, 광 산란, 모세관 전기이동, 원편광 2색성, 시차 주사 열량계, 형광, HPLC-이온 교환, HPLC-크기 배제, IR, NMR, 라만 분광법, 굴절법 및 UV/가시광선 분광법을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 추가의 방법은 문헌[Amau *et al., Prot Expr and Purif* 48, 1-13 (2006)]에 개시되어 있다.

[0321] 본 발명에 따라 사용될 수 있는 XTEN 서열의 추가의 예는 미국 특허 공보 제2010/0239554호 A1, 제2010/0323956호 A1, 제2011/0046060호 A1, 제2011/0046061호 A1, 제2011/0077199호 A1 또는 제2011/0172146호 A1 또는 국제 특허 공보 WO 제2010091122호 A1, WO 제2010144502호 A2, WO 제2010144508호 A1, WO 제2011028228호 A1, WO 제2011028229호 A1 또는 WO 제2011028344호 A2에 개시되어 있다.

[0322] **C) VIII 인자(FVIII) 단백질**

[0323] 본 명세서에 사용되는 바대로, "FVIII 단백질"은, 달리 기재되지 않은 한, 응고에서 정상 역할을 하는 기능성 FVIII 폴리펩타이드를 의미한다. 용어 FVIII 단백질은 응고 경로에서 전장 야생형 VIII 인자의 기능을 보유하는 이의 기능성 단편, 변이체, 유사체 또는 유도체를 포함한다. "FVIII 단백질"은 FVIII 폴리펩타이드(또는 단백질) 또는 FVIII과 상호 교환되어 사용된다. FVIII 기능의 예는 응고를 활성화시키는 능력, IX 인자에 대한 보조인자로서 작용하는 능력, 또는 Ca^{2+} 및 인지질의 존재 하에 IX 인자와 테나세 복합체를 형성하는(이후 X 인자를 활성화 형태 Xa로 전환시킴) 능력을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. FVIII 단백질은 인간, 돼지과, 고양이과, 래트 또는 쥣과 FVIII 단백질일 수 있다. 또한, 인간과 다른 종의 FVIII 사이의 비교는 기능에 필요할 것 같은 보존된 잔기를 확인시켜주었다(Cameron *et al., Thromb. Haemost.* 79:317-22 (1998); US 6,251,632).

[0324] 응고 시스템의 기능을 평가하기 위한 다수의 시험이 이용 가능하다: 활성화 부분 트롬보플라스틴 시간(activated partial thromboplastin time: aPTT) 시험, 발색 검정, 로템(ROTEM) 검정, 프로트롬빈 시간(PT) 시험(또한 INR을 결정하도록 사용됨), 피브리노겐 시험(대개 클라우스(Clauss) 방법에 의함), 혈소판 계수, 혈소판 기능 시험(대개 PFA-100에 의함), TCT, 출혈 시간, 혼합 시험(환자의 혈장이 정상 혈장과 혼합될 때 비정상이 수정되는지에 관함), 응고 인자 검정, 항인지질 항체, D-이합체, 유전자 시험(예를 들면, V 인자 라이덴(Leiden), 프로트롬빈 돌연변이 G20210A), 희석 러셀 사독 시간(dilute Russell's viper venom time: dRVVT), 기타 혈소판 기능 시험, 혈전탄성묘사법(TEG 또는 소노클롯(Sonoclot)), 혈전탄성측정법(TEM(등록상표), 예를 들면, 로템(등록상표)) 또는 유글로불린 용해 시간(euglobulin lysis time: ELT).

[0325] aPTT 시험은 "내재성"(또한 접촉 활성화 경로라 칭함) 및 일반 응고 경로 둘 다의 효율을 측정하는 성능 표시자이다. 이 시험은 상업적으로 구입 가능한 재조합 응고 인자, 예를 들면, FVIII 또는 FIX의 응고 활성을 측정하도록 흔히 이용된다. 이는 외재성 경로를 측정하는 프로트롬빈 시간(PT)과 함께 이용된다.

[0326] 로템 분석은 지혈의 전체 동역학에 대한 정보를 제공한다: 응고 시간, 혈전 형성, 혈전 안정성 및 용해. 혈전탄성측정법에서의 상이한 매개변수는 혈장 응고 시스템의 활성, 혈소판 기능, 섬유소용해 또는 이 상호작용에 영향을 미치는 많은 인자에 따라 달라진다. 이 검정은 2차 지혈의 완전한 리뷰를 제공할 수 있다.

[0327] FVIII 폴리펩타이드 및 폴리뉴클레오타이드 서열은 많은 기능성 단편, 돌연변이체 및 변형 버전이 있는 것처럼 공지되어 있다. 인간 FVIII 서열(전장)의 예는 하기 기재되어 있다.

표 3

전장 VIII 인자의 아미노산 서열

(전장 FVIII(FVIII 신호 펩타이드는 밑줄이 있고; FVIII 중쇄는 이중 밑줄이 있고; B 도메인은 이탤릭체이고; FVIII 경쇄는 평서체이다)

신호 펩타이드(서열 번호 3)

MQIELSTCFFLCLLRFCFS

성숙 VIII 인자(서열 번호 4)*

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT
DHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASE
GAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLV
KDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDR
DAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHT
FLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCP
EEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHY
IAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTRE
AIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGV
KHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGP
LLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLED
PEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKH
KMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNT
GDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR*SFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD*
PWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAI
DSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSS
TSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGP
LSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNAL
FKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPL
IHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKML
FLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKG
EFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVV
LPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHT
AHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRL
PLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLT
RSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQE
SSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDL
PKTSGKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANR
PGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKK
*DTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQR*EI
TRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVER
LWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLG
PYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTY
FWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQ
VTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYI
MDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYP
GVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDF
QITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGAR
QKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPII
ARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMF
ATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSM
YVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHP
QSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

[0328]

표 4

전장 FVIII을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열(서열 번호 5)*

```
 661                                                    ATG
   CAAATAGAGC TCTCCACCTG
 721   CTTCTTTCTG TGCCTTTTGC GATTCTGCTT TAGTGCCACC
   AGAAGATACT ACCTGGGTGC
 781   AGTGGAACTG TCATGGGACT ATATGCAAAG TGATCTCGGT
   GAGCTGCCTG TGGACGCAAG
 841   ATTTCCTCCT AGAGTGCCAA AATCTTTTCC ATTCAACACC
   TCAGTCGTGT ACAAAAAGAC
 901   TCTGTTTGTA GAATTCACGG ATCACCTTTT CAACATCGCT
   AAGCCAAGGC CACCCTGGAT
 961   GGGTCTGCTA GGTCCTACCA TCCAGGCTGA GGTTTATGAT
   ACAGTGGTCA TTACACTTAA
1021   GAACATGGCT TCCCATCCTG TCAGTCTTCA TGCTGTTGGT
   GTATCCTACT GGAAAGCTTC
1081   TGAGGGAGCT GAATATGATG ATCAGACCAG TCAAAGGGAG
   AAAGAAGATG ATAAAGTCTT
1141   CCCTGGTGGA AGCCATACAT ATGTCTGGCA GGTCCTGAAA
   GAGAATGGTC CAATGGCCTC
1201   TGACCCACTG TGCCTTACCT ACTCATATCT TTCTCATGTG
   GACCTGGTAA AAGACTTGAA
1261   TTCAGGCCTC ATTGGAGCCC TACTAGTATG TAGAGAAGGG
   AGTCTGGCCA AGGAAAAGAC
1321   ACAGACCTTG CACAAATTTA TACTACTTTT TGCTGTATTT
   GATGAAGGGA AAAGTTGGCA
1381   CTCAGAAACA AAGAACTCCT TGATGCAGGA TAGGGATGCT
   GCATCTGCTC GGGCCTGGCC
1441   TAAAATGCAC ACAGTCAATG GTTATGTAAA CAGGTCTCTG
   CCAGGTCTGA TTGGATGCCA
1501   CAGGAAATCA GTCTATTGGC ATGTGATTGG AATGGGCACC
   ACTCCTGAAG TGCACTCAAT
1561   ATTCCTCGAA GGTCACACAT TTCTTGTGAG GAACCATCGC
   CAGGCGTCCT TGGAAATCTC
1621   GCCAATAACT TTCCTTACTG CTCAAACACT CTTGATGGAC
   CTTGGACAGT TTCTACTGTT
1681   TTGTCATATC TCTTCCCACC AACATGATGG CATGGAAGCT
   TATGTCAAAG TAGACAGCTG
1741   TCCAGAGGAA CCCCAACTAC GAATGAAAAA TAATGAAGAA
   GCGGAAGACT ATGATGATGA
1801   TCTTACTGAT TCTGAAATGG ATGTGGTCAG GTTTGATGAT
   GACAACTCTC CTTCCTTTAT
1861   CCAAATTCGC TCAGTTGCCA AGAAGCATCC TAAAACTTGG
   GTACATTACA TTGCTGCTGA
1921   AGAGGAGGAC TGGGACTATG CTCCCTTAGT CCTCGCCCCC
   GATGACAGAA GTTATAAAAG
1981   TCAATATTTG AACAATGGCC CTCAGCGGAT TGGTAGGAAG
   TACAAAAAAG TCCGATTTAT
2041   GGCATACACA GATGAAACCT TTAAGACTCG TGAAGCTATT
   CAGCATGAAT CAGGAATCTT
2101   GGGACCTTTA CTTTATGGGG AAGTTGGAGA CACACTGTTG
   ATTATATTTA AGAATCAAGC
2161   AAGCAGACCA TATAACATCT ACCCTCACGG AATCACTGAT
   GTCCGTCCTT TGTATTCAAG
```

[0329]

```
2221  GAGATTACCA AAAGGTGTAA AACATTTGAA GGATTTTCCA
   ATTCTGCCAG GAGAAATATT
2281  CAAATATAAA TGGACAGTGA CTGTAGAAGA TGGGCCAACT
   AAATCAGATC CTCGGTGCCT
2341  GACCCGCTAT TACTCTAGTT TCGTTAATAT GGAGAGAGAT
   CTAGCTTCAG GACTCATTGG
2401  CCCTCTCCTC ATCTGCTACA AAGAATCTGT AGATCAAAGA
   GGAAACCAGA TAATGTCAGA
2461  CAAGAGGAAT GTCATCCTGT 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 AAACTGTCTT 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 TTTGCACACA GAACACCTAT GCCTAAAATA
   CAAAATGTCT CCTCTAGTGA
3121  TTTGTTGATG CTCTTGCGAC AGAGTCCTAC TCCACATGGG
   CTATCCTTAT CTGATCTCCA
3181  AGAAGCCAAA TATGAGACTT TTTCTGATGA TCCATCACCT
   GGAGCAATAG ACAGTAATAA
3241  CAGCCTGTCT 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 CACTCTATTT
   GGCAAAAAGT CATCTCCCCT
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
```

[0330]

```
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
   TTCTTGTCTG AGAAAAACAA
4201  AGTGGTAGTA GGAAAGGGTG AATTTACAAA GGACGTAGGA
   CTCAAAGAGA TGGTTTTTCC
4261  AAGCAGCAGA AACCTATTTC TTACTAACTT GGATAATTTA
   CATGAAAATA ATACACACAA
4321  TCAAGAAAAA AAAATTCAGG AAGAAATAGA AAAGAAGGAA
   ACATTAATCC AAGAGAATGT
4381  AGTTTTGCCT CAGATACATA CAGTGACTGG CACTAAGAAT
   TTCATGAAGA ACCTTTTCTT
4441  ACTGAGCACT AGGCAAAATG TAGAAGGTTC ATATGACGGG
   GCATATGCTC CAGTACTTCA
4501  AGATTTTAGG TCATTAAATG ATTCAACAAA TAGAACAAAG
   AAACACACAG CTCATTTCTC
4561  AAAAAAAGGG GAGGAAGAAA ACTTGGAAGG CTTGGGAAAT
   CAAACCAAGC AAATTGTAGA
4621  GAAATATGCA TGCACCACAA GGATATCTCC TAATACAAGC
   CAGCAGAATT TTGTCACGCA
4681  ACGTAGTAAG AGAGCTTTGA AACAATTCAG ACTCCCACTA
   GAAGAAACAG AACTTGAAAA
4741  AAGGATAATT GTGGATGACA CCTCAACCCA GTGGTCCAAA
   AACATGAAAC ATTTGACCCC
4801  GAGCACCCTC ACACAGATAG ACTACAATGA GAAGGAGAAA
   GGGGCCATTA CTCAGTCTCC
4861  CTTATCAGAT TGCCTTACGA GGAGTCATAG CATCCCTCAA
   GCAAATAGAT CTCCATTACC
4921  CATTGCAAAG GTATCATCAT TTCCATCTAT TAGACCTATA
   TATCTGACCA GGGTCCTATT
4981  CCAAGACAAC TCTTCTCATC TTCCAGCAGC ATCTTATAGA
   AAGAAAGATT CTGGGGTCCA
5041  AGAAAGCAGT CATTTCTTAC AAGGAGCCAA AAAAAATAAC
   CTTTCTTTAG CCATTCTAAC
5101  CTTGGAGATG ACTGGTGATC AAAGAGAGGT TGGCTCCCTG
   GGGACAAGTG 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
   CAAGAGAAGT CACCAGAAAA
5521  AACAGCTTTT AAGAAAAAGG ATACCATTTT GTCCCTGAAC
   GCTTGTGAAA GCAATCATGC
```

[0331]

```
5581  AATAGCAGCA ATAAATGAGG GACAAAATAA GCCCGAAATA
   GAAGTCACCT GGGCAAAGCA
5641  AGGTAGGACT GAAAGGCTGT GCTCTCAAAA CCCACCAGTC
   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  TGGAGAACTA AATGAACATT TGGGACTCCT GGGGCCATAT
   ATAAGAGCAG AAGTTGAAGA
6061  TAATATCATG GTAACTTTCA GAAATCAGGC CTCTCGTCCC
   TATTCCTTCT ATTCTAGCCT
6121  TATTTCTTAT GAGGAAGATC AGAGGCAAGG AGCAGAACCT
   AGAAAAAACT TTGTCAAGCC
6181  TAATGAAACC AAAACTTACT TTTGGAAAGT 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  GTACTTCACT GAAAATATGG AAAGAAACTG CAGGGCTCCC
   TGCAATATCC AGATGGAAGA
6481  TCCCACTTTT AAAGAGAATT ATCGCTTCCA TGCAATCAAT
   GGCTACATAA TGGATACACT
6541  ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG GATTCGATGG
   TATCTGCTCA GCATGGGCAG
6601  CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTCAG TGGACATGTG
   TTCACTGTAC GAAAAAAAGA
6661  GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA TCCAGGTGTT
   TTTGAGACAG TGGAAATGTT
6721  ACCATCCAAA GCTGGAATTT GGCGGGTGGA ATGCCTTATT
   GGCGAGCATC TACATGCTGG
6781  GATGAGCACA CTTTTTCTGG TGTACAGCAA TAAGTGTCAG
   ACTCCCCTGG GAATGGCTTC
6841  TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA
   TATGGACAGT GGGCCCCAAA
6901  GCTGGCCAGA CTTCATTATT CCGGATCAAT CAATGCCTGG
   AGCACCAAGG AGCCCTTTTC
6961  TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACCAAT GATTATTCAC
   GGCATCAAGA CCCAGGGTGC
7021  CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC
   ATCATGTATA GTCTTGATGG
7081  GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC
   TTAATGGTCT TCTTTGGCAA
7141  TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTTAACCCT
   CCAATTATTG CTCGATACAT
7201  CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCG CAGCACTCTT
   CGCATGGAGT TGATGGGCTG
```

[0332]

```
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
   GTAACTACTC AGGGAGTAAA
7501  ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC
   TCCAGCAGTC AAGATGGCCA
7561  TCAGTGGACT CTCTTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT
   TTTCAGGGAA ATCAAGACTC
7621  CTTCACACCT GTGGTGAACT CTCTAGACCC ACCGTTACTG
   ACTCGCTACC TTCGAATTCA
7681  CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG
   GTTCTGGGCT GCGAGGCACA
7741  GGACCTCTAC
```

* 밑줄친 핵산은 신호 펩타이드를 코딩한다.

[0333]

[0334] FVIII 폴리펩타이드는 전장 FVIII, N 말단에서 Met를 제외한 전장 FVIII, 성숙 FVIII(신호 서열 제외), N 말단

에서 추가의 Met를 갖는 성숙 FVIII 및/또는 B 도메인의 완전 또는 부분 결실을 갖는 FVIII을 포함한다. 소정의 실시형태에서, FVIII 변이체는 부분 결실 또는 완전 결실이든 B 도메인 결실을 포함한다.

[0335] 네이티브 성숙 인간 FVIII의 서열은 서열 번호 4로 제시된다. 네이티브 FVIII 단백질은 A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2(여기서, A1, A2 및 A3은 구조적 관련 "A 도메인"이고, B는 "B 도메인"이며, C1 및 C2는 구조적 관련 "C 도메인"이고, a1, a2 및 a3은 산성 스페이서 구역임)의 식을 갖는다. 서열 번호 4에서의 1차 아미노산 서열 위치를 언급 시, 인간 FVIII의 A1 도메인은 Ala1로부터 약 Arg336으로부터 연장되고, a1 스페이서 구역은 약 Met337로부터 약 Val374로부터 연장되고, A2 도메인은 약 Ala375로부터 약 Tyr719로부터 연장되고, a2 스페이서 구역은 약 Glu720으로부터 약 Arg740으로부터 연장되고, B 도메인은 약 Ser741로부터 약 Arg 1648로부터 연장되고, a3 스페이서 구역은 약 Glu1649로부터 약 Arg1689로부터 연장되고, A3 도메인은 Ser1690으로부터 약 Leu2025로부터 연장되고, C1 도메인은 약 Gly2026으로부터 약 Asn2072로부터 연장되고, C2 도메인은 약 Ser2073으로부터 Tyr2332로부터 연장된다. 특이적 단백분해 개열 자리 이외에, FVIII의 도메인과 구역 사이의 경계의 위치의 지칭은 상이한 참고 문헌에서 다를 수 있다. 본 명세서에 표시된 경계는 따라서 용어 "약"의 사용에 의해 근사인 것으로 지칭된다.

[0336] 인간 FVIII 유전자는 포유동물 세포에서 단리되고 발현된다(Toole, J. J., *et al., Nature* 312:342-347 (1984); Gitschier, J., *et al., Nature* 312:326-330 (1984); Wood, W. I., *et al., Nature* 312:330-337 (1984); Vehar, G. A., *et al., Nature* 312:337-342 (1984); WO 87/04187; WO 88/08035; WO 88/03558; 및 미국 특허 제4,757,006호). FVIII 아미노산 서열은 미국 특허 제4,965,199호에 기재된 cDNA로부터 추론되었다. 또한, 부분 또는 완전 B 도메인 결실 FVIII은 미국 특허 제4,994,371호 및 4,868,112호에 기재되어 있다. 몇몇 실시형태에서, 인간 FVIII B 도메인은 미국 특허 제5,004,803호에 기재된 인간 V 인자 B 도메인으로 대체된다. 인간 VIII 인자를 코딩하는 cDNA 서열 및 아미노산 서열은 각각 미국 출원 공보 제2005/0100990호의 서열 번호 4 및 서열 번호 5에 기재되어 있다.

[0337] 돼지과 FVIII 서열은 문헌[Toole, J. J., *et al., Proc. Natl. Acad.* Sci. USA 83:5939-5942 (1986)]에서 공개되어 있다. 추가로, 돼지 비장 cDNA 라이브러리로부터의 FVIII 서열의 PCR 증폭으로부터 얻은 완전한 돼지과 cDNA 서열은 문헌[Healey, J. F., *et al., Blood* 88:4209-4214 (1996)]에 보고되어 있다. 모든 도메인, 모든 아단위 및 특이적 아미노산 서열의 치환을 갖는 하이브리드 인간/돼지과 FVIII은 미국 특허 제5,364,771호(Lollar 및 Runge) 및 WO 93/20093에 개시되어 있다. 더 최근에, 돼지과 FVIII 및 키메라 FVIII(돼지과 A1 및/또는 A2 도메인이 상응하는 인간 도메인에 대해 치환됨)의 A1 및 A2 도메인의 뉴클레오타이드 및 상응하는 아미노산 서열은 WO 94/11503에 보고되어 있다. 미국 특허 제5,859,204호(Lollar, J. S.)는 또한 돼지과 cDNA 및 추론된 아미노산 서열을 개시한다. 미국 특허 제6,458,563호는 B 도메인 결실 돼지과 FVIII을 개시한다.

[0338] 미국 특허 제5,859,204호(Lollar, J. S.)는 감소된 항원성 및 감소된 면역반응성을 갖는 FVIII의 기능성 돌연변이체를 보고한다. 미국 특허 제6,376,463호(Lollar, J. S.)는 또한 감소된 면역반응성을 갖는 FVIII의 돌연변이체를 보고한다. 미국 출원 공보 제2005/0100990호(Saenko 등)는 FVIII의 A2 도메인에서의 기능성 돌연변이를 보고한다.

[0339] 일 실시형태에서, FVIII(또는 키메라 단백질의 FVIII 부분)은 서열 번호 6의 1번 내지 1438번 아미노산 또는 서열 번호 4(신호 서열 없음)의 1번 내지 2332번 아미노산의 FVIII 아미노산 서열, 또는 서열 번호 3의 1번 내지 19번 아미노산 및 서열 번호 6의 1번 내지 1438번 아미노산 또는 서열 번호 3의 1번 내지 19번 아미노산 및 서열 번호 4(신호 서열 없음)의 1번 내지 2332번 아미노산의 FVIII 아미노산 서열과 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일할 수 있고, FVIII은 응고 활성을 갖고, 예를 들면, 보조인자로서 IX 인자를 활성화하여 X 인자를 활성화 X 인자로 전환시킨다. FVIII(또는 키메라 단백질의 FVIII 부분)은 서열 번호 6의 1번 내지 1438번 아미노산 또는 서열 번호 4(신호 서열 없음)의 1번 내지 2332번 아미노산의 FVIII 아미노산 서열과 동일할 수 있다. FVIII은 신호 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[0340] 본 명세서에 사용되는 바대로, FVIII의 "B 도메인"은 내부 아미노산 서열 동일성 및 단백분해 개열의 자리, 예를 들면, 전장 인간 FVIII의 Ser741-Arg1648 잔기에 의해 정의된, 당해 분야에 공지된 B 도메인과 동일하다. 다른 인간 FVIII 도메인은 하기 아미노산 잔기에 의해 정의된다: A1, Ala1-Arg372 잔기; A2, Ser373-Arg740 잔기; A3, Ser1690-Asn2019 잔기; C1, Lys2020-Asn2172 잔기; C2, Ser2173-Tyr2332 잔기. A3-C1-C2 서열은 Ser1690-Tyr2332 잔기를 포함한다. Glu1649-Arg1689 잔기인 남은 서열은 일반적으로 a3 산성 구역이라 칭한다. 돼지과, 마우스 및 고양이과 FVIII의 경우 B 도메인을 포함하는 모든 도메인에 대한 경계의 위치는 또한 당해 분야에 공지되어 있다. 일 실시형태에서, FVIII의 B 도메인은 결실된다("B 도메인 결실 VIII 인자" 또는 "BDD

FVIII"). BDD FVIII의 예는 표 5에서의 서열의 VIII 인자 부분과 동일한 서열을 갖는 레팍토(등록상표)(재조합 BDD FVIII)이다. (BDD FVIII 중쇄는 이중 밑줄이 있고; B 도메인은 이탤릭체이고; BDD FVIII 경쇄는 평서체이다). 표 5에 기재된 아미노산 서열(서열 번호 7)을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 표 6에 기재되어 있다.

표 5

B-도메인 결실 VIII 인자(BDD FVIII)의 아미노산 서열

BDD FVIII (서열 번호 6)
ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT DHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASE GAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLV KDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDR DAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHT FLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCP EEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHY IAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTRE AIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGV KHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGP LLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLED PEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKH KMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNT GDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR*SFSQNPPVLKRHQR*EITRTTLQSDQEEIDY DDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLR NRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVT FRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDE FDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFD ETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQR IRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAG IWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPK LARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIM YSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIR STLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQG RSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGH QWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVL GCEAQDLY

[0341]

표 6

BDD FVIII 을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열(서열 번호 7)*

```
 661                                          A TGCAAATAGA
   GCTCTCCACC TGCTTCTTTC
 721  TGTGCCTTTT GCGATTCTGC TTTAGTGCCA CCAGAAGATA
   CTACCTGGGT GCAGTGGAAC
 781  TGTCATGGGA CTATATGCAA AGTGATCTCG GTGAGCTGCC
   TGTGGACGCA AGATTTCCTC
 841  CTAGAGTGCC AAAATCTTTT CCATTCAACA CCTCAGTCGT
   GTACAAAAAG ACTCTGTTTG
 901  TAGAATTCAC GGATCACCTT TTCAACATCG CTAAGCCAAG
   GCCACCCTGG ATGGGTCTGC
 961  TAGGTCCTAC CATCCAGGCT GAGGTTTATG ATACAGTGGT
   CATTACACTT AAGAACATGG
1021  CTTCCCATCC TGTCAGTCTT CATGCTGTTG GTGTATCCTA
   CTGGAAAGCT TCTGAGGGAG
1081  CTGAATATGA TGATCAGACC AGTCAAAGGG AGAAAGAAGA
   TGATAAAGTC TTCCCTGGTG
1141  GAAGCCATAC ATATGTCTGG CAGGTCCTGA AAGAGAATGG
   TCCAATGGCC TCTGACCCAC
1201  TGTGCCTTAC CTACTCATAT CTTTCTCATG TGGACCTGGT
   AAAAGACTTG AATTCAGGCC
1261  TCATTGGAGC CCTACTAGTA TGTAGAGAAG GGAGTCTGGC
   CAAGGAAAAG ACACAGACCT
1321  TGCACAAATT TATACTACTT TTTGCTGTAT TTGATGAAGG
   GAAAAGTTGG CACTCAGAAA
1381  CAAAGAACTC CTTGATGCAG GATAGGGATG CTGCATCTGC
   TCGGGCCTGG CCTAAAATGC
1441  ACACAGTCAA TGGTTATGTA AACAGGTCTC TGCCAGGTCT
   GATTGGATGC CACAGGAAAT
1501  CAGTCTATTG GCATGTGATT GGAATGGGCA CCACTCCTGA
   AGTGCACTCA ATATTCCTCG
1561  AAGGTCACAC ATTTCTTGTG AGGAACCATC GCCAGGCGTC
   CTTGGAAATC TCGCCAATAA
1621  CTTTCCTTAC TGCTCAAACA CTCTTGATGG ACCTTGGACA
   GTTTCTACTG TTTTGTCATA
1681  TCTCTTCCCA CCAACATGAT GGCATGGAAG CTTATGTCAA
   AGTAGACAGC TGTCCAGAGG
1741  AACCCCAACT ACGAATGAAA AATAATGAAG AAGCGGAAGA
   CTATGATGAT GATCTTACTG
1801  ATTCTGAAAT GGATGTGGTC AGGTTTGATG ATGACAACTC
   TCCTTCCTTT ATCCAAATTC
1861  GCTCAGTTGC CAAGAAGCAT CCTAAAACTT GGGTACATTA
   CATTGCTGCT GAAGAGGAGG
1921  ACTGGGACTA TGCTCCCTTA GTCCTCGCCC CCGATGACAG
   AAGTTATAAA AGTCAATATT
1981  TGAACAATGG CCCTCAGCGG ATTGGTAGGA AGTACAAAAA
   AGTCCGATTT ATGGCATACA
2041  CAGATGAAAC CTTTAAGACT CGTGAAGCTA TTCAGCATGA
   ATCAGGAATC TTGGGACCTT
2101  TACTTTATGG GGAAGTTGGA GACACACTGT TGATTATATT
   TAAGAATCAA GCAAGCAGAC
2161  CATATAACAT CTACCCTCAC GGAATCACTG ATGTCCGTCC
   TTTGTATTCA AGGAGATTAC
```

[0342]

```
2221  CAAAAGGTGT 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 GTTTGTTTGC
2641  ATGAGGTGGC ATACTGGTAC ATTCTAAGCA TTGGAGCACA
   GACTGACTTC CTTTCTGTCT
2701  TCTTCTCTGG ATATACCTTC AAACACAAAA TGGTCTATGA
   AGACACACTC ACCCTATTCC
2761  CATTCTCAGG AGAAACTGTC TTCATGTCGA TGGAAAACCC
   AGGTCTATGG ATTCTGGGGT
2821  GCCACAACTC AGACTTTCGG AACAGAGGCA TGACCGCCTT
   ACTGAAGGTT TCTAGTTGTG
2881  ACAAGAACAC TGGTGATTAT TACGAGGACA GTTATGAAGA
   TATTTCAGCA TACTTGCTGA
2941  GTAAAAACAA TGCCATTGAA CCAAGAAGCT TCTCTCAAAA
   CCCACCAGTC 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 GTAACTTTCA GAAATCAGGC
   CTCTCGTCCC TATTCCTTCT
3421  ATTCTAGCCT TATTTCTTAT GAGGAAGATC AGAGGCAAGG
   AGCAGAACCT AGAAAAAACT
3481  TTGTCAAGCC TAATGAAACC AAAACTTACT TTTGGAAAGT
   GCAACATCAT ATGGCACCCA
3541  CTAAAGATGA GTTTGACTGC AAAGCCTGGG CTTATTTCTC
   TGATGTTGAC CTGGAAAAAG
3601  ATGTGCACTC AGGCCTGATT GGACCCCTTC TGGTCTGCCA
   CACTAACACA CTGAACCCTG
3661  CTCATGGGAG ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT
   TTTCACCATC TTTGATGAGA
3721  CCAAAAGCTG GTACTTCACT GAAAATATGG AAAGAAACTG
   CAGGGCTCCC TGCAATATCC
3781  AGATGGAAGA TCCCACTTTT AAAGAGAATT ATCGCTTCCA
   TGCAATCAAT GGCTACATAA
3841  TGGATACACT ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG
   GATTCGATGG TATCTGCTCA
```

[0343]

```
3901  GCATGGGCAG CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTCAG
   TGGACATGTG TTCACTGTAC
3961  GAAAAAAAGA GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA
   TCCAGGTGTT TTTGAGACAG
4021  TGGAAATGTT ACCATCCAAA GCTGGAATTT GGCGGGTGGA
   ATGCCTTATT GGCGAGCATC
4081  TACATGCTGG GATGAGCACA CTTTTTCTGG TGTACAGCAA
   TAAGTGTCAG ACTCCCCTGG
4141  GAATGGCTTC TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC
   TTCAGGACAA TATGGACAGT
4201  GGGCCCCAAA GCTGGCCAGA CTTCATTATT CCGGATCAAT
   CAATGCCTGG AGCACCAAGG
4261  AGCCCTTTTC TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACCAAT
   GATTATTCAC GGCATCAAGA
4321  CCCAGGGTGC CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC
   TCAGTTTATC ATCATGTATA
4381  GTCTTGATGG GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC
   CACTGGAACC TTAATGGTCT
4441  TCTTTGGCAA TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT
   TTTTAACCCT CCAATTATTG
4501  CTCGATACAT CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCG
   CAGCACTCTT CGCATGGAGT
4561  TGATGGGCTG TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG
   AATGGAGAGT AAAGCAATAT
4621  CAGATGCACA GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT
   GTTTGCCACC TGGTCTCCTT
4681  CAAAAGCTCG ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG
   GAGACCTCAG GTGAATAATC
4741  CAAAAGAGTG GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA
   AGTCACAGGA GTAACTACTC
4801  AGGGAGTAAA ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA
   GTTCCTCATC TCCAGCAGTC
4861  AAGATGGCCA TCAGTGGACT CTCTTTTTTC AGAATGGCAA
   AGTAAAGGTT TTTCAGGGAA
4921  ATCAAGACTC CTTCACACCT GTGGTGAACT CTCTAGACCC
   ACCGTTACTG ACTCGCTACC
4981  TTCGAATTCA CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT
   GAGGATGGAG GTTCTGGGCT
5041  GCGAGGCACA GGACCTCTAC
```

* 밑줄친 핵산은 신호 펩타이드를 코딩한다

[0344]

[0345] "B 도메인 결실 FVIII"은 미국 특허 제6,316,226호, 제6,346,513호, 제7,041,635호, 제5,789,203호, 제6,060,447호, 제5,595,886호, 제6,228,620호, 제5,972,885호, 제6,048,720호, 제5,543,502호, 제5,610,278호, 제5,171,844호, 제5,112,950호, 제4,868,112호 및 제6,458,563호에 개시된 완전 또는 부분 결실을 가질 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 B 도메인 결실 FVIII 서열은 미국 특허 제6,316,226의 4행 4라인 내지 5행 28라인 및 실시예 1 내지 5(또한 US 제6,346,513호)에 개시된 결실 중 임의의 하나를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, B 도메인 결실 VIII 인자는 S743/Q1638 B 도메인 결실 VIII 인자(SQ BDD FVIII)(예를 들면, 744번 아미노산 내지 1637번 아미노산의 결실을 갖는 VIII 인자, 예를 들면, 서열 번호 4의 1-743번 아미노산 및 1638-2332번 아미노산을 갖는 VIII 인자, 즉 서열 번호 6)이다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 B 도메인 결실 FVIII은 미국 특허 제5,789,203호(또한 US 제6,060,447호, US 제5,595,886호 및 US 제6,228,620호)의 2행 26-51라인 및 실시예 5-8에 개시된 결실을 갖는다. 몇몇 실시형태에서, B 도메인 결실 VIII 인자는 미국 특허 제5,972,885호의 1행 25라인 내지 2행 40라인; 미국 특허 제6,048,720호의 6행 1-22라인 및 실시예 1; 미국 특허 제5,543,502호의 2행 17-46라인; 미국 특허 제5,171,844호의 4행 22라인 내지 5행 36라인; 미국 특허 제5,112,950호의 2행 55-68라인, 도 2 및 실시예 1; 미국 특허 제4,868,112호의 2행 2라인 내지 19행 21라인 및 표 2; 미국 특허 제7,041,635호의 2행 1라인 내지 3행 19라인, 3행 40라인 내지 4행 67라인, 7행 43라인 내지 8행 26라인 및 11행 5라인 내지 13행 39라인; 또는 미국 특허 제6,458,563호의 4행 25-53라인에 기재된 결실을 갖는다. 몇몇 실시형태에서, B 도메인 결실 FVIII은 대부분의 B 도메인의 결실을 갖지만, WO 제91/09122호에 개시된 바대로 1차 번역 생성물의 2개의 폴리펩타이드 사슬로의 *생체내* 단백분해 처리에 필수적인 B 도메인의 아미노 말단 서열을 여전히 포함한다. 몇몇 실시형태에서, B 도메인 결실 FVIII은 747-1638번 아미노산의 결실, 즉 B 도메인의 실질적으로 완전한 결실로 작제된다. Hoeben R.C., *et al. J. Biol. Chem.* 265 (13): 7318-7323 (1990). B 도메인 결실 VIII 인자는 FVIII의 771-1666번 아미노산 또는 868-1562번 아미노산의 결실을 또한 포함할 수 있다. Meulien P., *et al. Protein Eng.* 2(4): 301-6 (1988). 본 발명의 일부인 추가의 B 도메인 결실은 982번 내지 1562번 또는 760번 내지 1639번 아미노산(Toole *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1986) 83, 5939-5942)), 797번 내지 1562번 아미노산(Eaton, *et al. Biochemistry* (1986) 25:8343-8347)), 741번 내지 1646번 아미노산(카우프만(Kaufman)(PCT 공개 출원 WO 제87/04187호)), 747번 내지 1560번 아미노산(Sarver, *et al., DNA* (1987) 6:553-564)), 741번 내지 1648번 아미노산(파섹(Pasek)(PCT 출원 제88/00831호))

또는 816번 내지 1598번 또는 741번 내지 1648번 아미노산(Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988) No 82:16-25, EP 295597))의 결실을 포함한다. 다른 실시형태에서, BDD FVIII은 하나 이상의 N-연결 글라이코실화 자리, 예를 들면, 전장 FVIII 서열의 아미노산 서열에 상응하는 757번, 784번, 828번, 900번, 963번 또는 임의로 943번 잔기를 보유하는 B 도메인의 단편을 포함하는 FVIII 폴리펩타이드를 포함한다. B 도메인 단편의 예는 문헌[Miao, H.Z., *et al., Blood* 103(a): 3412-3419 (2004), Kasuda, A, *et al., J. Thromb. Haemost*. 6: 1352-1359 (2008), 및 Pipe, S.W., *et al., J. Thromb. Haemost*. 9: 2235-2242 (2011)]에 개시된 바대로 B 도메인의 226개의 아미노산 또는 163개의 아미노산을 포함한다(즉, B 도메인의 제1 226개의 아미노산 또는 163개의 아미노산이 보유됨). 또 다른 실시형태에서, BDD FVIII은 BDD FVIII 단백질의 발현을 개선하기 위해 309번 잔기(Phe로부터 Ser까지)에서 점 돌연변이를 추가로 포함한다. 문헌[Miao, H.Z., et al., Blood 103(a): 3412-3419 (2004)]을 참조한다. 또 다른 실시형태에서, BDD FVIII은 B 도메인의 일부를 포함하지만, 하나 이상의 퓨린 개열 자리(예를 들면, Arg1313 및 Arg 1648)를 포함하지 않는 FVIII 폴리펩타이드를 포함한다. 문헌[Pipe, S.W., *et al., J. Thromb. Haemost*. 9: 2235-2242 (2011)]을 참조한다. 각각의 상기 결실은 임의의 FVIII 서열에서 이루어질 수 있다.

[0346] 몇몇 실시형태에서, FVIII은 부분 B 도메인을 갖는다. 몇몇 실시형태에서, 부분 B 도메인을 갖는 FVIII 단백질은 FVIII198(서열 번호 89)이다. FVIII198은 단일 사슬 FVIIIFc 분자-226N6을 포함하는 부분 B 도메인이다. 226은 FVIII B 도메인의 N 말단 226개 아미노산을 나타내고, N6은 B 도메인의 6개의 N-글라이코실화 자리를 나타낸다.

[0347] 일 실시형태에서, FVIII은 (전장 VIII 인자 또는 서열 번호 4에서) 1648번 아미노산, (S743/Q1638 B 도메인 결실 VIII 인자 또는 서열 번호 6에서) 754번 아미노산 또는 (다른 변이체에서) 상응하는 아르기닌 잔기에서 아르기닌 바로 뒤에 개열되어, 중쇄 및 경쇄를 생성시킨다. 또 다른 실시형태에서, FVIII은 금속 이온 매개 비공유 결합에 의해 연결되거나 회합된 중쇄 및 경쇄를 포함한다.

[0348] 다른 실시형태에서, FVIII은 (전장 FVIII 또는 서열 번호 4에서) 1648번 아미노산, (S743/Q1638 B 도메인 결실 FVIII 또는 서열 번호 6에서) 754번 아미노산 또는 (다른 변이체에서) 상응하는 아르기닌 잔기에서 아르기닌 바로 뒤에 개열되지 않는 단일 사슬 FVIII이다. 단일 사슬 FVIII은 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 아미노산 치환은 전장 성숙 VIII 인자 폴리펩타이드(서열 번호 4)의 1648번 잔기, 1645번 잔기 또는 둘 다, 또는 SQ BDD VIII 인자(서열 번호 6)의 754번 잔기, 751번 잔기 또는 둘 다에 상응하는 잔기에 있다. 아미노산 치환은 아르기닌 이외의 임의의 아미노산, 예를 들면, 아이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 트레오닌, 트립토판, 발린, 알라닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루탐산, 글루타민, 글라이신, 프롤린, 셀레노시스테인, 세린, 타이로신, 히스티딘, 오르니틴, 피롤라이신 또는 타우린일 수 있다.

[0349] FVIII은 추가로 트롬빈에 의해 개열되고 이후 활성화 IX 인자(FIXa)에 대한 보조인자로서 작용하는 FVIIIa로 활성화될 수 있다. 그리고, 활성화 FIX는 활성화 FVIII과 함께 Xase 복합체를 형성하고 X 인자를 활성화 X 인자(FXa)로 전환시킨다. 활성화를 위해, FVIII은 (B 도메인 결실 FVIII 서열에서의 372번, 740번 및 795번 아미노산에 상응하는) 372번, 740번 및 1689번 아미노산에서의 3개의 아르기닌 잔기 뒤에 트롬빈에 의해 개열되고, 개열은 50kDa의 A1, 43kDa의 A2 및 73kDa의 A3-C1-C2 사슬을 갖는 FVIIIa를 생성시킨다. 일 실시형태에서, 본 발명에 유용한 FVIII 단백질은 비활성 FVIII이다. 또 다른 실시형태에서, FVIII 단백질은 활성화 FVIII이다.

[0350] VWF 단편에 연결되거나 이것과 회합된 FVIII 폴리펩타이드를 갖는 단백질은 서열 번호 4 또는 서열 번호 6과 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 서열을 포함할 수 있고, 서열은 FVIII 응고 활성을 갖고 예를 들면 X 인자를 활성화 X 인자(FXa)로 전환시키는 보조인자로서 IX 인자를 활성화한다.

[0351] 본 명세서에 사용되는 바대로, "하이브리드" 또는 "키메라" 폴리펩타이드 및 단백질은 임의로 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 융합된 제1 폴리펩타이드 사슬, 예를 들면, VWF 단편과, 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 임의로 융합된 제2 폴리펩타이드 사슬, 예를 들면, XTEN 서열에 연결된 FVIII 단백질의 조합(이로써 이종이합체를 형성함)을 포함한다. 일 실시형태에서, 하이브리드에서의 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드는 단백질-단백질 상호작용, 예컨대 전하-전하 또는 소수성 상호작용을 통해 서로 회합된다. 또 다른 실시형태에서, 하이브리드에서의 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드는 이황화 또는 다른 공유 결합(들)을 통해 서로 회합된다. 하이브리드는 예를 들면 US 제2004/101740호 및 US 제2006/074199호에 기재되어 있다. 제2 폴리펩타이드는 제1 폴리펩타이드 또는 비동일한 폴리펩타이드의 동일한 카피일 수 있다. 일 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드는 FVIII 단백질(X)-Fc 융합 단백질이고, 제2 폴리펩타이드는 Fc 구역을 포함하거나, 이것으로 실질적으로 이루어

지거나, 이것으로 이루어진 폴리펩타이드이고, 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드는 서로 회합된다. 또 다른 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드는 VWF 단편-XTEN-Fc 융합 단백질을 포함하고, 제2 폴리펩타이드는 FVIII-Fc 융합 단백질을 포함하여, 하이브리드가 이종이합체가 되게 한다. 다른 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드는 VWF 단편-Fc 융합 단백질을 포함하고, 제2 폴리펩타이드는 FVIII(X)-Fc 융합 단백질을 포함하여, 하이브리드가 이종이합체가 되게 한다. 또 다른 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드는 VWF 단편-XTEN-Fc 융합 단백질을 포함하고, 제2 폴리펩타이드는 FVIII(X)-Fc 융합 단백질을 포함한다. 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드는 제1 Fc 구역과 제2 Fc 구역 사이의 공유 결합, 예를 들면, 이황화 결합을 통해 회합될 수 있다. 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드는 추가로 VWF 단편과 FVIII 단백질 사이의 결합에 의해 서로 회합될 수 있다.

[0352] 본 발명에 유용한 FVIII 단백질은 FVIII 응고 활성에 영향을 미치지 않는 하나 이상의 추가의 XTEN 서열을 갖는 FVIII을 포함할 수 있다. 이러한 XTEN 서열은 FVIII 단백질의 C 말단 또는 N 말단에 융합되거나, FVIII 단백질 내의 2개의 아미노산 잔기 중 하나 이상 사이에 삽입될 수 있고, 삽입은 FVIII 응고 활성 또는 FVIII 기능에 영향을 미치지 않는다. 일 실시형태에서, 삽입은 FVIII 단백질의 약동학적 특성(예를 들면, 반감기)을 개선한다. 또 다른 실시형태에서, 삽입은 다수의 삽입, 예를 들면, 2개 초과, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 삽입일 수 있다. 삽입 자리의 예는 표 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 이들의 임의의 조합에 기재된 자리를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0353] 하나 이상의 XTEN 서열에 연결된 FVIII 단백질은 FVIII(X), FVIII(X1), $FVIII_{(a\rightarrow b)}$-X-$FVIII_{(c\rightarrow d)}$로 표시될 수 있되, $FVIII_{(a\rightarrow b)}$는 "a"번 아미노산 잔기로부터 "b"번 아미노산 잔기의 FVIII 단백질의 제1 부분을 포함하거나, 이것으로 실질적으로 이루어지거나, 이것으로 이루어지고; X 또는 X1은 하나 이상의 XTEN 서열을 포함하거나, 이것으로 실질적으로 이루어지거나, 이것으로 이루어지며, $FVIII_{(c\rightarrow d)}$는 "c"번 아미노산 잔기로부터 "d"번 아미노산 잔기의 FVIII 단백질의 제2 부분을 포함하거나, 이것으로 실질적으로 이루어지거나, 이것으로 이루어지고;

[0354] a는 FVIII 단백질의 제1 부분의 N 말단 아미노산 잔기이며,

[0355] b는 FVIII 단백질의 제1 부분의 C 말단 아미노산 잔기이지만, 또한 XTEN 서열이 삽입된 삽입 자리의 2개의 아미노산의 N 말단 아미노산 잔기이고,

[0356] c는 FVIII 단백질의 제2 부분의 N 말단 아미노산 잔기이지만, 또한 XTEN 서열이 삽입된 삽입 자리의 2개의 아미노산의 C 말단 아미노산 잔기이며,

[0357] d는 FVIII 단백질의 C 말단 아미노산 잔기이고,

[0358] FVIII 단백질의 제1 부분 및 FVIII 단백질의 제2 부분은 서로 동일하지 않고, 함께 충분한 길이를 가져, FVIII 단백질은 FVIII 응고 활성을 갖는다.

[0359] 일 실시형태에서, FVIII 단백질의 제1 부분 및 FVIII 단백질의 제2 부분은 각각 서열 번호 4[전장 성숙 FVIII 서열] 또는 서열 번호 6[B 도메인 결실 FVIII]의 단편, 예를 들면, N 말단 부분 및 C 말단 부분이다. 소정의 실시형태에서, FVIII 단백질의 제1 부분은 FVIII 단백질의 A1 도메인 및 A2 도메인을 포함한다. FVIII 단백질의 제2 부분은 A3 도메인, C1 도메인 및 임의로 C2 도메인을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, FVIII 단백질의 제1 부분은 A1 도메인 및 A2 도메인을 포함하고, FVIII 단백질의 제2 부분은 B 도메인의 부분, A3 도메인, C1 도메인 및 임의로 C2 도메인을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, FVIII 단백질의 제1 부분은 FVIII 단백질의 A1 도메인, A2 도메인 및 B 도메인의 부분을 포함하고, FVIII 단백질의 제2 부분은 A3 도메인, C1 도메인 및 임의로 C2 도메인을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, FVIII 단백질의 제1 부분은 FVIII 단백질의 A1 도메인, A2 도메인 및 B 도메인의 제1 부분을 포함한다. FVIII 단백질의 제2 부분은 B 도메인의 제2 부분, A3 도메인, C1 도메인 및 임의로 C2 도메인을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, 2개의 아미노산("b" 및 "c")은 표 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 및 15에 기재된 임의의 하나 이상의 아미노산 잔기 삽입 자리일 수 있다. 예를 들면, "b"는 하나 이상의 XTEN 서열이 삽입되거나 연결된 자리의 바로 상류의 아미노산 잔기일 수 있고, "c"는 하나 이상의 XTEN 서열이 삽입되거나 연결된 자리의 바로 하류의 아미노산 잔기일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, "a"는 FVIII 단백질의 제1 성숙 아미노산 서열이고, "d"는 FVIII 단백질의 마지막 아미노산 서열이다. 예를 들면, 각각, $FVIII_{(a\rightarrow b)}$는 서열 번호 6[B 도메인 결실 FVIII 아미노산 서열] 또는 서열 번호 4[전장 FVIII]의 1번 내지 745번 아미노산과 적어도 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열일 수 있고, $FVIII_{(c\rightarrow d)}$는 서열 번호 6의 746번 내지 1438번 아미노산 또는 서열 번호 4의 1641번 내지 2332번 아미노산일 수 있다.

[0360] 몇몇 양상에서, FVIII 단백질 내의 삽입 자리는 N 말단인 FVIII 단백질의 하나 이상의 도메인, A1 도메인, A2 도메인, A3 도메인, B 도메인, C1 도메인, C2 도메인, C 말단 또는 이들의 2개 이상의 조합에 위치하거나, A1 도메인과 a1 산성 구역, 및 a1 산성 구역과 A2 도메인, A2 도메인과 a2 산성 구역, a2 산성 구역과 B 도메인, B 도메인과 A3 도메인, 및 A3 도메인과 C1 도메인, C1 도메인과 C2 도메인, 또는 이들의 임의의 조합인 FVIII 단백질의 2개의 도메인 사이에 위치한다. 예를 들면, XTEN 서열이 삽입될 수 있는 삽입 자리는 N 말단 및 A1 도메인, N 말단 및 A2 도메인, N 말단 및 A3 도메인, N 말단 및 B 도메인, N 말단 및 C1 도메인, N 말단 및 C2 도메인, N 말단 및 C 말단, A1 및 A2 도메인, A1 및 A3 도메인, A1 및 B 도메인, A1 및 C1 도메인, A1 및 C2 도메인, A1 도메인 및 C 말단, A2 및 A3 도메인, A2 및 B 도메인, A2 및 C1 도메인, A2 및 C2 도메인, A2 도메인 및 C 말단, A3 및 B 도메인, A3 및 C1 도메인, A3 및 C2 도메인, A3 도메인 및 C 말단, B 및 C1 도메인, B 및 C2 도메인, B 도메인 및 C 말단, C1 및 C2 도메인, C1 및 C 말단, C2 도메인 및 C 말단, 및 이들의 2개 이상의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 삽입 자리의 비제한적인 예는 표 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 및 15에 기재되어 있다.

[0361] XTEN 서열이 FVIII 단백질 내의 하나 이상의 아미노산(예를 들면, 하나 이상의 XTEN 삽입 자리)의 바로 하류에 삽입되거나 C 말단 또는 N 말단에서 연결된 FVIII 단백질은 XTEN 서열에 대한 연결 또는 이에 의한 삽입 후 FVIII 활성을 보유한다. XTEN 서열은 1회 초과, 2회, 3회, 4회, 5회 또는 6회로 FVIII 단백질에서 삽입될 수 있어서, 삽입은 FVIII 활성에 영향을 미치지 않는다(즉, FVIII 단백질은 여전히 응고 특성을 보유한다).

[0362] 본 발명에 유용한 FVIII 단백질은 임의의 링커에 의해 FVIII 단백질의 N 말단 또는 C 말단에서 하나 이상의 XTEN 폴리펩타이드에 연결되거나, 하나 이상의 임의의 링커에 의해 FVIII 단백질 내의 하나 이상의 아미노산(예를 들면, 하나 이상의 XTEN 삽입 자리)의 바로 하류에 삽입될 수 있다. 일 실시형태에서, XTEN 서열이 삽입된 2개의 아미노산 잔기 또는 XTEN 서열이 연결된 아미노산 잔기는 표 7, 표 8, 표 9 및 표 10의 잔기 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 서열 번호 4[전장 성숙 FVIII]의 2개 또는 1개의 아미노산 잔기에 상응한다.

[0363] 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 XTEN 서열은 임의의 본 명세서에 개시된 하나 이상의 XTEN 삽입 자리 또는 이들의 임의의 조합에서 삽입된다. 일 양상에서, 적어도 하나의 XTEN 서열은 표 7에 개시된 하나 이상의 아미노산에서 개시된 하나 이상의 XTEN 삽입 자리에서 삽입된다.

표 7

예시적인 XTEN 삽입 자리

번호	XTEN 삽입점*	삽입 잔기	FVIII BDD 하류 서열	FVIII 도메인
1	0	(N-말단)	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	GGS	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
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

[0364]

[0365]

번호	XTEN 삽입점*	삽입 잔기	FVIII BDD 하류 서열	FVIII 도메인
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
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

번호	XTEN 삽입점*	삽입 잔기	FVIII BDD 하류 서열	FVIII 도메인
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	C terminus of FVIII	CT

* 성숙 전장 인간 FVIII 의 아미노산 숫자에 기초한 XTEN 에 대한 삽입점을 나타냄, 여기서 삽입은 표시된 아미노산의 N 또는 C 말단 측 중 어느 하나에 있을 수 있다.

[0366]

[0367] 몇몇 실시형태에서, 하나 이상의 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 32번, 220번, 224번, 336번, 339번, 399번, 416번, 603번, 1656번, 1711번, 1725번, 1905번 또는 1910번 아미노산 또는 이들의 임의의 조합의 상류 또는 하류의 약 6개의 아미노산 내에 삽입된다.

표 8

예시적인 XTEN 삽입 범위

범위	XTEN 삽입점	삽입 잔기	FVIII BDD 서열	FVIII 도메인	삽입 잔기로부터의 거리*
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

[0368]

[0369] * 삽입 잔기로부터의 거리는 삽입이 이루어질 수 있는 지정된 삽입 잔기("0"번 잔기)의 N 말단(음의 수) 또는 C 말단(양의 수)으로부터 먼 아미노산의 상대 숫자를 의미한다. "-x" 지칭은 지정된 삽입 잔기의 N 말단 측에서 먼 x번의 아미노산인 삽입 자리를 의미한다. 유사하게, "+x" 지칭은 지정된 삽입 잔기의 C 말단 측에서 먼 x번의 아미노산인 삽입 자리를 의미한다.

[0370] 예를 들면, "-1, +2"는 -1, 0, +1 또는 +2로 지칭된 아미노산 잔기의 N 말단 또는 C 말단에서 삽입이 이루어진다는 것을 나타낸다.

[0371] 다른 실시형태에서, 하나 이상의 XTEN 서열은 표 9의 하나 이상의 삽입 자리로 이루어진 군으로부터 선택된 전장 성숙 인간 FVIII에 상응하는 하나 이상의 아미노산의 바로 하류에 삽입된다.

표 9

예시적인 XTEN 삽입 자리 또는 범위

번호	XTEN 삽입점 범위*	제 1 삽입 잔기	FVIII 도메인
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

[0372] * 성숙 인간 FVIII 의 아미노산 숫자에 대해 넘버링된 삽입 자리의 범위를 나타냄

[0373] 또 다른 실시형태에서, 하나 이상의 XTEN은 FVIII의 B 도메인에서 삽입된다. 일 예에서, XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 740번 아미노산과 1640번 아미노산 사이에 삽입되고, 740번 아미노산과 1640번 아미노산 사이에 FVIII 서열이 임의로 존재하지 않는다. 또 다른 예에서, XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 741번 아미노산과 1690번 아미노산 사이에 삽입되고, 740번 아미노산과 1690번 아미노산 사이에 FVIII 서열이 임의로 존재하지 않는다. 다른 예에서, XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 741번 아미노산과 1648번 아미노산 사이에 삽입되고, 741번 아미노

산과 1648번 아미노산 사이에 FVIII 서열이 임의로 존재하지 않는다. 또 다른 예에서, XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 743번 아미노산과 1638번 아미노산 사이에 삽입되고, 743번 아미노산과 1638번 아미노산 사이에 FVIII 서열이 임의로 존재하지 않는다. 또 다른 예에서, XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 745번 아미노산과 1656번 아미노산 사이에 삽입되고, 745번 아미노산과 1656번 아미노산 사이에 FVIII 서열이 임의로 존재하지 않는다. 몇몇 예에서, XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 745번 아미노산과 1657번 아미노산 사이에 삽입되고, 745번 아미노산과 1657번 아미노산 사이에 FVIII 서열이 임의로 존재하지 않는다. 소정의 예에서, XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 745번 아미노산과 1667번 아미노산 사이에 삽입되고, 745번 아미노산과 1667번 아미노산 사이에 FVIII 서열이 임의로 존재하지 않는다. 또 다른 예에서, XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 745번 아미노산과 1686번 아미노산 사이에 삽입되고, 745번 아미노산과 1686번 아미노산 사이에 FVIII 서열이 임의로 존재하지 않는다. 몇몇 다른 예에서, XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 747번 아미노산과 1642번 아미노산 사이에 삽입되고, 747번 아미노산과 1642번 아미노산 사이에 FVIII 서열이 임의로 존재하지 않는다. 또 다른 예에서, XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 751번 아미노산과 1667번 아미노산 사이에 삽입되고, 751번 아미노산과 1667번 아미노산 사이에 FVIII 서열이 임의로 존재하지 않는다.

[0374] 몇몇 실시형태에서, 하나 이상의 XTEN은 표 10의 아미노산 잔기로 이루어진 군으로부터 선택된 삽입 자리의 아미노산의 바로 하류의 하나 이상의 아미노산에서 삽입된다.

표 10

FVIII XTEN 삽입 자리 및 작제물 지정

작제물 번호	도메인	상류 잔기 번호*	하류 잔기 번호*	상류 서열	하류 서열
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	GGS
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-말단	0	1		
pSD0022	A1	32	33		
pSD0023	A1	65	66		
pSD0024	A1	81	82		
pSD0025	A1	119	120		
pSD0026	A1	211	212		

[0375]

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		

* 성숙 FVIII 단백질의 아미노산 숫자를 나타냄

[0376]

[0377] 일 실시형태에서, 하나 이상의 XTEN 삽입 자리는 FVIII 단백질의 하나 이상의 표면 노출된, 가요성 루프 구조(예를 들면, 허용성 루프) 내에 위치한다. 예를 들면, 재조합 단백질의 응고촉진 활성 또는 숙주 세포에서 재조합 단백질이 *생체내* 또는 *실험실내* 발현되게 하는 능력을 제거함이 없이, 적어도 하나의 XTEN 폴리펩타이드가 삽입될 수 있는 적어도 2개의 "허용성 루프"를 포함하는 각각의 FVIII "A" 도메인 내에 적어도 하나의 XTEN 서열이 삽입될 수 있다. 허용성 루프는, 다른 속성 중에서, 높은 표면 또는 용매 노출 및 높은 배좌 유연성을 갖는 적어도 하나의 XTEN 서열의 삽입을 허용하는 구역이다. A1 도메인은 허용성 루프-1(A1-1) 구역 및 허용성 루프-2(A1-2) 구역을 포함하고, A2 도메인은 허용성 루프-1(A2-1) 구역 및 허용성 루프-2(A2-2) 구역을 포함하며, A3 도메인은 허용성 루프-1(A3-1) 구역 및 허용성 루프-2(A3-2) 구역을 포함한다.

[0378] 일 양상에서, FVIII A1 도메인 내의 제1 허용성 루프(A1-1)는 1 베타 스트랜드와 2 베타 스트랜드 사이에 위치하고, FVIII A2 도메인 내의 제2 허용성 루프(A1-2)는 11 베타 스트랜드와 12 베타 스트랜드 사이에 위치한다. FVIII A2 도메인 내의 제1 허용성 루프(A2-1)는 22 베타 스트랜드와 23 베타 스트랜드 사이에 위치하고, FVIII A2 도메인 내의 제2 허용성 루프(A2-2)는 32 베타 스트랜드와 베타 스트랜드 33 사이에 위치한다. FVIII A3 도메인 내의 제1 허용성 루프(A3-1)는 38 베타 스트랜드와 39 베타 스트랜드 사이에 위치하고, FVIII A3에서의 제2 허용성 루프(A3-2)는 45 베타 스트랜드와 46 베타 스트랜드 사이에 위치한다. 소정의 양상에서, A1-1을 포함하는 표면 노출된, 가요성 루프 구조는 서열 번호 4의 약 15번 아미노산 내지 약 아미노산 45번, 예를 들면, 서열 번호 4의 약 18번 아미노산 내지 약 41번 아미노산의 네이티브 성숙 인간 FVIII 내의 구역에 상응한다. 다른 양상에서, A1-2를 포함하는 표면 노출된, 가요성 루프 구조는 서열 번호 4의 약 201번 아미노산 내지 약 232번 아미노산, 예를 들면, 서열 번호 4의 약 218번 아미노산 내지 약 229번 아미노산의 네이티브 성숙 인간 FVIII 내의 구역에 상응한다. 또 다른 양상에서, A2-1을 포함하는 표면 노출된, 가요성 루프 구조는 서열 번호 4의 약 395번 아미노산 내지 약 421번 아미노산, 예를 들면 서열 번호 4의 약 397번 아미노산 내지 약 418번 아미노산의 네이티브 성숙 인간 FVIII 내의 구역에 상응한다. 또 다른 실시형태에서, A2-2를 포함하는 표면 노출된, 가요성 루프 구조는 서열 번호 4의 약 577번 아미노산 내지 약 635번 아미노산, 예를 들면, 서열 번호 4의 약 595번 아미노산 내지 약 607번 아미노산의 네이티브 성숙 인간 FVIII 내의 구역에 상응한다. 소정의 양상에서, A3-1을 포함하는 표면 노출된, 가요성 루프 구조는 서열 번호 4의 약 1705번 아미노산 내지 약 1732번 아미노산, 예를 들면, 서열 번호 4의 약 1711번 아미노산 내지 약 1725번 아미노산의 네이티브 성숙 인간 FVIII 내의 구역에 상응한다. 또 다른 양상에서, A3-2를 포함하는 표면 노출된, 가요성 루프 구조는 서열 번호 4의 약 1884번 아미노산 내지 약 1917번 아미노산, 예를 들면, 서열 번호 4의 약 1899번 아미노산 내지 약 1911번 아미노산의 네이티브 성숙 인간 FVIII 내의 구역에 상응한다.

[0379] 또 다른 실시형태에서, 적어도 하나의 XTEN 서열이 삽입된 하나 이상의 아미노산은 a3 도메인, 예를 들면, 전장 성숙 FVIII 폴리펩타이드에 상응하는 1649번 내지 1689번 아미노산 내에 위치한다. 특정한 실시형태에서, XTEN 서열은 서열 번호 4(전장 성숙 FVIII)의 1656번 아미노산과 1657번 아미노산 사이에 삽입된다. 특정한 실시형태에서, 서열 번호 4에 상응하는 1656번 아미노산의 바로 하류에 삽입된 XTEN 서열을 포함하는 FVIII 단백질은 서열 번호 4에 상응하는 745번 아미노산 내지 1656번 아미노산의 결실을 추가로 포함한다.

[0380] 몇몇 실시형태에서, 하나 이상의 XTEN 삽입에 대한 하나 이상의 삽입 자리는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산의 바로 하류에 있다:

[0381] (1) 3번 아미노산, (2) 18번 아미노산, (3) 22번 아미노산,

[0382] (4) 26번 아미노산, (5) 32번 아미노산, (6) 40번 아미노산,

[0383] (7) 60번 아미노산, (8) 65번 아미노산, (9) 81번 아미노산,

[0384] (10) 116번 아미노산, (11) 119번 아미노산, (12) 130번 아미노산,

[0385] (13) 188번 아미노산, (14) 211번 아미노산, (15) 216번 아미노산,

[0386] (16) 220번 아미노산, (17) 224번 아미노산, (18) 230번 아미노산,

[0387] (19) 333번 아미노산, (20) 336번 아미노산, (21) 339번 아미노산,

[0388] (22) 375번 아미노산, (23) 399번 아미노산, (24) 403번 아미노산,

[0389] (25) 409번 아미노산, (26) 416번 아미노산, (26) 442번 아미노산,

[0390] (28) 487번 아미노산, (29) 490번 아미노산, (30) 494번 아미노산,

[0391] (31) 500번 아미노산, (32) 518번 아미노산, (33) 599번 아미노산,

[0392] (34) 603번 아미노산, (35) 713번 아미노산, (36) 745번 아미노산,

[0393] (37) 1656번 아미노산, (38) 1711번 아미노산, (39) 1720번 아미노산,

[0394] (40) 1725번 아미노산, (41) 1749번 아미노산, (42) 1796번 아미노산,

[0395] (43) 1802번 아미노산, (44) 1827번 아미노산, (45) 1861번 아미노산,

[0396] (46) 1896번 아미노산, (47) 1900번 아미노산, (48) 1904번 아미노산,

[0397] (49) 1905번 아미노산, (50) 1910번 아미노산, (51) 1937번 아미노산,

[0398] (52) 2019번 아미노산, (53) 2068번 아미노산, (54) 2111번 아미노산,

[0399] (55) 2120번 아미노산, (56) 2171번 아미노산, (57) 2188번 아미노산,

[0400] (58) 2227번 아미노산, (59) 2277번 아미노산, 및

[0401] (60) 이들의 2개 이상의 조합.

[0402] 일 실시형태에서, 본 발명에 유용한 FVIII 단백질은 2개의 XTEN 서열을 포함하고, 제1 XTEN 서열은 제1 XTEN 삽입 자리에 삽입되고, 제2 XTEN은 제2 XTEN 삽입 자리에 삽입된다. 제1 XTEN 삽입 자리 및 제2 XTEN 삽입 자리의 비제한적인 예는 표 11에 기재되어 있다.

표 11

2 개의 XTEN 에 대한 예시적인 삽입 자리

삽입 1		삽입 2	
삽입 자리	도메인	삽입 자리	도메인
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
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

[0403]

[0404] FVIII 단백질에 삽입되거나 연결된 2개의 XTEN은 동일하거나 상이할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 발명에 유용한 FVIII 단백질은 FVIII 단백질에서 삽입된 2개의 XTEN 서열을 포함하되, 제1 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 745번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 2332번 아미노산의 바로 하류(C 말단)에 삽입된다. 다른 실시형태에서, 제1 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 18번, 26번, 40번, 1656번 또는 1720번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 403번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 또 다른 실시형태에서, 제1 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 18번, 26번 또는 40번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 599번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 또 다른 실시형태에서, 제1 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 1656번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 18번, 26번, 40번, 399번, 403번, 1725번, 1720번, 1900번, 1905번 또는 2332번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 소정의 실시형태에서, 제1 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 1900번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 18번, 26

번 또는 40번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 몇몇 실시형태에서, 제1 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 18번, 26번 또는 40번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 399번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 다른 실시형태에서, 제1 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 1720번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 18번, 26번 또는 40번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 또 다른 실시형태에서, 제1 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 1720번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 18번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 특정한 실시형태에서, FVIII 단백질은 2개의 XTEN 서열을 포함하고, 제1 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 745번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 2332번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, FVIII 단백질은 서열 번호 4에 상응하는 745번 아미노산 내지 서열 번호 4에 상응하는 1685번 아미노산의 결실, 서열 번호 4에 상응하는 1680번 아미노산에서의 돌연변이 또는 치환, 예를 들면, Y1680F, 서열 번호 4에 상응하는 1648번 아미노산에서의 돌연변이 또는 치환, 예를 들면, R1648A 또는 서열 번호 4에 상응하는 1648번 아미노산, 예를 들면, R1648A 및 서열 번호 4에 상응하는 1680번 아미노산, 예를 들면, Y1680F에서의 적어도 2개의 돌연변이 또는 치환을 추가로 갖는다. 특정한 실시형태에서, FVIII 단백질은 2개의 XTEN 서열을 포함하고, 제1 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 1656번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN 서열은 서열 번호 4의 2332번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, FVIII 단백질은 추가로 서열 번호 4에 상응하는 745번 아미노산 내지 1656번 아미노산의 결실을 갖는다.

[0405] 소정의 실시형태에서, FVIII 단백질은 3개의 XTEN 서열을 포함하되, 제1 XTEN 서열은 제1 XTEN 삽입 자리에 삽입되고, 제2 XTEN 서열은 제2 XTEN 서열에 삽입되며, 제3 XTEN 서열은 제3 XTEN 삽입 자리에 삽입된다. 제1, 제2 또는 제3 XTEN 서열은 동일하거나 상이할 수 있다. 제1, 제2 및 제3 삽입 자리는 본 명세서에 개시된 삽입 자리 중 임의의 하나의 군으로부터 선택될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 3개의 XTEN 서열을 포함하는 FVIII 단백질은 예를 들면 서열 번호 4에 상응하는 1648번 아미노산에서의 돌연변이 또는 치환, 예를 들면, R1648A를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들면, 제1, 제2 및 제3 XTEN 삽입 자리의 비제한적인 예는 표 12에 기재되어 있다.

표 12

3 개의 XTEN 에 대한 예시적인 삽입 자리

삽입 1		삽입 2		삽입 3	
삽입 자리	도메인	삽입 자리	도메인	삽입 자리	도메인
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	CT
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

[0406]

[0407] 몇몇 실시형태에서, FVIII 단백질은 3개의 XTEN 서열을 포함하되, 제1 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 26

번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 403번 아미노산의 바로 하류에 삽입되며, 제3 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 1656번, 1720번 또는 1900번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 다른 실시형태에서, 제1 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 26번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 1656번 아미노산의 바로 하류에 삽입되며, 제3 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 1720번 또는 1900번 아미노산의 바로 하류에 삽입된다. 또 다른 실시형태에서, 제1 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 26번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 1720번 아미노산의 하류에 삽입되며, 제3 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 1900번 아미노산의 하류에 삽입된다. 또 다른 실시형태에서, 제1 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 403번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 1656번 아미노산의 하류에 삽입되며, 제3 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 1720번 또는 1900번 아미노산의 하류에 삽입된다. 다른 실시형태에서, 제1 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 403번 또는 1656번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 1720번 아미노산의 하류에 삽입되며, 제3 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 1900번 아미노산의 하류에 삽입된다. 다른 실시형태에서, 제1 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 18번, 26번, 40번, 399번, 403번, 1711번, 1720번, 1725번, 1900번, 1905번 또는 1910번 아미노산의 바로 하류에 삽입되고, 제2 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 745번 아미노산의 하류에 삽입되며, 제3 XTEN 서열은 서열 번호 4에 상응하는 2332번 아미노산의 하류에 삽입된다.

[0408] 다른 실시형태에서, 본 발명에서의 FVIII 단백질은 4개의 XTEN 서열을 포함하되, 제1 XTEN 서열은 제1 삽입 자리에 삽입되고, 제2 XTEN 서열은 제2 삽입 자리에 삽입되며, 제3 XTEN 서열은 제3 삽입 자리에 삽입되고, 제4 XTEN 서열은 제4 삽입 자리에 삽입된다. 제1, 제2, 제3 및 제4 XTEN 서열은 동일, 상이 또는 이들의 조합일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 4개의 XTEN 서열을 포함하는 FVIII 단백질은 돌연변이 또는 치환, 예를 들면, 서열 번호 4에 상응하는 1648번 아미노산, 예를 들면, R1648A를 추가로 포함할 수 있다. 제1, 제2, 제3 및 제4 XTEN 삽입 자리의 비제한적인 예는 표 13에 기재되어 있다.

표 13

4 개의 XTEN 에 대한 예시적인 삽입 자리

삽입 1		삽입 2		삽입 3		삽입 4	
삽입 자리	도메인	삽입 자리	도메인	삽입 자리	도메인	삽입 자리	도메인
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

[0409]

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

[0410]

[0411] 몇몇 실시형태에서, FVIII 단백질은 5개의 XTEN 서열을 포함하되, 제1 XTEN 서열은 제1 삽입 자리에 삽입되고, 제2 XTEN 서열은 제2 삽입 자리에 삽입되며, 제3 XTEN 서열은 제3 XTEN 삽입 자리에 삽입되고, 제4 XTEN 서열은 제4 XTEN 삽입 자리에 삽입되며, 제5 XTEN 서열은 제5 XTEN 삽입 자리에 삽입된다. 제1, 제2, 제3, 제4, 또는 제5 XTEN 서열은 동일, 상이 또는 이들의 조합일 수 있다. 제1, 제2, 제3, 제4 및 제5 삽입 자리의 비제한적인 예는 표 14에 기재되어 있다.

표 14

5 개의 XTEN 에 대한 예시적인 삽입 자리

XTEN 삽입 1	XTEN 삽입 2	XTEN 삽입 3	XTEN 삽입 4	XTEN 삽입 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

[0412]

[0413] 소정의 실시형태에서, FVIII 단백질은 제1 XTEN 삽입 자리에 삽입된 제1 XTEN 서열, 제2 XTEN 삽입 자리에 삽입된 제2 XTEN 서열, 제3 XTEN 삽입 자리에 삽입된 제3 XTEN 서열, 제4 XTEN 삽입 자리에 삽입된 제4 XTEN 서열, 제5 XTEN 삽입 자리에 삽입된 제5 XTEN 서열 및 제6 XTEN 삽입 자리에 삽입된 제6 XTEN 서열의 6개의 XTEN 서열

을 포함한다. 제1, 제2, 제3, 제4, 제5 또는 제6 XTEN 서열은 동일, 상이 또는 이들의 조합일 수 있다. 6개의 XTEN 삽입 자리의 예는 표 15에 기재된 삽입 자리를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

표 15

6 개의 XTEN 에 대한 예시적인 XTEN 삽입 자리

XTEN 삽입 1	XTEN 삽입 2	XTEN 삽입 3	XTEN 삽입 4	XTEN 삽입 5	XTEN 삽입 6
0018	0403	1656	1720	1900	2332
0018	0403	0745	1720	1900	2332

[0414]

[0415] 특정한 예에서, 제1 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 26번 아미노산과 27번 아미노산 사이에 삽입되고, 제2 XTEN은 서열 번호 4(전장 성숙 FVIII)에 상응하는 1720번 아미노산과 1721번 아미노산 사이에 삽입된다. 또 다른 예에서, 제1 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 403번 아미노산과 404번 아미노산 사이에 삽입되고, 제2 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1720번 아미노산과 1721번 아미노산 사이에 삽입된다. 몇몇 예에서, 제1 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1656번 아미노산과 1657번 아미노산 사이에 삽입되고, 제2 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1720번 아미노산과 1721번 아미노산 사이에 삽입된다. 다른 예에서, 제1 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 26번 아미노산과 27번 아미노산 사이에 삽입되고, 제2 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1656번 아미노산과 1657번 아미노산 사이에 삽입되며, 제3 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1720번 아미노산과 1721번 아미노산 사이에 삽입된다. 또 다른 실시형태에서, 제1 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 403번 아미노산과 404번 아미노산 사이에 삽입되고, 제2 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1656번 아미노산과 1657번 아미노산 사이에 삽입되며, 제3 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1720번 아미노산과 1721번 아미노산 사이에 삽입된다. 또 다른 실시형태에서, 제1 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 403번 아미노산과 404번 아미노산 사이에 삽입되고, 제2 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1656번 아미노산과 1657번 아미노산 사이에 삽입되며, 제3 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1720번 아미노산과 1721번 아미노산 사이에 삽입된다. 소정의 실시형태에서, 제1 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 26번 아미노산과 27번 아미노산 사이에 삽입되고, 제2 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1720번 아미노산과 1721번 아미노산 사이에 삽입되며, 제3 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1900번 아미노산과 1901번 아미노산 사이에 삽입된다. 몇몇 실시형태에서, 제1 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 26번 아미노산과 27번 아미노산 사이에 삽입되고, 제2 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1656번 아미노산과 1657번 아미노산 사이에 삽입되며, 제3 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1720번 아미노산과 1721번 아미노산 사이에 삽입되고, 제4 XTEN은 서열 번호 4에 상응하는 1900번 아미노산과 1901번 아미노산 사이에 삽입된다.

[0416] 특정한 실시형태에서, XTEN 서열은 전장 VIII 인자의 745번 아미노산과 746번 아미노산 사이에 또는 B 도메인 결실 VIII 인자의 상응하는 삽입 자리 사이에 삽입된다.

[0417] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 2개의 폴리펩타이드 서열을 포함하되, 제1 폴리펩타이드 서열은 FVIII-161(서열 번호 101), FVIII-169(서열 번호 103), FVIII-170(서열 번호 102), FVIII-173(서열 번호 104); FVIII-195(서열 번호 105); FVIII-196(서열 번호 106), FVIII-199(서열 번호 107), FVIII-201(서열 번호 108); FVIII-203(서열 번호 109), FVIII-204(서열 번호 110), FVIII-205(서열 번호 111), FVIII-266(서열 번호 112), FVIII-267(서열 번호 113), FVIII-268(서열 번호 114), FVIII-269(서열 번호 115), FVIII-271(서열 번호 116) 또는 FVIII-272(서열 번호 117)로부터 선택된 서열과 적어도 약 80%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩타이드 서열은 VWF031(서열 번호 118), VWF034(서열 번호 119) 또는 VWF-036(서열 번호 120)으로부터 선택된 서열과 적어도 약 80%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0418] **D) Ig 불변 구역 또는 이의 일부**

[0419] 본 발명에서의 XTEN 서열에 연결된 VWF 단편 또는 FVIII 단백질은 Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 추가로 포함할 수 있다. Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 XTEN 서열과 조합된 VWF 단편 또는 FVIII 단백질의 약동학적 또는 약물학적 특성을 개선할 수 있다. 소정의 실시형태에서, Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 융합된 분자의 반감기를 연장시킨다.

[0420] Ig 불변 구역은 CH(불변 중쇄) 도메인(CH1, CH2 등)이라 칭하는 도메인으로 이루어진다. 아이소타입(즉, IgG,

IgM, IgA, IgD 또는 IgE)에 따라, 불변 구역은 3개 또는 4개의 CH 도메인으로 이루어질 수 있다. 몇몇 아이소타입(예를 들면, IgG) 불변 구역은 또한 힌지 구역을 포함한다. 문헌[Janeway *et al*. 2001, *Immunobiology*, Garland Publishing, N.Y., N.Y.]을 참조한다.

[0421] 본 발명의 키메라 단백질을 생성하기 위한 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 다수의 상이한 공급원으로부터 얻어질 수 있다. 몇몇 실시형태에서, Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 인간 Ig로부터 유래한다. 그러나, Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 예를 들면, 설치류(예를 들면, 마우스, 래트, 토끼, 기니픽) 또는 비인간 영장류(예를 들면, 챔팬치, 마카크) 종을 포함하는 또 다른 포유동물 종의 Ig로부터 유래할 수 있는 것으로 이해된다. 더구나, Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE, 및 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하는 임의의 Ig 아이소타입을 포함하는 임의의 Ig 종류로부터 유래할 수 있다. 일 실시형태에서, 인간 아이소타입 IgG1을 사용한다.

[0422] 다양한 Ig 불변 구역 유전자 서열(예를 들면, 인간 불변 구역 유전자 서열)은 공공에게 접근 가능한 수탁 형태로 이용 가능하다. 특정한 이팩터 기능을 갖거나(또는 특정한 이팩터 기능 결여), 면역원성을 감소시키는 특정한 변형을 갖는 불변 구역 도메인 서열이 선택될 수 있다. 항체 및 항체 코딩 유전자의 많은 서열이 공개되었고, 적합한 Ig 불변 구역 서열(예를 들면, 힌지, CH2 및/또는 CH3 서열 또는 이의 일부)은 기술 인정 기법을 이용하여 이 서열로부터 유래할 수 있다. 이후, 임의의 상기 방법을 이용하여 얻은 유전자 물질은 본 발명의 폴리펩타이드를 얻도록 변경되거나 합성될 수 있다. 본 발명의 범위는 불변 구역 DNA 서열의 대립유전자, 변이체 및 돌연변이를 포괄하는 것으로 추가로 이해된다.

[0423] Ig 불변 구역 또는 이의 일부의 서열은 예를 들면 관심 있는 도메인을 증폭하도록 선택된 프라이머 및 중합효소 사슬 반응을 이용하여 클로닝될 수 있다. 항체로부터 Ig 불변 구역 또는 이의 일부의 서열을 클로닝하기 위해, mRNA는 하이브리도마, 비장 또는 림프 세포로부터 단리되고, DNA로 역전사되고, 항체 유전자는 PCR에 의해 증폭될 수 있다. PCR 증폭 방법은 미국 특허 제4,683,195호; 제4,683,202호; 제4,800,159호; 제4,965,188호; 및 예를 들면, 문헌["PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" Innis et al. eds., Academic Press, San Diego, CA (1990); Ho et al. 1989. Gene 77:51; Horton et al. 1993. Methods Enzymol. 217:270]에 자세히 기재되어 있다. PCR은 공통 불변 구역 프라이머에 의해, 또는 공개된 중쇄 및 경쇄 DNA 및 아미노산 서열에 기초한 더 특이적인 프라이머에 의해 개시될 수 있다. 상기 기재된 바대로, PCR은 또한 항체 경쇄 및 중쇄를 코딩하는 DNA 클론을 단리하도록 이용될 수 있다. 이 경우, 라이브러리는 공통 프라이머 또는 더 큰 상동성 프로브, 예컨대 마우스 불변 구역 프로브에 의해 스크리닝될 수 있다. 항체 유전자의 증폭에 적합한 다수의 프라이머 세트는 당해 분야에 공지되어 있다(예를 들면, 정제된 항체의 N 말단 서열에 기초한 5' 프라이머)(Benhar and Pastan. 1994. Protein Engineering 7:1509); cDNA 말단의 신속한 증폭(Ruberti, F. et al. 1994. J. Immunol. Methods 173:33); 항체 선도 서열(Larrick et al. 1989 Biochem. Biophys. Res. Commun. 160:1250). 항체 서열의 클로닝은 1995년 1월 25일 출원된 미국 특허 제5,658,570호(뉴만(Newman) 외)(본 명세서에 참조문헌으로 포함됨)에 추가로 기재되어 있다.

[0424] 본 명세서에 사용된 Ig 불변 구역은 모든 도메인 및 힌지 구역 또는 이의 일부를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 CH2 도메인, CH3 도메인 및 힌지 구역, 즉, Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너를 포함한다.

[0425] 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "Fc 구역"은 네이티브 Ig의 Fc 구역에 상응하는 폴리펩타이드의 일부, 즉 이의 2개의 중쇄의 각각의 Fc 도메인의 이합체 회합에 의해 형성된 것으로서 정의된다. 네이티브 Fc 구역은 또 다른 Fc 구역과 동종이합체를 형성한다. 반대로, 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "유전적으로 융합된 Fc 구역" 또는 "단일 사슬 Fc 구역"(scFc 구역)은 단일 폴리펩타이드 사슬 내에 유전적으로 연결된(즉, 단일 인접 유전자 서열에 코딩된) Fc 도메인으로 이루어진 합성 이합체 Fc 구역을 의미한다.

[0426] 일 실시형태에서, "Fc 구역"은 파파인 개열 자리(즉, 중쇄 불변 구역의 제1 잔기를 114번으로 취하여 IgG에서의 216번 잔기)의 바로 상류의 힌지 구역에서 시작하고 항체의 C 말단에서 끝나는 단일 Ig 중쇄의 일부를 의미한다. 따라서, 완전한 Fc 도메인은 적어도 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함한다.

[0427] Ig 불변 구역의 Fc 구역은 Ig 아이소타입에 따라 CH2, CH3 및 CH4 도메인, 및 힌지 구역을 포함할 수 있다. Ig의 Fc 구역을 포함하는 키메라 단백질은 증가된 안정성, 증가된 혈청 반감기(문헌[Capon *et al.*, 1989, *Nature* 337:525] 참조), 및 Fc 수용체, 예컨대 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 결합(미국 특허 제6,086,875호, 제6,485,726호, 제6,030,613호; WO 제03/077834호; US 제2003-0235536호 A1)(본 명세서에 그 전문이 참조문헌으로 포함됨)을 포함하는 몇몇 바람직한 특성을 키메라 단백질에 부여한다.

[0428] Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 FcRn 결합 파트너일 수 있다. FcRn은 성인 상피 조직에서 활성이고, 창자의 관강, 폐 기도, 코 표면, 질 표면, 대장 및 직장 표면(미국 특허 제6,485,726호)에서 발현된다. FcRn 결합 파트너는 FcRn에 결합하는 Ig의 일부이다.

[0429] FcRn 수용체는 인간을 포함하는 몇몇 포유동물 종으로부터 단리되었다. 인간 FcRn, 원숭이 FcRn, 래트 FcRn 및 마우스 FcRn의 서열은 공지되어 있다(Story et al. 1994, J. Exp. Med. 180:2377). FcRn 수용체는 비교적 낮은 pH에서 IgG에 결합하고(그러나 다른 Ig 종류, 예컨대 IgA, IgM, IgD 및 IgE에 결합하지 않음), IgG를 세포횡단으로 관강에서 장막 방향으로 능동적으로 수송하고, 이후 간질액에서 발견되는 비교적 더 높은 pH에서 IgG를 방출한다. 이는 폐 및 창자 상피(Israel et al. 1997, Immunology 92:69) 신세뇨관 상피(Kobayashi et al. 2002, Am. J. Physiol. Renal Physiol. 282:F358), 및 코 상피, 질 표면 및 담도(biliary tree) 표면을 포함하는 성인 상피 조직(미국 특허 제6,485,726호, 제6,030,613호, 제6,086,875호; WO 제03/077834호; US 제2003-0235536호 A1)에서 발현된다.

[0430] 본 발명에 유용한 FcRn 결합 파트너는 전체 IgG, IgG의 Fc 단편, 및 FcRn 수용체의 완전한 결합 구역을 포함하는 다른 단편을 포함하는 FcRn 수용체에 의해 특이적으로 결합될 수 있는 분자를 포함한다. FcRn 수용체에 결합하는 IgG의 Fc 부분의 구역은 X선 결정학에 기초하여 기재되어 있다(Burmeister et al. 1994, Nature 372:379). Fc와 FcRn의 주요 접촉 부위는 CH2 및 CH3 도메인의 연접부에 인접한다. Fc-FcRn 접촉은 모두 단일 Ig 중쇄 내에 있다. FcRn 결합 파트너는 전체 IgG, IgG의 Fc 단편, 및 FcRn의 완전한 결합 구역을 포함하는 IgG의 다른 단편을 포함한다. 주요 접촉 자리는 CH2 도메인의 248번, 250-257번, 272번, 285번, 288번, 290-291번, 308-311번 및 314번 아미노산 잔기 및 CH3 도메인의 385-387번, 428번 및 433-436번 아미노산 잔기를 포함한다. Ig 또는 Ig 단편, 또는 구역의 아미노산 넘버링에 대한 언급은 모두 문헌[Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 미국 보건부(U.S. Department of Public Health)(메릴랜드주 베데스다)]에 기초한다.

[0431] FcRn에 결합된, Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너는 FcRn에 의해 상피 장벽을 통해 효과적으로 셔틀링되어, 원하는 치료학적 분자를 전신으로 투여하는 비침습 수단을 제공할 수 있다. 추가로, Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너를 포함하는 융합 단백질은 FcRn을 발현하는 세포에 의해 내포작용된다. 그러나 분해가 현저해지기 전에, 이 융합 단백질은 순환으로 다시 재순환되어, 이 단백질의 *생체내* 반감기를 증가시킨다. 소정의 실시형태에서, Ig 불변 구역의 일부는 이황화 결합 및 다른 비특이적 상호작용을 통해, 또 다른 Fc 구역 또는 또 다른 FcRn 결합 파트너와 통상적으로 회합되어 이합체 및 더 고차의 다합체를 형성하는 Fc 구역 또는 an FcRn 결합 파트너이다.

[0432] 2개의 FcRn 수용체는 단일 Fc 분자에 결합할 수 있다. 결정학적 데이터는 각각의 FcRn 분자가 Fc 동종이합체의 단일 폴리펩타이드에 결합한다는 것을 보여준다. 일 실시형태에서, 생물학적 활성 분자에 대한 FcRn 결합 파트너, 예를 들면, IgG의 Fc 단편의 연결은 생물학적 활성 분자를 경구로, 협측으로, 설하로, 직장으로, 질내로, 비강으로 또는 폐 경로를 통해 투여되는 에어로졸로서, 또는 눈 경로를 통해 전달하는 수단을 제공한다. 또 다른 실시형태에서, 키메라 단백질은 침습적으로, 예를 들면, 피하로, 정맥내로 투여될 수 있다.

[0433] FcRn 결합 파트너 구역은 Fc 구역의 FcRn 수용체에 의한 결과로 생긴 능동 수송으로 FcRn 수용체에 의해 특이적으로 결합될 수 있는 분자 또는 이의 일부이다. 특이적으로 결합한은 생리학적 조건 하에 비교적 안정한 복합체를 형성하는 2개의 분자를 의미한다. 특이적 결합은, 일반적으로 낮은 친화도와 보통의 내지 높은 역량을 갖는 비특이적 결합으로부터 구별되는, 높은 친화도 및 낮은 내지 보통의 역량을 특징으로 한다. 통상적으로, 결합은 친화도 상수(KA)가 $10^{6}M^{-1}$ 초과 또는 $10^{8}M^{-1}$ 초과일 때 특이적인 것으로 생각된다. 필요한 경우, 비특이적 결합은 결합 조건을 변경함으로써 특이적 결합에 실질적으로 영향을 미치는 일 없이 감소할 수 있다. 적절한 결합 조건, 예컨대 분자 농도, 용액의 이온 농도, 온도, 결합에 대한 허용 시간, 차단제(예를 들면, 혈청 알부민, 밀크 카세인)의 농도 등은 일상적 기법을 이용하여 당업자에 의해 최적화될 수 있다.

[0434] 소정의 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 하나 이상의 절두된 Fc 구역을 포함하고, 이 구역은 그럼에도 불구하고 Fc 수용체(FcR) 결합 특성을 Fc 구역에 부여하기에 충분하다. 예를 들면, FcRn에 결합하는 Fc 구역의 부분(즉, FcRn 결합 부분)은 EU 넘버링(1차 접촉 자리는 CH2 도메인의 248번, 250-257번, 272번, 285번, 288번, 290-291번, 308-311번 및 314번 아미노산 및 CH3 도메인의 385-387번, 428번 및 433-436번 아미노산 잔기임)에 따라 IgG1의 약 282-438번 아미노산을 포함한다. 따라서, 본 발명의 Fc 구역은 FcRn 결합 부분을 포함하거나, 이것으로 이루어질 수 있다. FcRn 결합 부분은 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하는 임의의 아이소타입의 중쇄로부터 유래할 수 있다. 일 실시형태에서, 인간 아이소타입 IgG1의 항체로부터의 FcRn 결합 부분을 사용한다. 또 다른 실시형태에서, 인간 아이소타입 IgG4의 항체로부터의 FcRn 결합 부분을 사용한다.

[0435] 또 다른 실시형태에서, "Fc 구역"은 Fc 도메인의 아미노산 서열 또는 Fc 도메인으로부터 유래한 아미노산 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, Fc 구역은 힌지(예를 들면, 상부, 중간 및/또는 하부 힌지 구역) 도메인(EU 넘버링에 따른 항체 Fc 구역의 약 216-230번 아미노산), CH2 도메인(EU 넘버링에 따른 항체 Fc 구역의 약 231-340번 아미노산), CH3 도메인(EU 넘버링에 따른 항체 Fc 구역의 약 341-438번 아미노산), CH4 도메인, 또는 이들의 변이체, 일부 또는 단편 중 적어도 하나를 포함한다. 다른 실시형태에서, Fc 구역은 완전한 Fc 도메인(즉, 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인)을 포함한다. 몇몇 실시형태에서, Fc 구역은 CH3 도메인(또는 이의 일부)에 융합된 힌지 도메인(또는 이의 일부), CH2 도메인(또는 이의 일부)에 융합된 힌지 도메인(또는 이의 일부), CH3 도메인(또는 이의 일부)에 융합된 CH2 도메인(또는 이의 일부), 힌지 도메인(또는 이의 일부) 및 CH3 도메인(또는 이의 일부) 둘 다에 융합된 CH2 도메인(또는 이의 일부)을 포함하거나, 이들로 실질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어진다. 또 다른 실시형태에서, Fc 구역은 CH2 도메인의 적어도 일부(예를 들면, CH2 도메인의 전부 또는 일부)가 결여된다. 특정한 실시형태에서, Fc 구역은 EU 221번 내지 447번에 상응하는 아미노산을 포함하거나, 이것으로 이루어진다.

[0436] 본 명세서에서 F, F1 또는 F2로 표시된 Fc 구역은 다수의 상이한 공급원으로부터 얻어질 수 있다. 일 실시형태에서, 폴리펩타이드의 Fc 구역은 인간 Ig로부터 유래한다. 그러나, Fc 구역은 예를 들면 설치류(예를 들면, 마우스, 래트, 토끼 또는 기니픽) 또는 비인간 영장류(예를 들면, 침팬지, 마카크) 종을 포함하는 또 다른 포유동물 종의 Ig로부터 유래할 수 있는 것으로 이해된다. 더구나, Fc 도메인 또는 이의 일부의 폴리펩타이드는 IgM, IgG, IgD, IgA 및 IgE, 및 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함하는 임의의 Ig 아이소타입을 포함하는 임의의 Ig 종류로부터 유래할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 인간 아이소타입 IgG1을 사용한다.

[0437] 소정의 실시형태에서, Fc 변이체는 상기 야생형 Fc 도메인을 포함하는 Fc 구역에 의해 부여된 적어도 하나의 이팩터 기능의 변화(예를 들면, Fc 수용체(예를 들면, FcγRI, FcγRII 또는 FcγRIII) 또는 보체 단백질(예를 들면, C1q)에 결합하거나 항체 의존적 세포독성(ADCC), 식세포작용 또는 보체 의존적 세포독성(CDCC)을 촉발하는 Fc 구역의 능력의 개선 또는 감소)를 부여한다. 다른 실시형태에서, Fc 변이체는 조작된 시스테인 잔기를 제공한다.

[0438] 본 발명의 Fc 구역은 이팩터 기능 및/또는 FcR 또는 FcRn 결합의 변화(예를 들면, 증대 또는 감소)를 부여하는 것으로 공지된 기술 인정 Fc 변이체를 사용할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 결합 분자는 예를 들면 국제 PCT 공보 WO 제88/07089호 A1, WO 제96/14339호 A1, WO 제98/05787호 A1, WO 제98/23289호 A1, WO 제99/51642호 A1, WO 제99/58572호 A1, WO 제00/09560호 A2, WO 제00/32767호 A1, WO 제00/42072호 A2, WO 제02/44215호 A2, WO 제02/060919호 A2, WO 제03/074569호 A2, WO 제04/016750호 A2, WO 제04/029207호 A2, WO 제04/035752호 A2, WO 제04/063351호 A2, WO 제04/074455호 A2, WO 제04/099249호 A2, WO 제05/040217호 A2, WO 제04/044859, WO 제05/070963호 A1, WO 제05/077981호 A2, WO 제05/092925호 A2, WO 제05/123780호 A2, WO 제06/019447호 A1, WO 제06/047350A2 및 WO 제06/085967A2; 미국 특허 공보 US 제2007/0231329호, US 제2007/0231329호, US 제2007/0237765호, US 제2007/0237766호, US 제2007/0237767호, US 제2007/0243188호, US 제20070248603호, US 제20070286859호, US 제20080057056호; 또는 미국 특허 제5,648,260호; 제5,739,277호; 제5,834,250호; 제5,869,046호; 제6,096,871호; 제6,121,022호; 제6,194,551; 제6,242,195호; 제6,277,375호; 제6,528,624호; 제6,538,124호; 제6,737,056호; 제6,821,505호; 제6,998,253호; 제7,083,784호; 제7,404,956호 및 제7,317,091호(이들 각각은 본 명세서에 참조문헌으로 포함됨)에 개시된 하나 이상의 아미노산 위치에서의 변화(예를 들면, 치환)를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 하나 이상의 개시된 아미노산 위치에서 특이적 변화(예를 들면, 당해 분야에 개시된 하나 이상의 아미노산의 특이적 치환)가 이루어질 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 하나 이상의 개시된 아미노산 위치에서의 상이한 변화(예를 들면, 당해 분야에 개시된 하나 이상의 아미노산 위치의 상이한 치환)가 이루어질 수 있다.

[0439] IgG의 Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너는 널리 인식된 절차, 예컨대 자리 지정 돌연변이유발 등에 따라 변형되어 FcRn에 의해 결합되는 변형된 IgG 또는 Fc 단편 또는 이의 일부를 생성할 수 있다. 이러한 변형은 FcRn 접촉 자리로부터 먼 변형, 및 FcRn에 대한 결합을 보전하거나 심지어 증대시키는 접촉 자리 내의 변형을 포함한다. 예를 들면, 인간 IgG1 Fc(Fcγ1)에서의 하기 단일 아미노산 잔기가 FcRn에 대한 Fc 결합 친화도의 상당한 손실 없이 치환될 수 있다: 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 및 K447A(여기서, 예를 들면 P238A는 238번 위치에서 알라닌에 의해 치환된 야생형 프롤린을 나타냄). 예로서, 구체적인 실시형태는 N297A 돌연변이를 포함하여, 고도로 보존된 N-글라이코실화 자리를 제거한다. 알라닌 이외에, 다른 아미노산이 상기 기재된 위치에서 야생형 아미노산에 대해 치환될 수 있다. 돌연변이는 Fc로 단독으로 도입되어 네이티브 Fc로부터 구별되는 100개 초과의 Fc 구역을 생성시킬 수 있다. 추가로, 2개, 3개 또는 이것 이상의 이 개별 돌연변이의 조합이 함께 도입되어 수백 개의 Fc 구역을 생성시킬 수 있다. 더구나, 본 발명의 작제물의 Fc 구역 중 하나는 돌연변이될 수 있고, 작제물의 다른 Fc 구역은 모두 돌연변이되지 않을 수 있거나, 이들은 둘 다 상이한 돌연변이에 의해 돌연변이될 수 있다.

[0440] 소정의 상기 돌연변이는 Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너에 새로운 기능을 부여할 수 있다. 예를 들면, 일 실시형태는 N297A를 포함하여, 고도로 보존된 N-글라이코실화 자리를 제거한다. 이 돌연변이의 효과는 면역원성을 감소시켜, Fc 구역의 순환 반감기를 증대시키고, FcRn에 대한 친화도를 손상시키지 않고 Fc 구역이 FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB 및 FcγRIIIA에 결합할 수 없게 하는 것이다(Routledge et al. 1995, Transplantation 60:847; Friend et al. 1999, Transplantation 68:1632; Shields et al. 1995, J. Biol. Chem. 276:6591). 돌연변이로부터 생기는 새로운 기능의 추가의 예로서, FcRn에 대한 상기 기재된 친화도는 몇몇 경우에 야생형의 친화도를 초과하여 증가할 수 있다. 이 증가된 친화도는 증가된 "결합" 속도, 감소된 "분해" 속도 또는 증가된 "결합" 속도 및 감소된 "분해" 속도 둘 다를 반영할 수 있다. FcRn에 대한 증가된 친화도를 부여하는 것으로 생각되는 돌연변이의 예는 T256A, T307A, E380A 및 N434A를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다(Shields et al. 2001, J. Biol. Chem. 276:6591).

[0441] 추가로, 적어도 3개의 인간 Fc 감마 수용체는 하부 힌지 구역 내의 IgG 상의 결합 자리, 일반적으로 234-237번 아미노산을 인식하는 것으로 보인다. 따라서, 새로운 기능 및 잠재적 감소된 면역원성의 또 다른 예는, 예를 들면 (하나의 아미노산 결실을 갖는) IgG2 "PVA"로부터의 상응하는 서열에 인간 IgG1 "ELLG"의 233-236번 아미노산을 대체함으로써, 이 구역의 돌연변이로부터 생길 수 있다. 이러한 돌연변이가 도입될 때 다양한 이펙터 기능을 매개하는 FcγRI, FcγRII 및 FcγRIII이 IgG1에 결합하지 않는 것으로 나타났다. 문헌[Ward and Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77 및 Armour et al. 1999, Eur. J. Immunol. 29:2613].

[0442] 일 실시형태에서, Ig 불변 구역 또는 이의 일부, 예를 들면 Fc 구역은 서열 PKNSSMISNTP(서열 번호 52)를 포함하고, 임의로 HQSLGTQ(서열 번호 53), HQNLSDGK(서열 번호 54), HQNISDGK(서열 번호 55) 또는 VISSHLGQ(서열 번호 56)(미국 특허 제5,739,277호)로부터 선택되는 서열을 추가로 포함하는 폴리펩타이드이다.

[0443] 또 다른 실시형태에서, 면역글로불린 불변 구역 또는 이의 일부는 또 다른 면역글로불린 불변 구역 또는 이의 일부와 하나 이상의 이황화 결합을 형성하는 힌지 구역 또는 이의 일부에서 아미노산 서열을 포함한다. 면역글로불린 불변 구역 또는 이의 일부에 의한 이황화 결합은 FVIII을 포함하는 제1 폴리펩타이드 및 VWF 단편을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 함께 위치시켜, 내인성 VWF는 VWF 단편을 대체하지 않고 FVIII에 결합하지 않는다. 따라서, 제1 면역글로불린 불변 구역 또는 이의 일부와 제2 면역글로불린 불변 구역 또는 이의 일부 사이의 이황화 결합은 내인성 VWF와 FVIII 단백질 사이의 상호작용을 방지한다. VWF와 FVIII 단백질 사이의 상호작용의 이 억제는 FVIII 단백질의 반감기가 2배 제한을 넘게 한다. 힌지 구역 또는 이의 일부는 CH1, CH2, CH3의 하나 이상의 도메인, 이들의 단편 및 이들의 임의의 조합에 추가로 연결될 수 있다. 특정한 실시형태에서, 면역글로불린 불변 구역 또는 이의 일부는 힌지 구역 및 CH2이다.

[0444] 소정의 실시형태에서, Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 반글라이코실화된다. 예를 들면, 2개의 Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너를 포함하는 키메라 단백질은 제1의 글라이코실화 Fc 구역(예를 들면, 글라이코실화 CH2 구역) 또는 FcRn 결합 파트너 및 제2의 글라이코실화 Fc 구역(예를 들면, 글라이코실화 CH2 구역) 또는 FcRn 결합 파트너를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 링커는 글라이코실화와 비글라이코실화 Fc 구역 사이에 끼어들 수 있다. 또 다른 실시형태에서, Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너는 완전 글라이코실화되고, 즉 Fc 구역 모두가 글라이코실화된다. 다른 실시형태에서, Fc 구역은 비글라이코실화될 수 있고, 즉 Fc 모이어티는 모두 글라이코실화되지 않는다.

[0445] 소정의 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(예를 들면, Fc 변이체)에 대한 아미노산 치환을 포함하고, 이는 Ig 불변 구역의 항원 독립적 이펙터 기능, 특히 단백질의 순환 반감기를 변경한다.

[0446] 이러한 단백질은 이 치환이 결여된 단백질과 비교할 때 FcRn에 대한 증가된 또는 감소된 결합을 나타내고, 따라

서 각각 혈청에서 증가된 또는 감소된 반감기를 갖는다. FcRn에 대한 개선된 친화도를 갖는 Fc 변이체는 더 긴 혈청 반감기를 갖는 것으로 예상되고, 이러한 분자는 예를 들면 만성 질환 또는 장애를 치료하기 위해 투여된 폴리펩타이드의 긴 반감기를 원하는 경우 포유동물을 치료하는 방법에서 유용한 용도를 갖는다(예를 들면, 미국 특허 제7,348,004호, 제7,404,956호 및 제7,862,820호 참조). 반대로, 감소된 FcRn 결합 친화도를 갖는 Fc 변이체는 더 짧은 반감기를 갖는 것으로 예상되고, 이러한 분자는 예를 들면 생체내 진단학적 영상화를 위해 짧아진 순환 시간이 유리할 수 있을 때 또는 출발 폴리펩타이드가 연장된 기간 동안 순환에 존재할 때 독성 부작용을 갖는 상황에서 예를 들면 포유동물에 대한 투여에 또한 유용하다. 감소된 FcRn 결합 친화도를 갖는 Fc 변이체는 또한 태반을 횡단하지 않을 것이고, 따라서 임신 여성에서의 질환 또는 장애의 치료에 유용하다. 또한, 감소된 FcRn 결합 친화도를 원할 수 있는 다른 분야는 뇌, 신장 및/또는 간에서의 편재화를 원하는 분야를 포함한다. 예시적인 일 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 맥관구조로부터 신장 사구체의 상피를 통한 수송 감소를 나타낸다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 뇌로부터 혈관 공간으로의 혈액 뇌 장벽(BBB)을 통한 수송 감소를 나타낸다. 일 실시형태에서, 변경된 FcRn 결합을 갖는 단백질은 Ig 불변 구역의 "FcRn 결합 루프" 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 적어도 하나의 Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너(예를 들면, 1개 또는 2개의 Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너)를 포함한다. FcRn 결합 루프는 야생형, 전장, Fc 구역의 (EU 넘버링에 따라) 280-299번 아미노산 잔기로 이루어진다. 다른 실시형태에서, 변경된 FcRn 결합 친화도를 갖는 본 발명의 키메라 단백질에서의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 15Å FcRn "접촉 구역" 내에 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 적어도 하나의 Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너를 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 15Å FcRn "접촉 구역"은 야생형, 전장 Fc 모이어티의 하기 위치에서의 잔기를 포함한다: 243-261번, 275-280번, 282-293번, 302-319번, 336-348번, 367번, 369번, 372-389번, 391번, 393번, 408번, 424번, 425-440번 (EU 넘버링). 다른 실시형태에서, 변경된 FcRn 결합 친화도를 갖는 본 발명의 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 하기 EU 위치 중 임의의 하나에 상응하는 아미노산 위치에서 하나 이상의 아미노산 치환을 갖는 적어도 하나의 Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너를 포함한다: 256번, 277-281번, 283-288번, 303-309번, 313번, 338번, 342번, 376번, 381번, 384번, 385번, 387번, 434번(예를 들면, N434A 또는 N434K) 및 438번. 변경된 FcRn 결합 활성을 갖는 예시적인 아미노산 치환이 국제 PCT 공보 WO 제05/047327호(본 명세서에 참조문헌으로 포함됨)에 개시되어 있다.

[0447] 본 발명에 사용되는 Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너는 또한 키메라 단백질의 글라이코실화를 변경하는 기술 인정 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 예를 들면, VWF 단편 또는 FVIII 단백질에 연결된 키메라 단백질의 Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너는 감소된 글라이코실화(예를 들면, N 또는 O 연결 글라이코실화)를 발생시키는 돌연변이를 갖는 Fc 구역을 포함할 수 있거나, 야생형 Fc 모이어티의 변경된 글라이코형(예를 들면, 푸코스 저함량 또는 푸코스 비함유 글라이칸)을 포함할 수 있다.

[0448] 일 실시형태에서, 본 발명의 비처리된 키메라 단백질은 본 명세서에 기재된 Ig 불변 구역 또는 이의 일부로부터 독립적으로 선택된 2개 이상의 구성성분 Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 갖는 유전적으로 융합된 Fc 구역(즉, scFc 구역)을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 이합체 Fc 구역의 Fc 구역은 동일하다. 또 다른 실시형태에서, 적어도 2개의 Fc 구역은 상이하다. 예를 들면, 본 발명의 단백질의 Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너는 동일한 수의 아미노산 잔기를 포함하거나, 1개 이상의 아미노산 잔기(예를 들면, 약 5개의 아미노산 잔기(예를 들면, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 잔기), 약 10개의 잔기, 약 15개의 잔기, 약 20개의 잔기, 약 30개의 잔기, 약 40개의 잔기 또는 약 50개의 잔기)로 길이가 다를 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 단백질의 Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너는 하나 이상의 아미노산 위치에서 서열이 다를 수 있다. 예를 들면, 적어도 2개의 Fc 구역 또는 FcRn 결합 파트너는 약 5개의 아미노산 위치(예를 들면, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 아미노산 위치), 약 10개의 위치, 약 15개의 위치, 약 20개의 위치, 약 30개의 위치, 약 40개의 위치 또는 약 50개의 위치)에서 다를 수 있다.

[0449] **E) 링커**

[0450] 본 발명의 키메라 단백질은 하나 이상의 링커를 추가로 포함한다. 일 유형의 링커는, 예를 들면 응고 자리에서 생체내 대상체에 투여될 때, 다양한 프로테아제에 의해 개열될 수 있는 개열 가능한 링커이다. 일 실시형태에서, 개열 가능한 링커는 응고 과정의 자리에서 키메라 단백질로부터의 모이어티, 예를 들면, VWF 단편의 개열을 허용하여, 활성화 FVIII(FVIIIa)이 이의 FVIIIa 활성을 갖게 허용한다. 또 다른 유형의 링커는 세포내 개열 자리를 포함하고 따라서 숙주 세포에서 세포내 처리 효소에 의해 개열될 수 있어서, 폴리펩타이드의 편리한 발현 및 키메라 단백질의 형성을 허용하는 처리 가능한 링커이다.

[0451] 하나 이상의 링커는 키메라 단백질에서 임의의 2개의 단백질 사이에 위치할 수 있다. 일 실시형태에서, 키메라

단백질은 (ⅰ) VWF 단편, (ⅱ) XTEN 서열 및 (ⅲ) FVIII 단백질을 포함하고, VWF 단편은 링커, 예를 들면, 개열 가능한 링커에 의해 XTEN 서열에 연결되고, XTEN 서열은 FVIII 단백질에 추가로 연결된다(즉, V-L-X-FVIII). 또 다른 실시형태에서, 키메라 단백질은 (ⅰ) VWF 단편, (ⅱ) XTEN 서열 및 (ⅲ) FVIII 단백질을 포함하고, VWF 단편은 XTEN 서열에 연결되고, XTEN 서열은 링커, 예를 들면, 개열 가능한 링커에 의해 FVIII 단백질에 연결된다(즉, V-X-L-FVIII).

[0452] 소정의 실시형태에서, 키메라 단백질은 (ⅰ) VWF 단편, (ⅱ) XTEN 서열, (ⅲ) 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(예를 들면, 제1 Fc 구역), (ⅳ) FVIII 단백질 및 (ⅴ) 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(예를 들면, 제2 Fc 구역)를 포함하되, VWF 단편은 임의의 링커, 예를 들면, 개열 가능한 링커에 의해 XTEN 서열에 연결된다. XTEN 서열은 링커, 예를 들면, 개열 가능한 링커에 의해 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 추가로 연결될 수 있다. (XTEN 서열이 있거나 없는) FVIII 단백질은 또한 임의의 링커, 예를 들면 개열 가능한 링커에 의해 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 연결될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 키메라 단백질은 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(예를 들면, 제1 Fc 구역)와 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(예를 들면, 제2 Fc 구역) 사이에, VWF 단편과 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부 사이에 또는 FVIII 단백질과 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(예를 들면, 제1 Fc 구역) 사이에 하나 이상의 링커, 예를 들면, 처리 가능한 링커를 추가로 포함한다.

[0453] 몇몇 실시형태에서, 본 발명은 (ⅰ) FVIII 단백질, (ⅱ) XTEN 서열, (ⅲ) 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부 및 (ⅳ) 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 포함하는 키메라 단백질을 포함하되, 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부 및 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 처리 가능한 링커에 의해 연결된다.

[0454] 본 발명에 유용한 링커는 임의의 유기 분자를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 링커는 중합체, 예를 들면, 폴리에틸렌 글라이콜(PEG) 또는 하이드록시에틸 전분(HES)을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 링커는 아미노산 서열을 포함한다. 링커는 적어도 약 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 150개, 200개, 300개, 400개, 500개, 600개, 700개, 800개, 900개, 1000개, 1100개, 1200개, 1300개, 1400개, 1500개, 1600개, 1700개, 1800개, 1900개 또는 2000개의 아미노산을 포함할 수 있다. 링커는 1개 내지 5개의 아미노산, 1개 내지 10개의 아미노산, 1개 내지 20개의 아미노산, 10개 내지 50개의 아미노산, 50개 내지 100개의 아미노산, 100개 내지 200개의 아미노산, 200개 내지 300개의 아미노산, 300개 내지 400개의 아미노산, 400개 내지 500개의 아미노산, 500개 내지 600개의 아미노산, 600개 내지 700개의 아미노산, 700개 내지 800개의 아미노산, 800개 내지 900개의 아미노산 또는 900개 내지 1000개의 아미노산을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 링커는 XTEN 서열을 포함한다. XTEN의 추가의 예는 본 발명에 따라 사용될 수 있고, 미국 특허 공보 제2010/0239554호 A1, 제2010/0323956호 A1, 제2011/0046060호 A1, 제2011/0046061호 A1, 제2011/0077199호 A1 또는 제2011/0172146호 A1 또는 국제 특허 공보 WO 제2010091122호 A1, WO 제2010144502호 A2, WO 제2010144508호 A1, WO 제2011028228호 A1, WO 제2011028229호 A1 또는 WO 제2011028344호 A2에 개시되어 있다. 또 다른 실시형태에서, 링커는 PAS 서열이다.

[0455] 본 발명에 유용한 링커는 임의의 유기 분자를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 링커는 중합체, 예를 들면, 폴리에틸렌 글라이콜(PEG) 또는 하이드록시에틸 전분(HES)이다. 또 다른 실시형태에서, 링커는 아미노산 서열이다. 링커는 적어도 약 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 150개, 200개, 300개, 400개, 500개, 600개, 700개, 800개, 900개, 1000개, 1100개, 1200개, 1300개, 1400개, 1500개, 1600개, 1700개, 1800개, 1900개 또는 2000개의 아미노산을 포함할 수 있다. 링커는 1개 내지 5개의 아미노산, 1개 내지 10개의 아미노산, 1개 내지 20개의 아미노산, 10개 내지 50개의 아미노산, 50개 내지 100개의 아미노산, 100개 내지 200개의 아미노산, 200개 내지 300개의 아미노산, 300개 내지 400개의 아미노산, 400개 내지 500개의 아미노산, 500개 내지 600개의 아미노산, 600개 내지 700개의 아미노산, 700개 내지 800개의 아미노산, 800개 내지 900개의 아미노산 또는 900개 내지 1000개의 아미노산을 포함할 수 있다.

[0456] 링커의 예는 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 일 실시형태에서, 링커는 서열 G_n을 포함한다. 링커는 서열$(GA)_n$을 포함할 수 있다. 링커는 서열$(GGS)_n$을 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 링커는 $(GGGS)_n$(서열 번호 57)을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 링커는 서열$(GGS)_n(GGGGS)_n$(서열 번호 58)을 포함한다. 이 경우에, n은 1 내지 100의 정수일 수 있다. 다른 경우에, n은 1 내지 20, 즉, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20의 정수일 수 있다. 링커의 예는 GGG, SGGSGGS(서열 번호 59), GGSGGSGGSGGSGGG(서열 번호 60), GGSGGSGGGGSGGGGS(서열 번호 61), GGSGGSGGSGGSGGSGGS(서열 번호 62) 또는 GGGGSGGGGSGGGGS(서열 번호 63)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 링커는 VIII 인자의 VWF 단편 활성 또는 응고 활성을 제거하거나 감소시키지 않는다. 임의로, 링커는 예를 들면, 추가로 입체 장애의 효과를 감소시키고 VWF 단편 또는

VIII 인자 부분이 이의 표적 결합 자리에 더 접근 가능하게 함으로써, VWF 단편 활성 또는 VIII 인자 단백질의 응고 활성을 증대시킨다.

[0457] 일 실시형태에서, 키메라 단백질에 유용한 링커는 15개 내지 25개의 아미노산 길이이다. 또 다른 실시형태에서, 키메라 단백질에 유용한 링커는 15개 내지 20개의 아미노산 길이이다. 몇몇 실시형태에서, 키메라 단백질에 대한 링커는 10개 내지 25개의 아미노산 길이이다. 다른 실시형태에서, 키메라 단백질에 대한 링커는 15개의 아미노산 길이이다. 또 다른 실시형태에서, 키메라 단백질에 대한 링커는 $(GGGGS)_n$(서열 번호 64)(여기서, G는 글라이신을 나타내고, S는 세린을 나타내고, n은 1 내지 20의 정수임)이다.

[0458] **F) 개열 자리**

[0459] 링커는 또한 하나의 분자를 또 다른 분자로부터 방출시키기 위해 화학적으로(예를 들면, 에스터 결합의 가수분해), 효소적으로(즉, 프로테아제 개열 서열의 편입) 또는 광분해로(예를 들면, 발색단, 예컨대 3-아미노-3-(2-나이트로페닐) 프로프리온산(ANP)) 개열될 수 있는 모이어티를 편입시킬 수 있다.

[0460] 일 실시형태에서, 링커는 개열 가능한 링커이다. 개열 가능한 링커는 N 말단 또는 C 말단 또는 둘 다에서 하나 이상의 개열 자리를 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 개열 가능한 링커는 하나 이상의 개열 가능한 자리로 실질적으로 이루어지거나, 이것으로 이루어진다. 다른 실시형태에서, 개열 가능한 링커는 본 명세서에 기재된 비상동성 아미노산 링커 서열 또는 중합체, 및 하나 이상의 개열 가능한 자리를 포함한다.

[0461] 소정의 실시형태에서, 개열 가능한 링커는 숙주 세포에서 개열될 수 있는 하나 이상의 개열 자리(즉, 세포내 처리 자리)를 포함한다. 개열 자리의 비제한적인 예는 RRRR(서열 번호 9), RKRRKR(서열 번호 10) 및 RRRRS(서열 번호 11)를 포함한다.

[0462] 다른 실시형태에서, 개열 가능한 링커는 개열 가능한 링커를 포함하는 키메라 단백질이 대상체에 투여된 후 프로테아제에 의해 개열되는 하나 이상의 개열 자리를 포함한다. 일 실시형태에서, 개열 자리는 XIa 인자, XIIa 인자, 칼리크레인, VIIa 인자, IXa 인자, Xa 인자, IIa 인자(트롬빈), 엘라스타제-2, MMP-12, MMP-13, MMP-17 및 MMP-20으로 이루어진 군으로부터 선택된 프로테아제에 의해 개열된다. 또 다른 실시형태에서, 개열 자리는 FXIa 개열 자리(예를 들면, KLTR↓AET(서열 번호 65)), FXIa 개열 자리(예를 들면, DFTR↓VVG(서열 번호 66)), FXIIa 개열 자리(예를 들면, TMTR↓IVGG(서열 번호 67)), 칼리크레인 개열 자리(예를 들면, SPFR↓STGG(서열 번호 68)), FVIIa 개열 자리(예를 들면, LQVR↓IVGG(서열 번호 69)), FIXa 개열 자리(예를 들면, PLGR↓IVGG(서열 번호 70)), FXa 개열 자리(예를 들면, IEGR↓TVGG(서열 번호 71)), FIIa(트롬빈) 개열 자리(예를 들면, LTPR↓SLLV(서열 번호 72)), 엘라스타제-2 개열 자리(예를 들면, LGPV↓SGVP(서열 번호 73)), 그랜자임-B 개열 자리(예를 들면, VAGD↓SLEE(서열 번호 74)), MMP-12 개열 자리(예를 들면, GPAG↓LGGA(서열 번호 75)), MMP-13 개열 자리(예를 들면, GPAG↓LRGA(서열 번호 76)), MMP-17 개열 자리(예를 들면, APLG↓LRLR(서열 번호 77)), MMP-20 개열 자리(예를 들면, PALP↓LVAQ(서열 번호 78)), TEV 개열 자리(예를 들면, ENLYFQ↓G(서열 번호 79)), 엔테로키나제 개열 자리(예를 들면, DDDK↓IVGG(서열 번호 80)), 프로테아제 3C(프리시즌(PRESCISSION)(상표명)) 개열 자리(예를 들면, LEVLFQ↓GP(서열 번호 81)) 및 소타제 A 개열 자리(예를 들면, LPKT↓GSES)(서열 번호 82)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 소정의 실시형태에서, FXIa 개열 자리는 예를 들면 TQSFNDFTR(서열 번호 83) 및 SVSQTSKLTR(서열 번호 84)을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 비제한적인 예시적인 트롬빈 개열 자리는 예를 들면 DFLAEGGGVR(서열 번호 85), TTKIKPR(서열 번호 86) 또는 LVPRG(서열 번호 87), 및 ALRPR(서열 번호 17)(예를 들면, ALRPRVVGGA(서열 번호 88))를 포함하거나, 이들로 실질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어진 서열을 포함한다.

[0463] 특정한 실시형태에서, 개열 자리는 TLDPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEEK(서열 번호 8)이다.

[0464] **폴리뉴클레오타이드, 벡터 및 숙주 세포**

[0465] 본 명세서에 기재된 바대로 (a) XTEN 서열 및 FVIII 단백질에 연결된 VWF 단편, (b) XTEN 서열 및 Fc에 연결된 FVIII 단백질 또는 (c) XTEN 서열 및 VWF 단편에 연결된 FVIII 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 본 발명에서 또한 제공된다. 키메라 단백질이 단일 폴리펩타이드 사슬(예를 들면, F2-L2-X-V-L1-F1-FVIII(여기서, FVIII은 FVIII 단백질을 포함하고, F1은 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부, 예를 들면, 제1 Fc 구역을 포함하며, L1은 제1 링커를 포함하고, V는 VWF 단편을 포함하고, X는 XTEN 서열을 포함하며, L2는 제2 링커를 포함하고, F2는 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부, 예를 들면, 제2 Fc 구역을 포함함)일 때, 본 발명은 단일 폴리펩타이드 사슬을 코딩하는 단일 폴리뉴클레오타이드 사슬에 관한 것이다. 키메라 단백질이 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬(F2-L2-X-V:FVIII-F1)을 포함할 때, 제1 폴리펩타이드 사슬은 개열 가능한 링커에 의해 제1 Ig 불변

구역 또는 이의 일부(예를 들면, 제1 Fc 구역)에 추가로 연결된 XTEN 서열에 연결된 VWF 단편을 포함하고(예를 들면, F2-L2-X-V), 제2 폴리펩타이드 사슬은 FVIII 단백질 및 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(예를 들면, 제2 Fc 구역)를 포함하고(예를 들면, FVIII-F1), 제1 폴리펩타이드 사슬 및 제2 폴리펩타이드 사슬은 서로 회합되고, 폴리뉴클레오타이드는 제1 뉴클레오타이드 서열 및 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드 사슬 및 제2 폴리펩타이드 사슬은 단일 폴리뉴클레오타이드 사슬에 의해 코딩될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 제1 폴리펩타이드 사슬 및 제2 폴리펩타이드 사슬은 2개의 상이한 폴리뉴클레오타이드, 즉 제1 뉴클레오타이드 서열 및 제2 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된다. 또 다른 실시형태에서, 제1 뉴클레오타이드 서열 및 제2 뉴클레오타이드 서열은 2개의 상이한 폴리뉴클레오타이드(예를 들면, 상이한 벡터)에 있다. 소정의 실시형태에서, 본 발명은 제1 뉴클레오타이드 사슬 및 제2 뉴클레오타이드 사슬을 포함하는 한 세트의 폴리뉴클레오타이드에 관한 것이고, 제1 뉴클레오타이드 사슬은 키메라 단백질의 VWF 단편을 코딩하고, 제2 뉴클레오타이드 사슬은 FVIII 단백질을 코딩한다. 몇몇 실시형태에서, 2개의 폴리펩타이드 사슬 또는 3개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 키메라 단백질은 단일 폴리뉴클레오타이드 사슬에 의해 코딩되고 이후 처리되어 2개 또는 3개(또는 초과)의 폴리펩타이드 사슬이 될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 이 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 키메라 단백질은 2개 또는 3개의 폴리뉴클레오타이드 사슬에 의해 코딩될 수 있다.

[0466] 다른 실시형태에서, 한 세트의 폴리뉴클레오타이드는 단백질 전환효소를 코딩하는 추가의 뉴클레오타이드 사슬(예를 들면, 키메라 폴리펩타이드가 단일 폴리뉴클레오타이드 사슬에 의해 코딩될 때 제2 뉴클레오타이드 사슬 또는 키메라 단백질이 2개의 폴리뉴클레오타이드 사슬에 의해 코딩될 때 제3 뉴클레오타이드 사슬)을 추가로 포함한다. 단백질 전환효소는 프로단백질 전환효소 서브틸리신/헥신 5형(PCSK5 또는 PC5), 프로단백질 전환효소 서브틸리신/헥신 7형(PCSK7 또는 PC5), 효모 Kex 2, 프로단백질 전환효소 서브틸리신/헥신 3형(PACE 또는 PCSK3), 및 이들의 2개 이상의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 단백질 전환효소는 PACE, PC5 또는 PC7이다. 특정한 실시형태에서, 단백질 전환효소는 PC5 또는 PC7이다. 국제 출원 제 PCT/US2011/043568호를 참조한다.

[0467] 본 명세서에 사용되는 바대로, 발현 벡터는 적절한 숙주 세포로 도입될 때 삽입된 코딩 서열의 전사 및 번역에 필요한 구성요소 또는, RNA 바이러스 벡터의 경우에, 복제 및 번역에 필요한 구성요소를 포함하는 임의의 핵산 작제물을 의미한다. 발현 벡터는 플라스미드, 파지미드, 바이러스 및 이들의 유도체를 포함할 수 있다.

[0468] 본 발명의 발현 벡터는 본 명세서에 기재된 키메라 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일 실시형태에서, VWF 단편 및 XTEN, FVIII 단백질 및 XTEN 또는 둘 다에 대한 하나 이상의 코딩 서열은 발현 조절 서열에 작동적으로 연결된다. 본 명세서에 사용되는 바대로, 2개의 핵산 서열은 각각의 성분 핵산 서열이 이의 기능을 보유하도록 허용하는 방식으로 공유 연결될 때 작동적으로 연결된다. 코딩 서열 및 유전자 발현 조절 서열은 유전자 발현 조절 서열의 영향 또는 제어 하에 코딩 서열의 발현 또는 전사 및/또는 번역이 발생하게 하는 방식으로 공유 연결될 때 작동적으로 연결된다고 말해진다. 2개의 DNA 서열은, 5' 유전자 발현 서열에서의 프로모터의 유도가 코딩 서열의 전사를 발생시키는 경우, 및 2개의 DNA 서열 사이의 연결의 성질이 (1) 해독틀 이동 돌연변이의 도입을 발생시키지 않거나, (2) 코딩 서열의 전사를 지시하는 프로모터 구역의 능력을 방해하지 않거나, (3) 상응하는 RNA 전사물이 단백질로 번역되는 능력을 방해하지 않는 경우 작동적으로 연결된다고 말해진다. 따라서, 유전자 발현 서열은 유전자 발현 서열이 코딩 핵산 서열의 전사를 실행하여 생성된 전사물이 원하는 단백질 또는 폴리펩타이드로 번역되는 경우 그 코딩 핵산 서열에 작동적으로 연결될 것이다.

[0469] 본 명세서에 사용되는 바대로, 유전자 발현 조절 서열은, 이것이 작동적으로 연결된 코딩 핵산의 효과적인 전사 및 번역을 수월하게 하는, 임의의 조절 뉴클레오타이드 서열, 예컨대 프로모터 서열 또는 프로모터-인핸서 조합이다. 유전자 발현 조절 서열은 예를 들면 포유동물 또는 바이러스 프로모터, 예컨대 구성적 또는 유도성 프로모터일 수 있다. 구성적 포유동물 프로모터는 하기 유전자에 대한 프로모터를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다: 하이포잔틴 포스포리보실 트랜스퍼라제(HPRT), 아데노신 데아미나제, 피루베이트 키나제, 베타-액틴 프로모터 및 다른 구성적 프로모터. 진핵생물 세포에서 구성적으로 작용하는 예시적인 바이러스 프로모터는 예를 들면 사이토메갈로바이러스(CMV), 유인원 바이러스(예를 들면, SV40), 유도종 바이러스, 아데노바이러스, 인간 면역결핍증 바이러스(HIV), 라우스 육종 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 몰로니 백혈병 바이러스의 긴 말단 반복부(LTR), 및 다른 레트로바이러스의 프로모터, 및 단순 포진 바이러스의 티미딘 키나제 프로모터를 포함한다. 다른 구성적 프로모터는 당해 분야의 당업자에게 공지되어 있다. 본 발명의 유전자 발현 서열로서 유용한 프로모터는 또한 유도성 프로모터를 포함한다. 유도성 프로모터는 유도제의 존재 하에 발현된다. 예를 들면, 메탈로티오네인 프로모터는 소정의 금속 이온의 존재 하에 전사 및 번역을 촉진하도록 유도된다. 다른 유도성 프로모터는 당해 분야의 당업자에게 공지되어 있다.

[0470] 일반적으로, 유전자 발현 조절 서열은, 필요한 바대로, 각각 전사 및 번역의 개시에 관여한 5' 비전사 및 5' 비번역 서열, 예컨대 TATA 박스, 캡핑 서열, CAAT 서열 등을 포함해야 한다. 특히, 이러한 5' 비전사 서열은 작동적으로 연결된 코딩 핵산의 전사 조절을 위한 프로모터 서열을 포함하는 프로모터 구역을 포함할 것이다. 유전자 발현 서열은 임의로 원하는 바대로 인핸서 서열 또는 상류 활성화인자 서열을 포함한다.

[0471] 바이러스 벡터는 하기 바이러스로부터의 핵산 서열을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다: 레트로바이러스, 예컨대 몰로니 쥣과 백혈병 바이러스, 하비(Harvey) 쥣과 육종 바이러스, 쥣과 유방 종양 바이러스 및 라우스 육종 바이러스; 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스; SV40형 바이러스; 폴리오마 바이러스; 엡스테인 바 바이러스; 유도종 바이러스; 포진 바이러스; 백시니아 바이러스; 폴리오 바이러스; 및 RNA 바이러스, 예컨대 레트로바이러스. 당해 분야에 널리 공지된 다른 벡터를 쉽게 사용할 수 있다. 소정의 바이러스 벡터는 비필수 유전자가 관심 있는 유전자로 대체된 비세포변성 진핵생물 바이러스에 기초한다. 비세포변성 바이러스는 레트로바이러스를 포함하고, 이의 생활 주기는 게놈 바이러스 RNA의 DNA로의 역전사와 후속하는 숙주 세포 DNA로의 프로바이러스 통합을 수반한다. 레트로바이러스는 인간 유전자 치료 실험에 승인받았다. 복제 결핍(즉, 원하는 단백질의 합성을 지시할 수 있지만, 감염성 입자를 제조할 수 없는)인 레트로바이러스가 가장 유용하다. 이러한 유전적으로 변경된 레트로바이러스 발현 벡터는 *생체내* 유전자의 고효율 형질도입에 대한 일반적 유용성을 갖는다. (외인성 유전자 물질의 플라스미드로의 편입, 패키징 세포주의 플라스미드에 의한 형질감염, 패키징 세포주에 의한 재조합 레트로바이러스의 생산, 조직 배양 배지로부터의 바이러스 입자의 수집 및 바이러스 입자에 의한 표적 세포의 감염의 단계를 포함하는) 복제 결핍 레트로바이러스를 제조하기 위한 표준 프로토콜이 문헌[Kriegler, M., Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, W.H. Freeman Co., New York (1990) 및 Murry, E. J., Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Humana Press, Inc., Cliffton, N.J. (1991)]에 제공된다.

[0472] 일 실시형태에서, 바이러스는 아데노 관련 바이러스, 이중 가닥 DNA 바이러스이다. 아데노 관련 바이러스는 복제 결핍이도록 조작될 수 있고, 광범위한 세포 유형 및 종을 감염시킬 수 있다. 이것은 열 및 지질 용매 안정성; 조혈 세포를 포함하는 다양한 계통의 세포에서의 높은 형질도입 빈도; 및 중복감염 억제의 결여(따라서, 다수의 일련의 형질도입을 허용함)와 같은 이점을 추가로 갖는다. 보고에 의하면, 아데노 관련 바이러스는 자리 특이적 방식으로 인간 세포 DNA로 통합되어, 삽입 돌연변이유발의 가능성 및 레트로바이러스 감염의 삽입된 유전자 발현 특징의 가변성을 최소화할 수 있다. 또한, 야생형 아데노 관련 바이러스 감염은 선택적 압력의 부재 하에 100회 초과의 계대 배양을 위한 조직 배양에 후행하고, 이는 아데노 관련 바이러스 게놈 통합이 비교적 안정한 사건이라는 것을 의미한다. 아데노 관련 바이러스는 또한 염색체외 방식으로 작용할 수 있다.

[0473] 다른 벡터는 플라스미드 벡터를 포함한다. 플라스미드 벡터는 당해 분야에 광범위하게 기재되어 있고, 당해 분야의 당업자에게 널리 공지되어 있다. 예를 들면, 문헌[Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989]을 참조한다. 최근 몇 년간, 플라스미드 벡터는 숙주 게놈 내에 복제하고 이로 통합하는 이의 불능으로 인해 *생체내* 유전자를 세포로 전달하기에 특히 유리한 것으로 발견되었다. 그러나, 숙주 세포에 적합한 프로모터를 갖는 이 플라스미드는 플라스미드 내에 작동적으로 코딩된 유전자로부터 펩타이드를 발현시킬 수 있다. 상업적 판매자로부터 구입 가능한 몇몇 흔히 사용되는 플라스미드는 pBR322, pUC18, pUC19, 다양한 pcDNA 플라스미드, pRC/CMV, 다양한 pCMV 플라스미드, pSV40 및 pBlueScript를 포함한다. 구체적인 플라스미드의 추가의 예는 pcDNA3.1(카탈로그 V79020호); pcDNA3.1/하이그로(카탈로그 V87020호); pcDNA4/myc-His(카탈로그 V86320호); 및 pBudCE4.1(카탈로그 V53220호)(모두 인비트로겐(Invitrogen)(캘리포니아주 칼스바드)사)을 포함한다. 다른 플라스미드는 당해 분야의 당업자에게 널리 공지되어 있다. 추가로, 플라스미드는 DNA의 특이적 단편을 제거하고/하거나 부가하기 위해 표준 분자 생물학 기법을 이용하여 주문 설계될 수 있다.

[0474] 본 발명의 단백질을 생산하기 위해 사용될 수 있는 하나의 곤충 발현 시스템에서, 외래 유전자를 발현시키는 벡터로서 아우토그라파 캘리포니카 핵 다한증 바이러스(*Autographa californica* nuclear polyhidrosis virus: AcNPV)를 사용한다. 바이러스는 스포돕테라 프루지페르다(*Spodoptera frugiperda*) 세포에서 성장한다. 코딩 서열은 바이러스의 비필수 구역(예를 들면, 폴리헤드론 유전자)으로 클로닝되고, ACNPV 프로모터(예를 들면, 폴리헤드론 프로모터)의 조절 하에 위치할 수 있다. 코딩 서열의 성공적인 삽입은 폴리헤드론 유전자의 불활성화 및 비폐색 재조합 바이러스(즉, 폴리헤드론 유전자에 의해 코딩된 단백질성 코트가 결여된 바이러스)의 생산을 발생시킬 것이다. 이후, 이 재조합 바이러스는 삽입된 유전자가 발현된 스포돕테라 프루지페르다 세포를 감염시키도록 사용된다. (예를 들면, 문헌[Smith *et al.* (1983) *J Virol* 46:584]; 미국 특허 제4,215,051호 참조). 이

발현 시스템의 추가의 예는 문헌[Ausubel *et al.*, eds. (1989) Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience]에서 확인될 수 있다.

[0475] 본 발명의 단백질을 발현시키도록 사용될 수 있는 또 다른 시스템은 "GS 발현 시스템"(Lonza Biologics PLC(영국 버크셔주))이라고도 칭하는 글루타민 합성효소 유전자 발현 시스템이다. 이 발현 시스템은 미국 특허 제5,981,216호에 자세히 기재되어 있다.

[0476] 포유동물 숙주 세포에서, 다수의 바이러스 기반 발현 시스템을 이용할 수 있다. 아데노바이러스를 발현 벡터로서 사용하는 경우, 코딩 서열은 아데노바이러스 전사/번역 조절 복합체, 예를 들면, 후기 프로모터 및 3조(tripartite) 선도 서열에 결찰될 수 있다. 이후, 이 키메라 유전자는 *실험실내* 또는 *생체내* 재조합에 의해 아데노바이러스 게놈에서 삽입될 수 있다. 바이러스 게놈의 비필수 구역(예를 들면, E1 또는 E3 구역)에서의 삽입은 감염된 숙주에서 펩타이드를 발현할 수 있고 생육성인 재조합 바이러스를 생성시킬 것이다. 예를 들면, 문헌[Logan & Shenk (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3655]을 참조한다. 대안적으로, 백시니아 7.5 K 프로모터를 사용할 수 있다. 예를 들면, 문헌[Mackett *et al.* (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7415; Mackett *et al.* (1984) *J Virol* 49:857; Panicali *et al.* (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* 79:4927]을 참조한다.

[0477] 생산의 효율을 증가시키기 위해, 효소 개열 자리에 의해 분리된 본 발명의 단백질의 다수의 단위를 코딩하도록 폴리뉴클레오타이드를 설계할 수 있다. 생성된 폴리펩타이드를 (예를 들면, 적절한 효소에 의한 처리에 의해) 개열시켜 폴리펩타이드 단위를 회수할 수 있다. 이는 단일 프로모터에 의해 추진된 폴리펩타이드의 수율을 증가시킬 수 있다. 적절한 바이러스 발현 시스템에서 사용할 때, mRNA에 의해 코딩된 각각의 폴리펩타이드의 번역은 예를 들면 내부 리보솜 진입 자리(IRES)에 의해 전사물에서 내부에서 지시된다. 따라서, 폴리시스트론 작제물은 단일의 큰 폴리시스트론 mRNA의 전사를 지시하고, 이는 결국 다수의 개별적인 폴리펩타이드의 번역을 지시한다. 이 접근법은 폴리단백질의 생산 및 효소 처리를 제거하고, 단일 프로모터에 의해 추진된 폴리펩타이드의 수율을 상당히 증가시킬 수 있다.

[0478] 형질전환에서 사용된 벡터는 형질전환체를 확인하기 위해 사용된 선택 가능한 마커를 일반적으로 포함할 것이다. 박테리아 시스템에서, 이는 항생제 내성 유전자, 예컨대 암피실린 또는 카나마이신을 포함할 수 있다. 배양된 포유동물 세포에서 사용하기 위한 선택 가능한 마커는 약물, 예컨대 네오마이신, 하이그로마이신 및 메토트렉세이트에 내성을 부여하는 유전자를 포함한다. 선택 가능한 마커는 증폭 가능한 선택 가능한 마커일 수 있다. 하나의 증폭 가능한 선택 가능한 마커는 디히드로엽산 환원효소(dihydrofolate reductase: DHFR) 유전자이다. Simonsen C C *et al.* (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2495-9. 선택 가능한 마커는 문헌[Thilly (1986) Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers(메사추세츠주 스톤햄)]에 검토되어 있고, 선택 가능한 마커의 선택은 당해 분야의 당업자의 수준 내에 맞게 있다.

[0479] 선택 가능한 마커는 관심 있는 유전자와 동시에 별개의 플라스미드 상에 세포로 도입될 수 있거나, 동일한 플라스미드 상에 도입될 수 있다. 동일한 플라스미드 상에 있는 경우, 선택 가능한 마커 및 관심 있는 유전자는 상이한 프로모터 또는 동일한 프로모터의 조절 하에 있을 수 있고, 후자의 배치는 다이시스트론 메시지를 생성한다. 이 유형의 작제물은 당해 분야에 공지되어 있다(예를 들면, 미국 특허 제4,713,339호).

[0480] 발현 벡터는 재조합으로 생성된 단백질의 용이한 정제를 허용하는 태그에 대해 코딩할 수 있다. 예는 벡터 pUR278(Ruther *et al.* (1983) *EMBO J* 2:1791)(여기서, 발현시키고자 하는 단백질에 대한 코딩 서열이 lac z 코딩 구역과 프레임 상 벡터에 결찰되어 태그화 융합 단백질이 생성될 수 있음); pGEX 벡터(글루타티온 S-트랜스퍼라제(GST) 태그와 함께 본 발명의 단백질을 발현시키도록 사용될 수 있음)를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 이 단백질은 일반적으로 가용성이고, 글루타티온-아가로스 비드에 대한 흡착, 이후 유리 글루타티온의 존재 하의 용리에 의해 세포로부터 쉽게 정제될 수 있다. 벡터는 정제 후 태그의 용이한 제거를 위해 개열 자리(트롬빈 또는 Xa 인자 프로테아제 또는 프리시즌 프로테아제(PRESCISSION PROTEASE)(상표명)(파마시아(Pharmacia)(뉴저지주 피팩)))를 포함한다.

[0481] 이후, 발현 벡터 또는 벡터들은 폴리펩타이드를 발현하는 적합한 표적 세포로 형질감염 또는 동시형질감염된다. 당해 분야에 공지된 형질감염 기법은 인산칼슘 침강(Wigler *et al.* (1978) *Cell* 14:725), 전기천공(Neumann *et al.* (1982) *EMBO J* 1:841) 및 리포솜 기반 시약을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 원핵생물 및 진핵생물 세포 둘 다를 포함하는 본 명세서에 기재된 단백질을 발현시키기 위해 다양한 숙주-발현 벡터 시스템을 이용할 수 있다. 이는 적절한 코딩 서열을 포함하는 재조합 박테리오파지 DNA 또는 플라스미드 DNA 발현 벡터로 형질전환된 미생물, 예컨대 박테리아(예를 들면, 이. 콜라이); 적절한 코딩 서열을 포함하는 재조합 효모 또는 진균 발현 벡터로 형질전환된 효모 또는 사상균; 적절한 코딩 서열을 포함하는 재조합 바이러스 발현 벡터(예를

들면, 바큘로바이러스)로 감염된 곤충 세포 시스템; 재조합 바이러스 발현 벡터(예를 들면, 꽃양배추 모자이크 바이러스 또는 담배 모자이크 바이러스)로 감염되거나 적절한 코딩 서열을 포함하는 재조합 플라스미드 발현 벡터(예를 들면, Ti 플라스미드)로 형질전환된 식물 세포 시스템; 또는 포유동물 세포(예를 들면, HEK 293, CHO, Cos, HeLa, HKB11 및 BHK 세포)를 포함하는 동물 세포 시스템을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0482] 일 실시형태에서, 숙주 세포는 진핵생물 세포이다. 본 명세서에 사용되는 바대로, 진핵생물 세포는 고유 핵을 갖는 임의의 동물 또는 식물 세포를 의미한다. 동물의 진핵생물 세포는 척추동물, 예를 들면, 포유동물의 세포 및 무척추동물, 예를 들면, 곤충의 세포를 포함한다. 식물의 진핵생물 세포는 구체적으로, 제한 없이, 효모 세포를 포함할 수 있다. 진핵생물 세포는 원핵생물 세포, 예를 들면, 박테리아와 구별된다.

[0483] 소정의 실시형태에서, 진핵생물 세포는 포유동물 세포이다. 포유동물 세포는 포유동물로부터 유래한 임의의 세포이다. 포유동물 세포는 구체적으로 포유동물 세포주를 포함하지만, 이것으로 제한되지는 않는다. 일 실시형태에서, 포유동물 세포는 인간 세포이다. 또 다른 실시형태에서, 포유동물 세포는 HEK 293 세포이고, 이는 인간 배아 신장 세포주이다. HEK 293 세포는 어메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection)(버니지아주 머네서스)사의 CRL-1533 및 인비트로겐(캘리포니아주 칼스바드)사의 293-H 세포(카탈로그 11631-017호) 또는 293-F 세포(카탈로그 11625-019호)로서 구입 가능하다. 몇몇 실시형태에서, 포유동물 세포는 PER.C6(등록상표) 세포이고, 이는 망막으로부터 유래한 인간 세포주이다. PER.C6(등록상표) 세포는 크루셀(Crucell)(네덜란드 라이덴)로부터 구입 가능하다. 다른 실시형태에서, 포유동물 세포는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포이다. CHO 세포는 어메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(버니지아주 머네서스)사로부터 구입 가능하다(예를 들면, CHO-K1; CCL-61). 또 다른 실시형태에서, 포유동물 세포는 베이비 햄스터 신장(BHK) 세포이다. BHK 세포는 어메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(버니지아주 머네서스)사로부터 구입 가능하다(예를 들면, CRL-1632). 몇몇 실시형태에서, 포유동물 세포는 HKB11 세포이고, 이는 HEK293 세포의 하이브리드 세포주 및 인간 B 세포주이다. Mei *et al., Mol. Biotechnol.* 34(2): 165-78 (2006).

[0484] 일 실시형태에서, FVIII(X)-Fc 융합 코딩 서열, VWF 단편-L-Fc 융합 코딩 서열 또는 둘 다를 포함하는 플라스미드, 및 선택 가능한 마커, 예를 들면, 제오신 내성은 키메라 단백질의 생산을 위해 HEK 293 세포로 형질감염된다.

[0485] 또 다른 실시형태에서, FVIII-Fc 융합 코딩 서열, VWF 단편-XTEN-L-Fc 융합 코딩 서열 또는 둘 다를 포함하는 플라스미드, 및 선택 가능한 마커, 예를 들면, 제오신 내성은 키메라 단백질의 생산을 위해 HEK 293 세포로 형질감염된다.

[0486] 다른 실시형태에서, FVIII(X)-Fc 융합 코딩 서열, Fc 코딩 서열 또는 둘 다를 포함하는 플라스미드, 및 선택 가능한 마커, 예를 들면, 제오신 내성은 키메라 단백질의 생산을 위해 HEK 293 세포로 형질감염된다.

[0487] 몇몇 실시형태에서, FVIII(X)-Fc 융합 코딩 서열을 포함하는 제1 플라스미드 및 제1 선택 가능한 마커, 예를 들면, 제오신 내성 유전자 및 Fc 코딩 서열 또는 VWF 단편-L-Fc 코딩 서열을 포함하는 제2 플라스미드 및 제2 선택 가능한 마커, 예를 들면, 네오마이신 내성 유전자 및 단백질 전환효소 코딩 서열을 포함하는 제3 플라스미드 및 제3 선택 가능한 마커, 예를 들면, 하이그로마이신 내성 유전자는 키메라 단백질의 생산을 위해 HEK 293 세포로 동시형질감염된다. 제1 플라스미드 및 제2 플라스미드는 동량(즉, 1:1 몰비)으로 도입될 수 있거나, 비동량으로 도입될 수 있다.

[0488] 또 다른 실시형태에서, FVIII-Fc 융합 코딩 서열을 포함하는 제1 플라스미드 및 제1 선택 가능한 마커, 예를 들면, 제오신 내성 유전자 및 VWF 단편-XTEN-L-Fc 코딩 서열을 포함하는 제2 플라스미드 및 제2 선택 가능한 마커, 예를 들면, 네오마이신 내성 유전자 및 단백질 전환효소 코딩 서열을 포함하는 제3 플라스미드 및 제3 선택 가능한 마커, 예를 들면, 하이그로마이신 내성 유전자는 키메라 단백질의 생산을 위해 HEK 293 세포로 동시형질감염된다. 제1 플라스미드 및 제2 플라스미드는 동량(즉, 1:1 몰비)으로 도입될 수 있거나, 비동량으로 도입될 수 있다.

[0489] 또 다른 실시형태에서, FVIII(X)-Fc 융합 코딩 서열을 포함하는 제1 플라스미드 및 제1 선택 가능한 마커, 예를 들면, 제오신 내성 유전자 및 VWF 단편-XTEN-L-Fc 코딩 서열을 포함하는 제2 플라스미드 및 제2 선택 가능한 마커, 예를 들면, 네오마이신 내성 유전자 및 단백질 전환효소 코딩 서열을 포함하는 제3 플라스미드 및 제3 선택 가능한 마커, 예를 들면, 하이그로마이신 내성 유전자는 키메라 단백질의 생산을 위해 HEK 293 세포로 동시형질감염된다. 제1 플라스미드 및 제2 플라스미드는 동량(즉, 1:1 몰비)으로 도입될 수 있거나, 비동량으로 도입될 수 있다.

[0490] 소정의 실시형태에서, 키메라 단백질 코딩 FVIII(XTEN과 함께 또는 이것 없이)-F1-L1-V-XTEN-L2-F2 코딩 서열을 포함하는 제1 플라스미드 및 제1 선택 가능한 마커, 예를 들면, 제오신 내성 유전자 및 단백질 전환효소 코딩 서열을 포함하는 제2 플라스미드 및 제2 선택 가능한 마커, 예를 들면, 하이그로마이신 내성 유전자는 키메라 단백질의 생산을 위해 HEK 293 세포로 동시형질감염된다. FVIII(X)-Fc 코딩 서열 및 VWF-XTEN-Fc 코딩 서열에 대한 프로모터는 상이할 수 있거나, 동일할 수 있다.

[0491] 또 다른 실시형태에서, 형질감염된 세포는 안정하게 형질감염된다. 이 세포는 당해 분야의 당업자에게 공지된 종래의 기법을 이용하여 안정한 세포주로서 선택되고 유지될 수 있다.

[0492] 단백질의 DNA 작제물을 포함하는 숙주 세포는 적절한 성장 배지 중에 성장한다. 본 명세서에 사용되는 바대로, 용어 "적절한 성장 배지"는 세포 성장에 필요한 영양소를 함유하는 배지를 의미한다. 세포 성장에 필요한 영양소는 탄소원, 질소원, 필수 아미노산, 비타민, 무기질 및 성장 인자를 포함할 수 있다. 임의로, 배지는 하나 이상의 선택 인자를 포함할 수 있다. 임의로 배지는 송아지 혈청 또는 태아 소 혈청(FCS)을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 배지는 IgG를 실질적으로 포함하지 않는다. 성장 배지는 일반적으로, DNA 작제물 상의 선택 가능한 마커에 의해 보완되거나 DNA 작제물과 동시형질감염된, 필수 영양소 중의 예를 들면 약물 선택 또는 결핍에 의해 DNA 작제물을 포함하는 세포를 선택할 것이다. 배양된 포유동물 세포는 일반적으로 상업적으로 구입 가능한 혈청 함유 또는 혈청 비함유 배지(예를 들면, MEM, DMEM, DMEM/F12) 중에 성장한다. 일 실시형태에서, 배지는 CD293(인비트로겐(캘리포니아주 칼스바드))이다. 또 다른 실시형태에서, 배지는 CD17(인비트로겐(캘리포니아주 칼스바드))이다. 사용되는 특정한 세포주에 적절한 배지의 선택은 당해 분야의 당업자의 수준 내에 있다.

[0493] 키메라 단백질의 2개의 폴리펩타이드 사슬을 동시발현시키기 위해, 숙주 세포는 사슬 둘 다의 발현을 허용하는 조건 하에 배양된다. 본 명세서에 사용되는 바대로, 배양한다는 것은 적어도 한정된 시간 동안 *실험실내* 살아 있는 세포를 유지시키는 것을 의미한다. 유지시킨다는 것은 살아 있는 세포의 집단의 증가일 수 있지만, 이를 반드시 포함할 필요는 없다. 예를 들면, 배양물 중에 유지된 세포는 집단에서 정지일 수 있지만, 여전히 원하는 생성물, 예를 들면, 재조합 단백질 또는 재조합 융합 단백질을 생산할 수 있고 생육성이다. 진핵생물 세포를 배양하기 위한 적합한 조건은 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 배양 배지, 배지 보충물, 온도, pH, 산소 포화 등의 적절한 선택을 포함한다. 상업적 목적을 위해, 배양은 진탕기 플라스크, 롤러 병, 중공 섬유 생물반응기, 교반 탱크 생물반응기, 에어 리프트 생물반응기, 웨이브(Wave) 생물반응기 및 기타를 포함하는 임의의 다양한 유형의 스케일 업 시스템의 사용을 포함할 수 있다.

[0494] 세포 배양 조건은 또한 VWF 단편과 FVIII 단백질의 회합을 허용하도록 선택된다. VWF 단편 및/또는 FVIII 단백질의 발현을 허용하는 조건은 비타민 K의 공급원의 조건을 포함할 수 있다. 예를 들면, 일 실시형태에서, 안정하게 형질감염된 HEK 293 세포는 4mM 글루타민이 보충된 CD293 배지(인비트로겐(캘리포니아주 칼스바드)) 또는 OptiCHO 배지(인비트로겐(캘리포니아주 칼스바드)) 중에 배양된다.

[0495] 일 양상에서, 본 발명은 a) 키메라 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 숙주 세포를 형질감염시키는 단계 및 b) 키메라 단백질을 발현시키기에 적합한 조건 하에 배양 배지 중에 숙주 세포를 배양하는 단계(여기서, 키메라 단백질이 발현됨)를 포함하는 본 발명의 키메라 단백질을 발현시키거나, 제조하거나, 생산하는 방법에 관한 것이다.

[0496] 추가의 실시형태에서, XTEN 서열에 연결된 VWF 단편 또는 XTEN 서열에 연결된 FVIII 단백질을 포함하는 단백질 생성물은 배지로 분비된다. 배지는 세포로부터 분리되고, 농축되고, 여과되고, 이후 2개 또는 3개의 친화도 칼럼, 예를 들면, 단백질 A 칼럼 및 1개 또는 2개의 음이온 교환 칼럼을 통과한다.

[0497] 소정의 양상에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 방법에 의해 생산된 키메라 단백질에 관한 것이다.

[0498] *실험실내* 생산은 본 발명의 다량의 원하는 변경된 폴리펩타이드를 생성하도록 스케일 업을 허용한다. 조직 배양 조건 하의 포유동물 세포 배양에 대한 기법은 당해 분야에 공지되어 있고, 예를 들면 에어 리프트 반응기 또는 연속 교반기 반응기 내의 균질한 현탁 배양 또는, 예를 들면 중공 섬유, 마이크로캡슐 중의, 아가로스 마이크로비드 또는 세라믹 카트리지 상의 부동화된 또는 포획된 세포 배양을 포함한다. 필요한 경우 및/또는 원하는 경우, 폴리펩타이드의 용액은 관습적 크로마토그래피 방법, 예를 들면 겔 여과, 이온-교환 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피(HIC, DEAE-셀룰로스에 대한 크로마토그래피 또는 친화도 크로마토그래피)에 의해 정제될 수 있다.

[0499] **약제학적 조성물**

[0500] 본 발명의 키메라 단백질을 포함하는 조성물은 적합한 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 예를 들면, 상기 조성물은 작용 자리에 대한 전달에 설계된 제제로의 활성 화합물의 처리를 수월하게 하는 부형제 및/또는 보조제를 포함할 수 있다.

[0501] 약제학적 조성물은 볼루스 주사에 의한 비경구 투여(즉 정맥내, 피하 또는 근육내)를 위해 제제화될 수 있다. 주사용 제제는 단위 용량 형태, 예를 들면, 앰플 또는 첨가된 보존제를 갖는 다용량 용기로 존재할 수 있다. 상기 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액 또는 에멀션과 같은 형태를 취하고, 제제화제, 예컨대 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제를 포함할 수 있다. 대안적으로, 활성 성분은 적합한 비히클, 예를 들면, 발열원 비함유 물에 의한 구성을 위한 분말 형태일 수 있다.

[0502] 비경구 투여에 적합한 제제는 또한 수용성 형태, 예를 들면, 수용성 염 내의 활성 화합물의 수성 용액을 포함한다. 또한, 적절한 유성 주사 현탁액으로서의 활성 화합물의 현탁제를 투여할 수 있다. 적합한 친유성 용매 또는 비히클은 지방 오일, 예를 들면, 참깨 오일 또는 합성 지방산 에스터, 예를 들면, 에틸 올레에이트 또는 트라이글라이세라이드를 포함한다. 수성 주사 현탁액은 예를 들면 나트륨 카복시메틸 셀룰로스, 솔비톨 및 덱스트란을 포함하는 현탁액의 점도를 증가시키는 물질을 포함할 수 있다. 임의로, 현탁액은 또한 안정화제를 포함할 수 있다. 리포솜은 또한 세포 또는 간질 공간으로의 전달을 위해 본 발명의 분자를 캡슐화하도록 사용될 수 있다. 예시적인 약제학적으로 허용되는 담체는 생리학적 상용성 용매, 분산 배지, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제, 물, 식염수, 인산염 완충 식염수, 덱스트로스, 글라이세롤, 에탄올 등이다. 몇몇 실시형태에서, 상기 조성물은 등장화제, 예를 들면, 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 솔비톨 또는 염화나트륨을 포함한다. 다른 실시형태에서, 상기 조성물은 활성 성분의 유통 기한 또는 효과를 증대시키는 약제학적으로 허용되는 물질, 예컨대 습윤제 또는 소량의 보조 물질, 예컨대 습윤제 또는 유화제, 보존제 또는 완충제를 포함한다.

[0503] 본 발명의 조성물은 예를 들면, 액체(예를 들면, 주사용 및 점적용 용액), 분산액, 현탁액, 반고체 및 고체 제형을 포함하는 다양한 형태일 수 있다. 바람직한 형태는 투여 방식 및 치료학적 용도에 따라 달라진다.

[0504] 상기 조성물은 용액, 마이크로 에멀션, 분산액, 리포솜 또는 높은 약물 농도에 적합한 다른 구조화 구조로서 제제화될 수 있다. 무균 주사용 용액은, 필요한 바대로 상기 열거된 성분의 중 하나 또는 이들의 조합에 의해, 적절한 용매 중의 필요한 양의 활성 성분의 편입, 이후 여과 무균에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 상기 열거된 것으로부터 기본 분산 배지 및 필요한 다른 성분을 포함하는 무균 비히클로 활성 성분을 편입함으로써 제조된다. 무균 주사용 용액의 제조를 위한 무균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 이전의 무균 여과 용액으로부터 활성 성분과 함께 임의의 추가의 원하는 성분의 분말을 생성시키는 진공 건조 및 동결 건조이다. 적절한 용액 유동성은 예를 들면 코팅, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 주사용 조성물의 연장된 흡수는 상기 조성물 중에 흡수를 지연시키는 물질, 예를 들면, 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함함으로써 발생할 수 있다.

[0505] 활성 성분은 제어 방출 제제 또는 장치에 의해 제제화될 수 있다. 이러한 제제 및 장치의 예는 임플란트, 피하 패치 및 마이크로캡슐화 전달 시스템을 포함한다. 생체분해성, 생체적합성 중합체, 예를 들면, 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드, 폴리글라이콜산, 콜라겐, 폴리오쏘에스터 및 폴리락트산을 사용할 수 있다. 이러한 제제 및 장치를 제조하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들면, 문헌[Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978]을 참조한다.

[0506] 생체분해성 중합체, 예컨대 폴리락타이드-폴리글라이콜라이드 중에 약물의 마이크로캡슐화 매트릭스를 형성함으로써 주사용 데포 제제를 제조할 수 있다. 약물 대 중합체의 비율 및 사용된 중합체의 성질에 따라, 약물 방출 속도는 조절될 수 있다. 다른 예시적인 생체분해성 중합체는 폴리오쏘에스터 및 폴리안하이드라이드이다. 데포 주사용 제제는 또한 리포솜 또는 마이크로에멀션 중에 약물을 포획함으로써 제조될 수 있다.

[0507] 보충 활성 화합물은 상기 조성물로 혼입될 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 또 다른 응고 인자 또는 이들의 변이체, 단편, 유사체 또는 유도체로 제제화된다. 예를 들면, 응고 인자는 V 인자, VII 인자, VIII 인자, IX 인자, X 인자, XI 인자, XII 인자, XIII 인자, 프로트롬빈, 피브리노겐, 폰 빌레브란트 인자 또는 재조합 가용성 조직 인자(rsTF) 또는 임의의 상기의 활성화 형태를 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 지혈제의 응고 인자는 또한 항피브린용해성 약물, 예를 들면, 엡실론-아미노-카프로산, 트라넥삼산을 포함할 수 있다.

[0508] 최적의 원하는 반응을 제공하도록 용량 섭생은 조정될 수 있다. 예를 들면, 단일 볼루스를 투여할 수 있고, 몇몇 분할 용량을 시간에 걸쳐 투여할 수 있거나, 이 용량은 치료학적 상황의 응급상황에 의해 표시된 바대로 비

레하여 감소하거나 증가할 수 있다. 투여 용이성 및 용량 균일성을 위해 용량 단위 형태로 비경구 조성물을 제제화하는 것이 유리하다. 예를 들면, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, Pa. 1980)]을 참조한다.

[0509] 활성 화합물 이외에, 액체 용량 형태는 불활성 성분, 예컨대 물, 에틸 알콜, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알콜, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글라이콜, 1,3-뷰틸렌 글라이콜, 다이메틸폼아마이드, 오일, 글라이세롤, 테트라하이드로푸르푸릴 알콜, 폴리에틸렌 글라이콜 및 소비탄의 지방산 에스터를 포함할 수 있다.

[0510] 적합한 약제학적 담체의 비제한적인 예는 또한 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences by E. W. Martin]에 기재되어 있다. 부형제의 몇몇 예는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 스테아르산나트륨, 글라이세롤 모노스테아레이트, 활석, 염화나트륨, 탈지 분유, 글라이세롤, 프로필렌, 글라이콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 상기 조성물은 또한 pH 완충 시약 및 습윤제 또는 유화제를 포함할 수 있다.

[0511] 경구 투여를 위해, 약제학적 조성물은 종래의 수단에 의해 제조된 정제 또는 캡슐의 형태를 취할 수 있다. 상기 조성물은 또한 액체, 예를 들면 시럽 또는 현탁액으로서 제조될 수 있다. 액체는 현탁제(예를 들면, 솔비톨 시럽, 셀룰로스 유도체 또는 수소화 식용 지방), 유화제(레시틴 또는 아카시아), 비수성 비히클(예를 들면, 아몬드유, 오일 에스터, 에틸 알콜 또는 정제 식물성 오일) 및 보존제(예를 들면, 메틸 또는 프로필-p-하이드록시벤조에이트 또는 소르빈산)를 포함할 수 있다. 상기 제제는 또한 항료, 착색제 및 감미료를 포함할 수 있다. 대안적으로, 상기 조성물은 물 또는 또 다른 적합한 비히클에 의한 구성을 위한 건조 생성물로서 존재할 수 있다.

[0512] 협측 투여를 위해, 상기 조성물은 종래의 프로토콜에 따라 정제 또는 캔디(lozenges)의 형태를 취할 수 있다.

[0513] 흡입에 의한 투여를 위해, 본 발명에 따라 사용하기 위한 화합물은 임의로 추진제(propellant), 예를 들면, 다이클로로다이플루오로메탄, 트라이클로로플루오로메탄, 다이클로로테트라플루오로메탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 가스에 의한, 부형제와 함께 또는 이것 없이, 분무 에어로졸의 형태로 또는 가압 팩 또는 분무기로부터의 에어로졸 스프레이의 형태로 편리하게 전달될 수 있다. 가압 에어로졸의 경우에, 용량 단위는 계량된 양을 전달하도록 밸브를 제공함으로써 전달될 수 있다. 예를 들면, 흡입기 또는 취입기에서 사용하기 위한 젤라틴의 캡슐 및 카트리지는 화합물과 적합한 분말 기제, 예컨대 락토스 또는 전분의 분말을 포함하도록 제제화될 수 있다.

[0514] 약제학적 조성물은 또한 예를 들면 종래의 좌제 기제, 예컨대 코코아 버터 또는 다른 글라이세라이드를 포함하는 좌제 또는 정체 관장으로서 직장 투여를 위해 제제화될 수 있다.

[0515] 일 실시형태에서, 약제학적 조성물은 키메라 단백질, 키메라 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터 또는 벡터를 포함하는 숙주 세포 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 키메라 단백질 내의 FVIII 단백질은 야생형 FVIII 단백질 또는 VWF 단편이 없는 상응하는 FVIII 단백질과 비교하여 연장된 반감기를 갖는다. 일 실시형태에서, FVIII 단백질의 반감기는 야생형 FVIII보다 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 적어도 약 11배 또는 적어도 약 12배 길게 연장된다. 또 다른 실시형태에서, VIII 인자의 반감기는 적어도 약 17시간, 적어도 약 18시간, 적어도 약 19시간, 적어도 약 20시간, 적어도 약 21시간, 적어도 약 22시간, 적어도 약 23시간, 적어도 약 24시간, 적어도 약 25시간, 적어도 약 26시간, 적어도 약 27시간, 적어도 약 28시간, 적어도 약 29시간, 적어도 약 30시간, 적어도 약 31시간, 적어도 약 32시간, 적어도 약 33시간, 적어도 약 34시간, 적어도 약 35시간, 적어도 약 36시간, 적어도 약 48시간, 적어도 약 60시간, 적어도 약 72시간, 적어도 약 84시간, 적어도 약 96시간 또는 적어도 약 108시간이다.

[0516] 몇몇 실시형태에서, 상기 조성물은 국소 투여, 안내 투여, 비경구 투여, 척추강내 투여, 경막하 투여 및 경구 투여로 이루어진 군으로부터 선택된 경로에 의해 투여된다. 비경구 투여는 정맥내 또는 피하 투여일 수 있다.

[0517] 다른 실시형태에서, 상기 조성물은 출혈 질환 또는 병증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 출혈 질환 또는 병증을 치료하기 위해 사용된다. 출혈 질환 또는 병증은 출혈 응고 장애, 관절혈증, 근육 출혈, 구강내 출혈, 출혈, 근육으로의 출혈, 경구 출혈, 외상, 외상 백선, 위장관 출혈, 두개내 출혈, 복강내 출혈, 흉내 출혈, 골절, 중추 신경계 출혈, 인두후강에서의 출혈, 복막강에서의 출혈, 장요근초에서의 출혈 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시형태에서, 대상체는 수술 예정이다. 또 다른 실시형태에서, 치료는 예방학적 또는 수요대응형이다.

[0518] **유전자 치료**

[0519] 본 발명의 키메라 단백질은 치료학적으로 유리한 출혈 응고 장애, 관절혈증, 근육 출혈, 구강내 출혈, 출혈, 근육으로의 출혈, 경구 출혈, 외상, 외상 백선, 위장관 출혈, 두개내 출혈, 복강내 출혈, 흉내 출혈, 골절, 중추신경계 출혈, 인두후강에서의 출혈, 복막강에서의 출혈 및 장요근초에서의 출혈로 이루어진 군으로부터 선택된 출혈 질환 또는 장애의 치료에 대한 유전자 치료 접근법을 이용하여 포유동물, 예를 들면, 인간 환자에서 생체내 생성될 수 있다. 일 실시형태에서, 출혈 질환 또는 장애는 혈우병이다. 또 다른 실시형태에서, 출혈 질환 또는 장애는 A형 혈우병이다. 이는 적합한 발현 조절 서열에 작동적으로 연결된 적합한 키메라 단백질 코딩 핵산의 투여를 수반한다. 소정의 실시형태에서, 이 서열은 바이러스 벡터로 편입된다. 이러한 유전자 치료에 적합한 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 바큘로바이러스 벡터, 엡스테인 바 바이러스 벡터, 유두종 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 단순 포진 바이러스 벡터 및 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터를 포함한다. 바이러스 벡터는 복제 결함 바이러스 벡터일 수 있다. 다른 실시형태에서, 아데노바이러스 벡터는 이의 E1 유전자 또는 E3 유전자에서의 결실을 갖는다. 아데노바이러스 벡터를 사용할 때, 포유동물은 선택 가능한 마커 유전자를 코딩하는 핵산에 노출되지 않을 수 있다. 다른 실시형태에서, 상기 서열은 당해 분야의 당업자에게 공지된 비바이러스 벡터로 편입된다.

[0520] **키메라 단백질의 사용 방법**

[0521] 본 발명은 FVIII 단백질에 대한 내인성 VWF 결합을 방지하거나 억제하기 위해 본 명세서에 기재된 키메라 단백질을 사용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 Ig 불변 구역 또는 이의 일부 및 XTEN에 연결된 FVIII 단백질을 갖는 키메라 단백질의 사용 방법에 관한 것이다.

[0522] 본 발명의 일 양상은 내인성 VWF로부터 FVIII 상의 VWF 결합 자리를 차단하거나 차폐함과 동시에 Ig 불변 구역 또는 이의 일부(또한 반감기 연장제일 수 있음)와 조합하여 XTEN 서열을 사용하여 FVIII 단백질의 반감기를 연장함으로써 내인성 VWF와의 FVIII 상호작용을 방지하거나 억제하는 방법에 관한 것이다. 일 실시형태에서, 본 발명은 야생형 FVIII보다 반감기가 긴 FVIII 단백질을 작제하는 방법에 관한 것이다. 일 실시형태에서, XTEN 서열은 키메라 단백질에서 FVIII 단백질과 내인성 VWF와의 상호작용을 억제하거나 방지한다. 또 다른 실시형태에서, Ig 불변 구역 또는 이의 일부는 FVIII 단백질과 내인성 VWF와의 상호작용을 억제하거나 방지한다. 상기 방법에서 유용한 키메라 단백질은 본 명세서에 기재된 임의의 하나 이상의 키메라 단백질을 포함한다.

[0523] 본 발명의 또 다른 양상은 야생형 FVIII보다 반감기가 긴 FVIII 단백질을 포함하는 키메라 단백질을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 방법을 포함하되, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 키메라 단백질을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0524] 일 실시형태에서, 본 발명은 FVIII 단백질과의 내인성 VWF 상호작용을 방지하거나 억제하기 위해 FVIII 단백질 및 VWF 단편의 반감기를 연장시키도록 XTEN 서열 및 Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 사용하는 방법에 관한 것이다. XTEN 서열에 연결되고(예를 들면, FVIII(X)) 이후 VWF 단편에 결합되거나 이것과 회합된 FVIII 단백질은 VWF의 청소 경로로부터 차폐되거나 보호되어 VWF 단편에 결합하지 않은 FVIII 단백질과 비교하여 감소된 청소를 갖는다. 차폐된 FVIII 단백질은 따라서 XTEN 서열 및 VWF 단편에 결합되거나 이것과 회합되지 않은 FVIII 단백질과 비교하여 최대 반감기 연장을 갖는다. 소정의 실시형태에서, VWF 단편과 회합되거나 이에 의해 보호되고 XTEN 서열에 연결된 FVIII 단백질은 VWF 청소 수용체에 의해 청소되지 않는다. 다른 실시형태에서, VWF 단편과 회합되거나 이에 의해 보호되고 XTEN 서열에 연결된 FVIII 단백질은 VWF 단편과 회합되거나 이에 의해 보호되지 않고 XTEN 서열에 연결되지 않은 FVIII 단백질보다 느리게 시스템으로부터 청소된다.

[0525] 일 양상에서, XTEN 서열에 연결된 FVIII 단백질 또는 XTEN에 연결된 VWF 단편에 연결되거나 이것과 회합된 FVIII 단백질을 포함하는 키메라 단백질은, VWF 단편이 VWF 청소 수용체 결합 자리를 포함하지 않으므로, 순환으로부터 감소된 청소를 갖는다. VWF 단편은 VWF 청소 경로를 통해 시스템으로부터 VWF 단편에 결합되거나 이것과 회합된 FVIII의 청소를 방지하거나 억제한다. 본 발명에 유용한 VWF 단편은 또한 내인성 VWF에 의해 제공된 적어도 하나 이상의 VWF 유사 FVIII 보호 특성을 제공할 수 있다. 소정의 실시형태에서, VWF 단편 또는 XTEN 서열은 또한 하나 이상의 FVIII 청소 수용체 결합 자리를 가려서, 그 자체의 청소 경로에 의해 FVIII의 청소를 방지할 수 있다.

[0526] 몇몇 실시형태에서, VWF 단편 또는 XTEN 서열에 의한 내인성 VWF에 대한 FVIII 단백질 결합의 방지 또는 억제는 *실험실내* 또는 *생체내* 일 수 있다.

[0527] 본 명세서에 기재된 키메라 단백질을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 FVIII 단백질의

반감기를 증가시키는 방법이 또한 제공된다. 전장 VWF에 결합하거나 이것과 회합된 비활성화 FVIII의 반감기는 혈장 내 약 12 내지 14시간이다. 순환 시 VWF가 거의 없는 VWD 3형에서, FVIII의 반감기는 불과 약 6시간이어서, FVIII의 농도 감소로 인해 이러한 환자에서 경증 내지 중등도의 A형 혈우병의 증상을 발생시킨다. 본 발명의 VWF 단편 또는 XTEN 서열에 연결되거나 이것과 회합된 FVIII 단백질의 반감기는 전장 VWF에 결합하거나 이것과 회합된 비활성화 FVIII의 반감기보다 적어도 약 1.5배, 1.6배, 1.7배, 1.8배, 1.9배, 2.0배, 2.1배, 2.2배, 2.3배, 2.4배, 2.6배, 2.7.배, 2.8배, 2.9배, 3.0배, 3.1배, 3.2배, 3.3배, 3.4배, 3.5배, 3.6배, 3.7배, 3.8배, 3.9배 또는 4.0배 증가할 수 있다.

[0528] 일 실시형태에서, XTEN 서열을 포함하는 키메라 단백질에서 VWF 단편에 연결되거나 이것과 회합된, 또는 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 연결된 FVIII 단백질의 반감기는 전장 VWF에 결합되거나 이것과 회합된 비활성화 FVIII의 반감기보다 적어도 약 2배, 2.5배, 3.0배, 3.5배, 4.0배, 4.5배, 5.0배, 5.5배, 6.0배, 7배, 8배, 9배 또는 10배 증가한다. 또 다른 실시형태에서, XTEN 서열을 포함하는 키메라 단백질에서 VWF 단편 또는 Ig 불변 구역 또는 이의 일부에 연결되거나 이것과 회합된 FVIII 단백질의 반감기는 전장 VWF에 결합되거나 이것과 회합된 비활성화 FVIII 또는 야생형 FVIII보다 약 2배 내지 약 5배, 약 3배 내지 약 10배, 약 5배 내지 약 15배, 약 10배 내지 약 20배, 약 15배 내지 약 25배, 약 20배 내지 약 30배, 약 25배 내지 약 35배, 약 30배 내지 약 40배, 약 35배 내지 약 45배 증가한다. 특정한 실시형태에서, XTEN 서열을 포함하는 키메라 단백질에서 VWF 단편에 연결되거나 이것과 회합된, 또는 Ig 불변 구역에 연결된 FVIII 단백질의 반감기는 FVIII 및 VWF 이중 넉아웃 마우스에서의 야생형 FVIII의 반감기보다 적어도 약 30배, 31배, 32배, 33배, 34배, 35배, 36배, 37배, 38배, 39배 또는 40배 증가한다.

[0529] 몇몇 실시형태에서, 제1 Ig 불변 구역 또는 이의 일부, 예를 들면, 제1 Fc 구역 및 XTEN 서열에 융합된 VWF 단편, 및 XTEN 서열에 연결된 FVIII 단백질 및 제2 Ig 불변 구역 또는 이의 일부, 예를 들면, 제2 Fc 구역을 포함하는 키메라 단백질의 반감기는 내인성 VWF와 회합된 FVIII의 반감기보다 길다. 다른 실시형태에서, 키메라 단백질의 반감기는 야생형 FVIII 또는 내인성 VWF와 회합된 FVIII 단백질의 반감기보다 적어도 약 1.5배, 2배, 2.5배, 3.5배, 3.6배, 3.7배, 3.8배, 3.9배, 4.0배, 4.5배 또는 5.0배이다.

[0530] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 결과로서, FVIII 단백질의 반감기는 VWF 단편이 없는 FVIII 단백질 또는 야생형 FVIII과 비교하여 연장된다. 본 발명의 키메라 단백질의 반감기는 VWF 단편이 없는 FVIII 단백질 또는 야생형 FVIII의 반감기보다 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 적어도 약 2.5배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 6배, 적어도 약 7배, 적어도 약 8배, 적어도 약 9배, 적어도 약 10배, 적어도 약 11배 또는 적어도 약 12배 길다. 일 실시형태에서, FVIII의 반감기는 야생형 FVIII의 반감기보다 약 1.5배 내지 약 20배, 약 1.5배 내지 약 15배 또는 약 1.5배 내지 약 10배 길다. 또 다른 실시형태에서, FVIII의 반감기는 야생형 FVIII 또는 VWF 단편이 없는 FVIII 단백질과 비교하여 약 2배 내지 약 10배, 약 2배 내지 약 9배, 약 2배 내지 약 8배, 약 2배 내지 약 7배, 약 2배 내지 약 6배, 약 2배 내지 약 5배, 약 2배 내지 약 4배, 약 2배 내지 약 3배, 약 2.5배 내지 약 10배, 약 2.5배 내지 약 9배, 약 2.5배 내지 약 8배, 약 2.5배 내지 약 7배, 약 2.5배 내지 약 6배, 약 2.5배 내지 약 5배, 약 2.5배 내지 약 4배, 약 2.5배 내지 약 3배, 약 3배 내지 약 10배, 약 3배 내지 약 9배, 약 3배 내지 약 8배, 약 3배 내지 약 7배, 약 3배 내지 약 6배, 약 3배 내지 약 5배, 약 3배 내지 약 4배, 약 4배 내지 약 6배, 약 5배 내지 약 7배 또는 약 6배 내지 약 8배 연장된다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질의 반감기는 적어도 약 17시간, 적어도 약 18시간, 적어도 약 19시간, 적어도 약 20시간, 적어도 약 21시간, 적어도 약 22시간, 적어도 약 23시간, 적어도 약 24시간, 적어도 약 25시간, 적어도 약 26시간, 적어도 약 27시간, 적어도 약 28시간, 적어도 약 29시간, 적어도 약 30시간, 적어도 약 31시간, 적어도 약 32시간, 적어도 약 33시간, 적어도 약 34시간, 적어도 약 35시간, 적어도 약 36시간, 적어도 약 48시간, 적어도 약 60시간, 적어도 약 72시간, 적어도 약 84시간, 적어도 약 96시간 또는 적어도 약 108시간이다. 또 다른 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질의 반감기는 약 15시간 내지 약 2주, 약 16시간 내지 약 1주, 약 17시간 내지 약 1주, 약 18시간 내지 약 1주, 약 19시간 내지 약 1주, 약 20시간 내지 약 1주, 약 21시간 내지 약 1주, 약 22시간 내지 약 1주, 약 23시간 내지 약 1주, 약 24시간 내지 약 1주, 약 36시간 내지 약 1주, 약 48시간 내지 약 1주, 약 60시간 내지 약 1주, 약 24시간 내지 약 6일, 약 24시간 내지 약 5일, 약 24시간 내지 약 4일, 약 24시간 내지 약 3일 또는 약 24시간 내지 약 2일이다.

[0531] 몇몇 실시형태에서, 대상체마다 본 발명의 키메라 단백질의 평균 반감기는 약 15시간, 약 16시간, 약 17시간, 약 18시간, 약 19시간, 약 20시간, 약 21시간, 약 22시간, 약 23시간, 약 24시간(1일), 약 25시간, 약 26시간, 약 27시간, 약 28시간, 약 29시간, 약 30시간, 약 31시간, 약 32시간, 약 33시간, 약 34시간, 약 35시간, 약 36시간, 약 40시간, 약 44시간, 약 48시간(2일), 약 54시간, 약 60시간, 약 72시간(3일), 약 84시간, 약 96시

간(4일), 약 108시간, 약 120시간(5일), 약 6일, 약 7일(1주), 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일 또는 약 14일이다.

[0532] 또한, 본 발명은 유효량의 키메라 단백질을 투여하는 단계를 포함하는 출혈 질환 또는 장애를 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다. 일 실시형태에서, 출혈 질환 또는 장애는 출혈 응고 장애, 관절혈증, 근육 출혈, 구강내 출혈, 출혈, 근육으로의 출혈, 경구 출혈, 외상, 외상 백선, 위장관 출혈, 두개내 출혈, 복강내 출혈, 흉내 출혈, 골절, 중추 신경계 출혈, 인두후강에서의 출혈, 복막강에서의 출혈 및 장요근초에서의 출혈로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정한 실시형태에서, 출혈 질환 또는 장애는 A형 혈우병이다.

[0533] XTEN 서열 및 Ig 불변 구역 또는 이의 일부를 포함하는 키메라 단백질은, 본 발명에 의해 제조된 내인성 VWF와의 FVIII 단백질의 상호작용을 방지하거나 억제하는 본 명세서에 기재된 VWF 단편과 조합하여, 지혈 장애를 앓는 대상체를 치료하는 방법 및 일반 지혈제를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법(이들로 제한되지는 않음)을 포함하는, 당해 분야의 당업자가 인식하는 것처럼 많은 용도를 갖는다. 일 실시형태에서, 본 발명은 치료학적 유효량의 키메라 단백질을 투여하는 단계를 포함하는 지혈 장애를 앓는 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0534] 키메라 단백질 내의 FVIII 단백질 부분은 음으로 하전된 인지질 표면 상의 IX 인자에 대한 보조인자로서 작용하여, Xase 복합체를 형성함으로써 지혈 장애를 치료하거나 예방한다. 인지질 표면에 대한 활성화 응고 인자의 결합은 이 처리를 혈관 손상 자리로 편재화한다. 인지질 표면에서, VIIIa 인자는 대략 200,000배로 IXa 인자에 의한 X 인자 활성화의 최대 속도를 증가시켜, 트롬빈 생성의 큰 제2 폭발을 발생시킨다.

[0535] 본 발명의 키메라 단백질은 임의의 지혈 장애를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 키메라 단백질의 투여에 의해 치료될 수 있는 지혈 장애는 A형 혈우병, 및 VIII 인자와 관련된 결핍증 또는 구조 이상을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 일 실시형태에서, 지혈 장애는 A형 혈우병이다.

[0536] 본 발명의 키메라 단백질은 지혈 장애를 앓는 대상체를 예방학적으로 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 키메라 단백질은 지혈 장애를 앓는 대상체에서 급성 출혈 삽화를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 지혈 장애는 결함 있는 응고 인자, 예를 들면, 폰 빌레브란트 인자의 결과일 수 있다. 일 실시형태에서, 지혈 장애는 유전적 장애이다. 또 다른 실시형태에서, 지혈 장애는 후천성 장애이다. 후천성 장애는 기초하는 2차 질환 또는 병증으로부터 생길 수 있다. 관련 없는 병증은 예로서(그러나 제한은 아님) 자가면역 질환 또는 임신일 수 있다. 후천성 장애는 고령 또는 기초하는 2차 장애를 치료하기 위한 약제(예를 들면, 암 화학치료제)로부터 생길 수 있다.

[0537] 본 발명은 또한 선천성 지혈 장애를 앓지 않지만, 2차 질환 또는 병증을 가져 예를 들면 항-FVIII 항체 발생 또는 수술로 인해 지혈 장애를 얻은 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 따라서 본 방법에 의해 제조된 치료학적 유효량의 키메라 단백질을 투여하는 단계를 포함하는 일반 지혈제를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0538] 본 발명은 또한 유효량의 본 명세서에 기재된 키메라 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 투여하는 단계를 포함하는 FVIII의 면역원성을 감소시키거나 FVIII에 대해 더 적은 면역원성을 유도하는 방법에 관한 것이다.

[0539] 일 실시형태에서, 일반 지혈제를 필요로 하는 대상체는 수술을 겪었거나 수술 예정이다. 본 발명의 키메라 단백질은 예방학적 섭생으로서 수술 전에, 수술 동안에 또는 수술 후에 투여될 수 있다. 본 발명의 키메라 단백질은 급성 출혈 삽화를 조절하기 위해 수술 전에, 수술 동안에 또는 수술 후에 투여될 수 있다.

[0540] 본 발명의 키메라 단백질은 지혈 장애를 앓지 않는 급성 출혈 삽화를 갖는 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있다. 급성 출혈 삽화는 중증 외상, 예를 들면, 수술, 자동차 사고, 상처, 열상 총 발사 또는 비조절 출혈을 발생시키는 임의의 다른 외상 사건으로부터 생길 수 있다. 출혈 삽화의 비제한적인 예는 출혈 응고 장애, 관절혈증, 근육 출혈, 구강내 출혈, 출혈, 근육으로의 출혈, 경구 출혈, 외상, 외상 백선, 위장관 출혈, 두개내 출혈, 복강내 출혈, 흉내 출혈, 골절, 중추 신경계 출혈, 인두후강에서의 출혈, 복막강에서의 출혈, 장요근초에서의 출혈 및 이들의 임의의 조합을 포함한다.

[0541] 예방학적 용도에서, 본 발명의 키메라 단백질 또는 이의 칵테일을 포함하는 하나 이상의 조성물은 환자의 내성을 증대시키거나 질환 또는 장애와 관련된 증상을 감소시키기 위해 질환 상태에 이미 있지 않은 환자에게 투여된다. 이러한 양은 "예방학적 유효량"이라 정의된다. 치료학적 용도에서, 비교적 짧은 간격의 비교적 높은 용량(예를 들면, 1용량당 약 1 내지 400㎎/㎏의 폴리펩타이드, 5㎎ 내지 25㎎의 용량이 방사선면역 접합체의 경우 더 흔히 사용되고, 세포독소-약물 변형 폴리펩타이드의 경우 더 높은 용량이 더 흔히 사용됨)이 질환의 진행이

감소하거나 종료될 때 및 환자가 질환의 증상의 부분 또는 완전 경감을 나타낼 때 때때로 필요하다. 이후, 환자에게 예방학적 섭생이 투여될 수 있다.

[0542] 몇몇 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질 또는 조성물은 수요대응형 치료에 사용되고, 이는 출혈 삽화, 관절혈증, 근육 출혈, 구강내 출혈, 출혈, 근육으로의 출혈, 경구 출혈, 외상, 외상 백선(두부 외상), 위장관 출혈, 두개내 출혈, 복강내 출혈, 흉내 출혈, 골절, 중추 신경계 출혈, 인두후강에서의 출혈, 복막강에서의 출혈 또는 장요근초에서의 출혈에 대한 치료를 포함한다. 대상체는 수술적 예방, 수술 전후 관리 또는 수술을 위한 치료를 필요로 할 수 있다. 이러한 수술은 예를 들면 소수술, 대수술, 발치, 편도선 수술, 서혜부 헤르니아 절제술(inguinal herniotomy), 활액막절제술, 슬관절 전치환술, 개두술, 골접합술, 외상 수술, 두개내 수술, 복강내 수술, 흉내 수술 또는 관절 대체 수술을 포함한다.

[0543] 일 실시형태에서, 본 발명의 키메라 단백질은 정맥내, 피하로, 근육내 또는 임의의 점막 표면을 통해, 예를 들면, 경구로, 설하로, 협측으로, 비강으로, 직장으로, 질내로 또는 폐 경로를 통해 투여된다. 본 발명의 VWF 단편 및 FVIII 단백질을 포함하는 키메라 단백질은 출혈 자리로의 키메라 단백질의 서방 방출을 허용하는 생물중합체 고체 지지체 내에 이식되거나 이에 연결되거나, 붕대/드레싱으로 이식될 수 있다. 키메라 단백질의 용량은 대상체 및 특정한 사용되는 투여 경로에 따라 변할 것이다. 용량은 0.1 내지 100,000㎍/kg(체중) 범위일 수 있다. 일 실시형태에서, 용량 범위는 0.1-1,000㎍/kg이다. 또 다른 실시형태에서, 용량 범위는 0.1-500㎍/kg이다. 단백질은 연속적으로 또는 특정 시간 간격으로 투여될 수 있다. 투여를 위한 최적 용량 범위 및/또는 스케줄을 결정하기 위해 *실험실내* 검정을 이용할 수 있다. 응고 인자 활성을 측정하는 *실험실내* 검정, 예를 들면, STA-CLOT VIIa-rTF 응고 검정 또는 로템 응고 검정은 당해 분야에 공지되어 있다. 추가로, 유효량은 동물 모델, 예를 들면, 혈우병 개로부터 얻은 용량-반응 곡선으로부터 외삽될 수 있다(Mount *et al.* 2002, *Blood* 99(8):2670).

[0544] 본 발명이 이제 자세히 기재되었지만, 하기 실시예를 참조하여 본 발명은 더 명확히 이해될 것이고, 하기 실시예는 단지 예시 목적을 위해 포함되고 본 발명의 제한으로 의도되지 않는다. 본 명세서에 인용된 모든 특허, 공보 및 논문은 본 명세서에 참조문헌으로 명확히 및 구체적으로 포함된다.

[0545] 실시예

[0546] 실시예에 걸쳐, 달리 기재되지 않은 한, 하기 재료 및 방법을 이용하였다.

[0547] 재료 및 방법

[0548] 일반적으로, 본 발명의 실행은, 달리 기재되지 않은 한, 화학, 생물물리학, 분자 생물학, 재조합 DNA 기술, 면역학(특히, 예를 들면, 항체 기술)의 종래의 기법 및 전기영동에서의 표준 기법을 이용한다. 예를 들면, 문헌 [Sambrook, Fritsch and 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, Ed., Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow *et al.*, CS.H.L. Press, Pub. (1999); 및 Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons (1992)]을 참조한다.

[0549] 실시예 1: 클로닝 상이한 VWF 도메인(도 1)

[0550] (a) pSYN-VWF-002의 클로닝

[0551] pSYN-VWF-002는 서열 번호 100의 1-477번 아미노산인 VWF 단편을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. [VWF-D'D3 단백질 서열] 아미노산 넘버링은 프로펩타이드가 없는 성숙 VWF 서열을 나타내고, 서열 번호 2의 764-1240번 아미노산에 상응한다. pSYN-VWF-002 작제물은 N 말단에서 FVIII 신호 펩타이드(합성된 단백질의 적절한 분비를 허용함) 및 이어서 C 말단에서 6xHis 태그(단백질 정제를 위해 사용됨)를 갖는다. 이를 하기 프라이머 조합을 이용하여 합성하였다:

[0552] VIII 신호 및 BsiW1 자리를 갖는 ESC48 - Fwd - VWF - D'D3

[0553] TCGCGACGTACGGCCGCCACCATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGCCTATCCTGTCGGCCCCCCATG (서열 번호 90)

[0554] 6His 및 Not 1 자리를 갖는 ESC51 - Rev - VWF D'D3(1-477개의 아미노산) TGACCTCGAGCGGCCGCTCAGTGGTGATGGTGATGATGCGGCTCCTGGCAGGCTTCACAGGTGAGGTTGACAAC(서열 번호 91)

[0555] 94℃ 2분; (96℃ 30초, 68℃ 2분)의 21회 사이클의 2 단계 PCR 증폭 사이클을 이용하여 주형으로서 전장 VWF 플라스미드 및 ESC 48/ESC 51 프라이머 조합으로 50㎕의 PCR 반응을 수행하였다. 1460bp 밴드를 겔 추출 키트(퀴아젠(Qiagen)(캘리포니아주 발렌시아))로 겔 정제하고, pcDNA 4의 BsiWI 및 Not1 제한 자리로 클로닝하여 pSYN-VWF 002를 생성시켰다.

[0556] (b) pSYN-VWF-010 및 013의 클로닝

[0557] pSYN-VWF-008 및 pSYN-VWF-002를 사용하여 pSYN-VWF-010을 작제하였다. pSYN-VWF-008은 pcDNA 3.1 내에 전장 VWF 서열(서열 번호 2의 1-2813번 아미노산)을 포함하고, 이는 763개의 아미노산 프로펩타이드(즉, D1D2 도메인), 이어서 성숙 VWF의 남은 2050개의 아미노산 서열을 포함한다. pSYN-VWF-002 내의 FVIII 신호 펩타이드를 pSYN-VWF-008로부터의 D1D2 도메인으로 대체하고, 생성된 작제물은 pSYN-VWF-010이다. pSYN-VWF-008은 (중지 코돈 후) Arg907에서 BamH1 자리 및 코딩 구역의 말단에서 Not1 자리를 갖는다. pSYN-VWF-008 및 002를 BamH1 및 Not1 제한 효소로 분해하였다. pSYN-VWF-002로부터의 삽입체(1026bp)를 bamH1/Not1 분해 pSYN-VWF-008(8242bp)에 결찰하여 pSYN-VWF-010(D1D2D'D3: 서열 번호 2의 1-1240번 아미노산)을 얻고, 6xHis 태그를 또한 C 말단에서 첨가하였다. 형질전환된 세포에서, pSYN-VWF-010을 프로펩타이드로 합성하였지만, 세포내 처리로 인해 분비된 생성물은 임의의 프로펩타이드(D1D2)를 포함하지 않는다. VWF-010으로부터의 단백질은 이합체로서 존재한다.

[0558] 100번 서열 번호(아미노산 넘버링은 D1D2 도메인-VWF 서열 2가 없는 성숙 VWF 서열을 나타냄)에 상응하는 C336A 및 C379A에서 2개의 점 돌연변이를 갖는 pSYN-VWF-013을 생성하도록 pSYN-VWF-010을 사용하였다. 이 돌연변이는 VWF D'D3 도메인의 이합체화를 방지하는 것으로 예상된다.

[0559] (c) pSYN-VWF-025 및 pSYN-VWF-029의 클로닝

[0560] pSYN-VWF-025는 pLIVE 벡터 내에 전장 VWF의 야생형 D1D2D'D3 서열을 포함하고, pSYN-VWF-029는 C336A 및 C379A 돌연변이를 갖는 D1D2D'D3 서열을 포함한다. pSYN-VWF-025를 클로닝하기 위해, 하기 프라이머 조합을 이용하였다:

[0561] Nhe1 자리를 갖는 ESC 89-fwd = CTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCCG(서열 번호 92)

[0562] Sal1을 갖는 ESC 91-rev = CTGGATCCCGGGAGTCGACTCGTCAGTGGTGATGGTGATGATG(서열 번호 93)

[0563] 94℃ 2분; (96℃ - 30초, 55℃ - 30초, 68℃ - 4분)의 21회 사이클의 3 단계 PCR 증폭 사이클을 이용하여 주형으로서 pSYN-VWF 010(pSYN-VWF-025의 경우) 또는 pSYN-VWF 013(pSYN-VWF-029의 경우) 플라스미드 및 ESC 89/ESC91 프라이머 조합으로 50㎕의 PCR 반응을 수행하였다. 예상된 크기 밴드(약 3800bp)를 겔 추출 키트(퀴아젠(캘리포니아주 발렌시아))로 겔 정제하고, pLIVE-미러스(Mirus) 벡터(인비트로겐(캘리포니아주 칼스바드))의 Nhe1 및 Sal1 제한 자리로 클로닝하여 pSYN-VWF 025 및 029를 생성시켰다.

[0564] (d) pSYN-VWF-031의 클로닝

[0565] pSYN-VWF-031은 VWF D1D2D'D3(C336A/C379A)과 Fc 서열 사이에서 48개의 아미노산 길이의 트롬빈 개열 가능한 링커(8x GGGGS(서열 번호 94) + 트롬빈 자리)를 갖는 D1D2D'D3(C336A/C379A)-Fc 작제물이다. 이 작제물을 제조하기 위해, pSYN-FVIII-064 작제물(하기 FVIII-VWF 작제물을 지칭)로부터 VWF-Fc 구역을 증폭시켰다. pSYN-FVIII-VWF를 Xba1 및 Nhe1로 분해하였다. 프라이머 조합 LW 22/LW23에 의해 VWF 및 Fc 구역을 증폭시키기 위한 주형으로서 VWF 단편 및 Fc 구역을 포함하는 4165bp의 생성된 삽입 구역을 사용하였다.

[0566] FVIII 신호 서열 및 BsiW1 자리를 갖는 LW 22-FWD-VWF-D'D3

[0567] GCGCCGGCCGTACGATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGCCTATCCTGTCGGCCCCCCATG(서열 번호 95)

[0568] 중지 코돈 및 Not1 자리를 갖는 LW 23-Rev-Fc

[0569] TCATCAATGTATCTTATCATGTCTGAATTCGCGGCCGCTCATTTACC(서열 번호 96)

[0570] LW22/LW23 증폭으로부터 얻은 PCR 생성물(약 2300bp)을 BsiW1/Not1 분해된 pSYN-VWF-002에서 클로닝하여 pSYN-VWF-014 중간체를 얻었다. pSYN-VWF-014는 FVIII 신호 펩타이드-D'D3-20개의 아미노산 트롬빈 개열 가능한 링커, 이어서 Fc 구역을 포함한다.

[0571] D1D2D'D3-Fc 작제물을 생성하기 위해, 표준 PCR 방법에 의해 프라이머 조합 LW24/LW27을 사용하여 pSYN-VWF-

013으로부터 D1D2D'D3 구역을 증폭하였다.

[0572] BsiW1 자리를 갖는 LW24-Fwd-VWF D1D2D'D3 클로닝 올리고물

[0573] GCGCCGGCCGTACGATGATTCCTGCCAGATTTGCCGGGGTG(서열 번호 97)

[0574] EcoRV를 갖는 LW27-Rev-VWF D'D3 올리고물

[0575] CCACCGCCAGATATCGGCTCCTGGCAGGCTTCACAGGTGAG(서열 번호 98)

[0576] LW22/LW23 증폭으로부터 얻은 PCR 생성물(약 3750bp)을 BsiW1/EcoRV 분해된 pSYN-VWF-014에서 클로닝하여 pSYN-VWF-015 중간체를 얻었다. VWF 단편과 Fc 구역 사이의 링커 길이를 변경하여 pSYN-VWF-031을 얻었다.

VWF-D1D2D'D3 단백질 서열 1 (서열 번호 99)

```
      1   MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS
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   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 IQLPLLKGDL RIQHTVTASV
      RLSYGEDLQM
    501   DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG
      LAEPRVEDFG
    551   NAWKLHGDCQ DLQKQHSDPC 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 HQGKEYAPGE
      TVKIGCNTCV
    851   CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ
      YVLVQDYCGS
    901   NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE
      VNVKRPMKDE
    951   THFEVVESGR YIILLLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE
      KVCGLCGNFD
   1001   GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD
      SSPATCHNNI
   1051   MKQTMVDSSC RILTSDVFQD CNKLVDPEPY LDVCIYDTCS
      CESIGDCACF
   1101   CDTIAAYAHV CAQHGKVVTW RTATLCPQSC EERNLRENGY
      ECEWRYNSCA
   1151   PACQVTCQHP EPLACPVQCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC
      VDPEDCPVCE
   1201   VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP*
```

[0577]

VWF-D'D3 단백질 서열 2 (서열 번호 100)

```
  1  SLSCRPPMVK LVCPADNLRA EGLECTKTCQ NYDLECMSMG
 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  HGKVVTWRTA TLCPQSCEER NLRENGYECE WRYNSCAPAC
 QVTCQHPEPL
401  ACPVQCVEGC HAHCPPGKIL DELLQTCVDP EDCPVCEVAG
 RRFASGKKVT
451  LNPSDPEHCQ ICHCDVVNLT CEACQEP
```

[0578]

[0579] 실시예 2: FVIII 반감기 연장에 대한 D'D3 및 XTEN 융합의 효과

[0580] rFVIII-XTEN 융합 단백질에 대한 D'D3 FVIII 반감기 연장 가능성을 평가하기 위해, VWF D'D3 이합체를 이의 상응하는 DNA 작제물 VWF-025의 유체역학 주사에 의해 FVIII-VWF DKO 마우스에 도입하였다(실시예 1). D'D3이 정상 상태 발현에 도달한 후(주사 후 5일), 200IU/kg 용량으로 IV 주사에 의해 rFVIII-XTEN의 단일 용량을 투여하였다. 혈액 샘플을 rFVIII-XTEN 투약 후 최대 120 시간에 수집하였다. 혈장 FVIII 활성을 FVIII 발색 검정에 의해 평가하였다. D'D3 발현 수준을 VWF ELISA에 의해 측정하고, 윈논린 프로그램을 이용하여 rFVIIIFc PK 프로필을 분석하였다.

[0581] 연구 결과는 도 2에 도시되어 있고, 순환 시 D'D3이 있는/없는 rFVIII-XTEN의 PK 매개변수가 표 16에 기재되어 있다. D'D3 이합체는 rFIII-XTEN $t_{1/2}$를 3.4시간으로부터 17.8시간으로 5배 증가로 추가로 연장시켰다. 반감기 이외에, MRT의 5배 증가, AUC의 3.6배 증가, 청소의 3.8배 증가를 또한 관찰하였다.

[0582] 본 발명자들은 D'D3 단편 및 XTEN 기술의 상승 효과를 관찰하였고, 일련의 FVIII/VWF/XTEN 작제물을 혈우병성 동물에서 이의 FVIII 반감기 연장 가능성에 대해 평가하였다.

표 16

혈액 순환에서 D'D3이 있는/없는 rFVIII-XTEN PK 매개변수

처리	5분 회수 (%)	$t_{1/2}$ (hr)	MRT (hr)	Cl (mL/hr/kg)	Vss (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
개선 배수	1.1	5.2	5.1	3.8	0.9	3.6

[0583]

[0584] FVIII-XTEN의 단백질 정제

[0585] 이 연구를 위해 AE288 XTEN을 BDD-FVIII의 C 말단에서 삽입하였다. 이 단백질을 정제하기 위해, 순화 배지를 완충제 교환하도록 처음에 접선 유동 여과(TFF) 단계를 이용하였다. 이후, 여과액에서의 생성물을 강음이온 교환 크로마토그래피를 이용하여 포획하고, 이후 친화도 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제하였다. 분자의 순도는 HPLC-SEC에 의해 허용되고, 웨스턴 블로팅에 의해 추가로 확인되었다. 분자의 비활성은, aPTT 검정 및 ELISA에 의해 측정될 때, B 도메인 결실 FVIII에 필적하였다.

[0586] FVIII 발색 검정

[0587] FVIII 활성을 다이아파마(DiaPharma)(롯트 N089019호)로부터의 코아테스트(COATEST) SP FVIII 키트를 사용하여 측정하고, 모든 배양을 진탕시키면서 37℃ 플레이트 가열기에서 수행하였다.

[0588] rFVIII 표준품의 범위는 100mIU/㎖ 내지 0.78mIU/㎖이었다. 혼주된 정상 인간 혈장 검정 대조군 및 혈장 샘플(1X 코아테스트 완충제로 희석됨)을 2회(25㎕/웰) 이뮬론(Immulon) 2HB 96웰 플레이트에 첨가하였다. 새로 제조된 IXa/FX/인지질 혼합물(50㎕), 25㎕의 25mM CaCl2 및 50㎕의 FXa 기질을 각각의 첨가 사이에 5분 항온처리하면서 각각의 웰에 첨가하였다. 기질과 항온처리한 후, 25㎕의 20% 아세트산을 색상 반응을 종료시키기 위해 첨가하고, OD405의 흡광도를 스펙트라맥스(SpectraMAX) 플러스(모레큘러 디바이시스(Molecular Devices)) 장치로 측정하였다. 데이터를 소프트맥스 프로(SoftMax Pro) 소프트웨어(버전 5.2)로 분석하였다. 정량화의 최저 수준(LLOQ)은 7.8mIU/㎖이다.

[0589] VWF ELISA:

[0590] 염소 항-인간 VWF 항체(친화도 정제, 친화도 생물학적, GAVWF-AP)를 0.5㎍/웰에서 포획 항체로서 사용하였고, VWF-EIA-D(어피니트 바이올로지컬스(Affinity Biologicals), VWF-EIA-D, 1:100 희석)를 VWF ELISA에 대한 검출 항체로서 사용하였다. ELISA 검정을 표준 ELISA 절차에 따라 수행하고, TMB를 HRP 기질로서 사용하고, PBST/1.5%의 BSA/0.5M의 NaCl 완충제를 차단 및 결합 완충제로서 사용하였다. 검정 표준 범위는 100ng 내지 0.78ng이고, 검정의 정량화의 최저 수준(LLOQ)은 7.8ng/㎖이다.

[0591] 실시예 3: FVIII/VWF 작제물을 포함하는 XTEN의 플라스미드 작제

[0592] (a) pSYN-FVIII-161의 클로닝(도 3)

[0593] FVIII-161 플라스미드는 세포에서 합성 동안 처리된 효소 개열 자리를 갖는 단일 사슬 Fc(scFc) 스캐폴드를 포함한다. 작제물은 전장 VWF의 FVIII 결합 도메인(D'D3)을 갖는다.

[0594] 플라스미드(pSYN-FVIII-161)는 발현 FVIII-Fc 및 VWF-Fc 이종이합체(여기서, D'D3 도메인은 FVIII에 결합하고 인지질 및 활성화 단백질 C와의 FVIII 상호작용을 방지함)에 대해 설계되었다. pSYN-FVIII-161로부터의 단백질은 단일 폴리펩타이드(여기서, FVIII-Fc 아단위의 C 말단은 6x(GGGGS) 폴리펩타이드 링커(서열 번호 64)에 의해 VWF D'D3-Fc 아단위의 N 말단에 연결됨)로서 세포에서 발현된다. 또한, 각각의 서열에서의 마지막 Arg 후에 프로단백질 전환효소에 의한 세포내 개열을 위해 각각 폴리펩타이드 링커의 5' 및 3' 말단에서 RRRRS(서열 번호 11) 및 RKRRKR(서열 번호 10) 서열을 삽입하였다. 그러므로, 세포는 이중 사슬 FVIII-Fc/D'D3-Fc 이종이합체(여기서, FVIII-Fc 사슬은 C 말단에서 RRRRS 서열(서열 번호 11)을 갖지만, 나머지 링커 서열은 제거됨)를 발현시킬 수 있다. AE288 XTEN 단편 바로 직후 IS{5X(GGGGS)}LVPRGSGG(서열 번호 122) 폴리펩타이드(트롬빈 개열 자리 포함)는 VWF 도메인과 Fc 구역 사이에 도입되어, FVIII-VWF 이종이합체 단백질이 트롬빈에 의해 활성화되어 FVIII과 다른 응고 인자와의 상호작용을 허용하면 FVIII로부터의 VWF 단편의 방출을 수월하게 한다.

[0595] pSYN-FVIII-161(서열 번호 101). 단백질 서열(FVIII 서열 아미노산 위치 1-1457번; 밑줄 구역은 Fc 구역을 나타내고; 구불구불한 밑줄은 제1 Fc와 VWF 단편 사이의 개열 가능한 링커를 나타내며; 이중 밑줄 구역은 VWF 단편을 나타내고; 볼드체 구역은 VWF 단편과 Fc 사이의 개열 가능한 링커를 나타낸다.

```
   1  MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQSDL
  GELPVDARFP
  51  PRVPKSFPFN TSVVYKKTLF 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  NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV
  FDSLQLSVCL
 651  HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF
  PFSGETVFMS
 701  MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYYED
  SYEDISAYLL
 751  SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQREITRTTL QSDQEEIDYD
  DTISVEMKKE
 801  DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP
  HVLRNRAQSG
 851  SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA
  EVEDNIMVTF
 901  RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPRKN FVKPNETKTY
  FWKVQHHMAP
 951  TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP
  AHGRQVTVQE
1001  FALFFTIFDE TKSWYFTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN
  YRFHAINGYI
1051  MDTLPGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV
  RKKEEYKMAL
1101  YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL
  VYSNKCQTPL
1151  GMASGHIRDF QITASGQYGQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK
  EPFSWIKVDL
1201  LAPMIIHGIK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY
  RGNSTGTLMV
1251  FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME
  LMGCDLNSCS
1301  MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR
  SNAWRPQVNN
1351  PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLLTSM YVKEFLISSS
  QDGHQWTLFF
```

[0596]

1401 QNGKVKVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH
QIALRMEVLG
1451 CEAQDLYDKT 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 KRRKRSLSCR PPMVKLVCPA
DNLRAEGLEC
1751 TKTCQNYDLE CMSMGCVSGC LCPPGMVRHE NRCVALERCP
CFHQGKEYAP
1801 GETVKIGCNT CVCRDRKWNC TDHVCDATCS TIGMAHYLTF
DGLKYLFPGE
1851 CQYVLVQDYC GSNPGTFRIL VGNKGCSHPS VKCKKRVTIL
VEGGEIELFD
1901 GEVNVKRPMK DETHFEVVES GRYIILLLGK ALSVVWDRHL
SISVVLKQTY
1951 QEKVCGLCGN FDGIQNNDLT SSNLQVEEDP VDFGNSWKVS
SQCADTRKVP
2001 LDSSPATCHN NIMKQTMVDS SCRILTSDVF QDCNKLVDPE
PYLDVCIYDT
2051 CSCESIGDCA AFCDTIAAYA HVCAQHGKVV TWRTATLCPQ
SCEERNLREN
2101 GYEAEWRYNS CAPACQVTCQ HPEPLACPVQ CVEGCHAHCP
PGKILDELLQ
2151 TCVDPEDCPV CEVAGRRFAS GKKVTLNPSD PEHCQICHCD
VVNLTCEACQ
2201 **EPISGTSESA TPESGPGSEP ATSGSETPGT SESATPESGP**
GSEPATSGSE
2251 **TPGTSESATP ESGPGTSTEP SEGSAPGSPA GSPTSTEEGT**
SESATPESGP
2301 **GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGSPAGS PTSTEEGSPA**
GSPTSTEEGT
2351 **STEPSEGSAP GTSESATPES GPGTSESATP ESGPGTSESA**
TPESGPGSEP
2401 **ATSGSETPGS EPATSGSETP GSPAGSPTST EEGTSTEPSE**
GSAPGTSTEP
2451 **SEGSAPGSEP ATSGSETPGT SESATPESGP GTSTEPSEGS**
APDSGGGGSG
2501 **GGGSGGGGSG GGGSGGGGSL VPRGSGG**DKT 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

[0597]

[0598] (b) pSYN-FVIII-168, 175, 172 및 174의 클로닝(도 4A 내지 도 4D)

[0599] pSYN-FVIII-168, 172, 174 및 175는 pSYN-FVIII-161의 유도체이다. R1645A/R1648A 돌연변이를 pSYN-FVIII-161로 도입하여 pSYN-FVIII-168(SC-FVIII 동형을 생성함)을 형성시키고, AE288 XTEN을 추가의 반감기 연장을 위해 FVIII-HC의 C 말단에 직접 융합하였다. pSYN-FVIII-175를 작제하기 위해, D'D3 코돈 서열을 제거하여 FVIII 반감기 연장에 대한 Fc 및 XTEN 기술의 효과의 평가를 위해 pSYN-FVIII-168을 형성하였다.

[0600] pSYN-FVIII-172를 작제하기 위해, AE288 XTEN 단편을 추가의 반감기 연장을 위해 FVIII-HC의 C 말단에 직접 융합하고, D'D3 코돈 서열을 pSYN-FVIII-172로부터 제거하여 FVIII 반감기 연장에 대한 Fc 및 XTEN 기술의 효과를 평가하기 위해 pSYN-FVIII-174를 형성하였다.

[0601] (c) pSYN-FVIII-170의 클로닝(도 4E)

[0602] pSYN-FVIII-170을 작제하여 FVIII 반감기 연장에 대한 XTEN 및 D'D3 단편의 효과를 평가하였다. 코돈 서열 VWF-D1D2D'D3 단편 및 BDD-FVIII을 AE288 XTEN 코돈 서열(이 뒤의 35개의 aa 트롬빈 개열 가능한 링커는 VWF 및 FVIII 분자를 연결하기 위해 사용됨)인 발현 카스켓(casket)의 5' 및 3' 말단에 도입하였다. 세포내 처리 후, 분비된 단백질은 AE288 XTEN/35개의 aa 트롬빈 개열 가능한 링커에 의해 성숙 BDD-FVIII의 N 말단에 연결된

성숙 VWF 분자의 D'D3 단편을 포함하는 폴리펩타이드를 포함한다.

pSYN-FVIII-170 단백질 서열 (서열 번호 102)

```
   1  SLSCRPPMVK LVCPADNLRA EGLECTKTCQ NYDLECMSMG
  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 IGDCAAFCDT
  IAAYAHVCAQ
 351  HGKVVTWRTA TLCPQSCEER NLRENGYEAE WRYNSCAPAC
  QVTCQHPEPL
 401  ACPVQCVEGC HAHCPPGKIL DELLQTCVDP EDCPVCEVAG
  RRFASGKKVT
 451  LNPSDPEHCQ 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 GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG
  GGGSLVPRGS
 801  GGASATRRYY LGAVELSWDY MQSDLGELPV DARFPPRVPK
  SFPFNTSVVY
 851  KKTLFVEFTD HLFNIAKPRP PWMGLLGPTI QAEVYDTVVI
  TLKNMASHPV
 901  SLHAVGVSYW KASEGAEYDD QTSQREKEDD KVFPGGSHTY
  VWQVLKENGP
 951  MASDPLCLTY SYLSHVDLVK DLNSGLIGAL LVCREGSLAK
  EKTQTLHKFI
1001  LLFAVFDEGK SWHSETKNSL MQDRDAASAR AWPKMHTVNG
  YVNRSLPGLI
1051  GCHRKSVYWH VIGMGTTPEV HSIFLEGHTF LVRNHRQASL
  EISPITFLTA
1101  QTLLMDLGQF LLFCHISSHQ HDGMEAYVKV DSCPEEPQLR
  MKNNEEAEDY
1151  DDDLTDSEMD VVRFDDDNSP SFIQIRSVAK KHPKTWVHYI
  AAEEEDWDYA
1201  PLVLAPDDRS YKSQYLNNGP QRIGRKYKKV RFMAYTDETF
  KTREAIQHES
1251  GILGPLLYGE VGDTLLIIFK NQASRPYNIY PHGITDVRPL
  YSRRLPKGVK
```

[0603]

```
1301  HLKDFPILPG EIFKYKWTVT VEDGPTKSDP RCLTRYYSSF
   VNMERDLASG
1351  LIGPLLICYK ESVDQRGNQI MSDKRNVILF SVFDENRSWY
   LTENIQRFLP
1401  NPAGVQLEDP EFQASNIMHS INGYVFDSLQ LSVCLHEVAY
   WYILSIGAQT
1451  DFLSVFFSGY TFKHKMVYED TLTLFPFSGE TVFMSMENPG
   LWILGCHNSD
1501  FRNRGMTALL KVSSCDKNTG DYYEDSYEDI SAYLLSKNNA
   IEPRSFSQNP
1551  PVLKRHQREI TRTTLQSDQE EIDYDDTISV EMKKEDFDIY
   DEDENQSPRS
1601  FQKKTRHYFI AAVERLWDYG MSSSPHVLRN RAQSGSVPQF
   KKVVFQEFTD
1651  GSFTQPLYRG ELNEHLGLLG PYIRAEVEDN IMVTFRNQAS
   RPYSFYSSLI
1701  SYEEDQRQGA EPRKNFVKPN ETKTYFWKVQ HHMAPTKDEF
   DCKAWAYFSD
1751  VDLEKDVHSG LIGPLLVCHT 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
   IHGIKTQGAR
2001  QKFSSLYISQ FIIMYSLDGK KWQTYRGNST GTLMVFFGNV
   DSSGIKHNIF
2051  NPPIIARYIR LHPTHYSIRS TLRMELMGCD LNSCSMPLGM
   ESKAISDAQI
2101  TASSYFTNMF ATWSPSKARL HLQGRSNAWR PQVNNPKEWL
   QVDFQKTMKV
2151  TGVTTQGVKS LLTSMYVKEF LISSSQDGHQ WTLFFQNGKV
   KVFQGNQDSF
2201  TPVVNSLDPP LLTRYLRIHP QSWVHQIALR MEVLGCEAQD LY
```

[0604]

[0605] 실시예 4: FVIII 및 VWF 결핍 마우스에서 FVIIIF/VWF 작제물을 포함하는 XTEN의 유체역학 주사

[0606] 도 3 및 도 4에서 XTEN 함유 DNA 작제물을 2-3개의 반감기 연장 구성요소와 함께 조합하였다. 이의 FVIII 반감기 연장 가능성을 평가하기 위해, 도 3 및 도 4에서의 DNA 작제물의 선택적 그룹을 100ug/마우스 용량으로 유체역학 주사(HDI)에 의해 FVIII/VWF 이중 넉아웃(DKO) 마우스에 도입하였다. 이후, 혈액 샘플을 HDI 후 24시간에 후안와 혈액 수집에 의해 수집하였다. HDI 후 혈장 FVIII 활성을 FVIII 발색 검정에 의해 평가하였고, 결과가 표 17 및 도 5에 기재되어 있다. 야생형 BDD-FVIII과 비교하여, 모든 XTEN 함유 DNA 작제물은 HDI 후 24시간에 상당히 더 높은 FVIII 혈장 활성을 생성하여, 상응하는 분자가 BDD-FVIII보다 상당한 더 긴 순환 단백질 반감기를 갖는다는 것을 나타낸다. 이 반감기 연장 구성요소의 조합의 적용을 혈우병성 동물에서 추가로 평가하였다.

표 17

FVIII/VWF DKO 마우스에서의 HDI 후 24시간에서의 FVIII 혈장 활성

DNA 작제물	BDD-FVIII	FVIII-161	FVIII-168	FVIII-172	BDD-FVIII	FVIII-170
DNA 용량 (μg/마우스)	100	100	100	100	50	50
FVIII 활성 (mU/mL)	219±72	2446±1012	2209±609	1671±223	197±21	399±30

[0607]

[0608] 유체역학 주사:

[0609] 유체역학 주사는 작은 동물, 예컨대 마우스 및 래트에서 간에 대한 효과적이고 안전한 비바이러스 유전자 전달 방법이다. 이는 원래 약 5-7초 내에 동물의 체중의 10분의 1 용적에서 내독소가 없는 네이키드 플라스미드 DNA/식염수 용액의 신속한 주사로 설명된다. 네이키드 플라스미드 DNA는 관심 있는 유전자 및 동물의 체중의 10분의 1 용적으로 생성된 간을 포함한다. 표적화된 단백질은 주사된 DNA로부터 간에서 생성되고 주사 후 24시간 내에

검출될 수 있다. 이후, 발현된 단백질의 치료학적 특성을 연구하도록 혈장 샘플을 수집하였다.

[0610] 본 명세서에서 수행된 모든 유체역학 주사의 경우, 0.9% 무균 식염수 용액 중의 2㎖의 플라스미드 DNA를 정맥내 꼬리 정맥 주사를 통해 약 4-7초 내에 체중이 20-35그램인 마우스에 전달하였다. 정상 활성이 재개될 때까지 마우스를 제1의 일련 시간 동안 면밀히 모니터링하였다. 혈액 샘플을 후안와 혈액 수집을 통해 수집한 후, 혈장 샘플을 이후 얻고 추가의 분석을 위해 -80℃에서 저장하였다.

[0611] 실시예 5: FVIIIFc-VWF 이종이합체에 대한 동시형질감염 시스템의 플라스미드 작제는 XTEN 삽입을 포함한다(도 6)

[0612] 단백질 생산 수율을 증가시키기 위해, 3개의 DNA 작제물을 포함하는 단백질 생산을 위해 2개의 동시형질감염 시스템을 생성하였다. 제1 DNA 작제물은, AE288 XTEN 단편이 FVIII 중쇄의 C 말단에 바로 융합되고 이후 야생형 FVIII 경쇄 단편(pSYN-FVIII-173, 도 6B) 또는 R1645A/R1648A 돌연변이를 갖는 FVIII 경쇄 단편(pSYN-FVIII-169, 도 6A)에 융합되고, FVIII 경쇄가 이후 단일 Fc 단편에 바로 융합된 FVIII-Fc 융합 단백질을 코딩하였다. 제2 DNA 작제물은 D'D3-Fc 융합 단백질을 코딩하는 pSYN-VWF-031이다(실시예 1). HEK293F 세포를 80:15:5 비율로 제3 플라스미드(PC5)와 함께 2개의 플라스미드로 형질감염시켰다. 합성된 단백질은 FVIII(XTEN) Fc/D'D3Fc 이종이합체 및 D'D3Fc 이합체로서 분비되고, FVIII(XTEN) Fc/D'D3Fc 이종이합체는 단백질 정제에 의해 D'D3Fc 이합체로부터 분리되었다.

pSYN-FVIII-169 성숙 단백질 서열 (서열 번호 103):

```
   1  ATRRYYLGAV ELSWDYMQSD LGELPVDARF PPRVPKSFPF
  NTSVVYKKTL
  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 YTDETFKTRE
  AIQHESGILG
 451  PLLYGEVGDT LLIIFKNQAS RPYNIYPHGI TDVRPLYSRR
  LPKGVKHLKD
 501  FPILPGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYYSSFVNME
  RDLASGLIGP
 551  LLICYKESVD QRGNQIMSDK RNVILFSVFD ENRSWYLTEN
  IQRFLPNPAG
 601  VQLEDPEFQA SNIMHSINGY VFDSLQLSVC LHEVAYWYIL
  SIGAQTDFLS
 651  VFFSGYTFKH KMVYEDTLTL FPFSGETVFM 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 SEGSAPASSP
  PVLKRHQAEI
1051  TRTTLQSDQE EIDYDDTISV EMKKEDFDIY DEDENQSPRS
  FQKKTRHYFI
1101  AAVERLWDYG MSSSPHVLRN 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
```

[0613]

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 LHPTHYSIRS TLRMELMGCD LNSCSMPLGM 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 NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM
HEALHNHYTQ
1951 KSLSLSPGK

[0614]

pSYN-FVIII-173 성숙 단백질 서열분석 (서열 번호 104):

1 ATRRYYLGAV ELSWDYMQSD LGELPVDARF PPRVPKSFPF
NTSVVYKKTL
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 YTDETFKTRE
AIQHESGILG
451 PLLYGEVGDT LLIIFKNQAS RPYNIYPHGI TDVRPLYSRR
LPKGVKHLKD
501 FPILPGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYYSSFVNME
RDLASGLIGP
551 LLICYKESVD QRGNQIMSDK RNVILFSVFD ENRSWYLTEN
IQRFLPNPAG
601 VQLEDPEFQA SNIMHSINGY VFDSLQLSVC LHEVAYWYIL
SIGAQTDFLS
651 VFFSGYTFKH KMVYEDTLTL FPFSGETVFM SMENPGLWIL
GCHNSDFRNR

[0615]

```
 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 SEGSAPASSP
   PVLKRHQREI
1051  TRTTLQSDQE EIDYDDTISV EMKKEDFDIY DEDENQSPRS
   FQKKTRHYFI
1101  AAVERLWDYG MSSSPHVLRN 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 GVFETVEMLP
   SKAGIWRVEC
1401  LIGEHLHAGM STLFLVYSNK CQTPLGMASG HIRDFQITAS
   GQYGQWAPKL
1451  ARLHYSGSIN AWSTKEPFSW IKVDLLAPMI IHGIKTQGAR
   QKFSSLYISQ
1501  FIIMYSLDGK KWQTYRGNST GTLMVFFGNV DSSGIKHNIF
   NPPIIARYIR
1551  LHPTHYSIRS TLRMELMGCD LNSCSMPLGM 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  NNYKTTPPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM
   HEALHNHYTQ
1951  KSLSLSPGK
```

[0616]

[0617] 실시예 6. FVIII-169/VWF-031 및 FVIII-173/VWF-031에 대한 단백질 정제

[0618] 청명한 순화 배지를 완충제 교환하도록 접선 유동 여과(TFF) 단계를 이용하였다. 이후, 2단계 크로마토그래피 공정을 이용하여 FVIII-169/VWF-031 또는 FVIII-173/VWF-031 이종이합체를 정제하였다. 약음이온 교환 수지, 이어서 친화도 크로마토그래피를 이용하였다. 최종 정제 생성물은 SEC-HPLC에 의해 허용되는 순도를 가졌다. 비활성은 FVIII 발색 검정 및 A280 농도에 의해 측정되는 바대로 B 도메인 결실 FVIII에 필적하였다. 이 분자의 각각의 모이어티의 순도 및 존재를 SDS-PAGE 및 웨스턴 블로팅에 의해 확인하였다.

[0619] 실시예 7. 옥테트 검정에 의한 FVIII-169/VWF-031의 VWF 결합의 평가

[0620] 트라이스 결합 완충제(50mM 트라이스(pH 7.2), 150mM NaCl, 5mM $CaCl_2$)를 사용하여 포르테바이오 옥테트(ForteBio Octet) 384 기기에 의해 25℃에서 바이오레이어 간섭법(BLI) 기반 측정(옥테트 검정)에 의해 FVIII-169/VWF-031의 VWF 결합 능력을 얻었다. FVIII 결합을 결정하기 위한 옥테트 검정은 APS 바이오센서(Biosensor) 상의 인간 폰 빌레브란트 인자(헤마톨로직 테크놀로지스(Haematologic Technologies) 카탈로그 HCVWF-0191호)의 소수성 부동화, 이어서 1.0% 소 혈청 알부민(잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch) 카탈로그 001-000-161호)의 결합에 기초하였다. 간단히 말하면, hvWF(20㎍/㎖)를 트라이스 완충제 중에 희석하고, 600초 동안 APS 바이오센서에 로딩하여, 반응 프로브에서 대략 3.0 내지 3.5nm 결합을 생성하였다. 대조군 APS

프로브에 표준 공제를 위해 hvWF의 부재 하에 1.0% BSA를 로딩하였다. 로딩 후, 모든 프로브를 300초 동안 트라이스 완충제 중에 항온처리하여 새로운 기준을 확립하였다. 이후, 바이오센서 프로브를 실온에서 5분 동안 FVIII-XTEN 169 또는 FVIIIFc 약물 물질(0, 0.6, 2, 6, 20, 60, 200, 600IU/㎖)의 용액 중에 항온처리하고, 이후 5분 분해 단계를 수행하였다. 옥테트 데이터 분석 소프트웨어를 이용하여, 결합 반응(nm)을 공제된 데이터(반응 프로브 - 표준 프로브)로부터 유도하였다. 부동화된 VWF에 대한 결합이 FVIII-169/VWF-031에 대해 관찰되지 않았고(도 7), 이는 D'D3 단편에 의해 전장 VWF 분자로부터의 FVIII의 완전한 차폐를 나타낸다.

[0621] 실시예 8. HemA 및 FVIII/VWF DKO 마우스에서의 FVIII-169/VWF-031 PK

[0622] HemA 및 FVIII/VWF DKO 마우스에서 FVIII-169/VWF-031의 PK 프로필을 시험하여 내인성 VWF로부터 FVIII 모이어티를 차폐하는 D'D3 단편의 능력을 평가하였다. HemA 또는 FVIII/VWF DKO 마우스를 200IU/kg에서 FVIII-169/VWF-031의 단일 정맥내 용량으로 처리하고, 이후 혈장 샘플을 투약 후 5분, 8시간, 24시간, 48시간 및 72시간에 수집하였다. 혈장 샘플의 FVIII 활성을 FVIII 발색 검정에 의해 시험하고, 윈논린 프로그램을 이용하여 FVIII-169/VWF-031의 반감기를 계산하였다.

[0623] 부동화된 VWF에 대한 작제물의 결합의 완전한 억제는 FVIII-169/VWF-031의 경우 바이오레이어 간섭법(도 7)에 의해 나타났다. 이는 분자 내의 D'D3 단편이 네이티브 VWF 분자에 대한 FVIII 결합을 성공적으로 차단한다는 것을 나타내고, FVIII-169/VWF-031의 유사한 반감기가 2개의 상이한 마우스 균주에서 예측되었다. 도 8a 및 표 18에 도시된 바대로, 예상된 바대로, FVIII-169/VWF-031은 HemA 및 FVIII/VWF DKO 마우스 둘 다에서 유사한 PK 프로필을 갖고, 이는 FVIIIFc/VWF 이종이합체의 반감기가 내인성 VWF의 반감기에 독립적이라는 것을 나타낸다. 내인성 VWF 반감기로부터의 FVIIIFc/VWF 이종이합체 반감기의 분리는 FVIII 연장 상승한도를 제거하고, 내인성 VWF에 의해 부여된 2배 반감기 제한을 넘게 FVIII 반감기를 추가로 연장하는 가능성을 열었다.

표 18

HemA 및 FVIII/VWF DKO 마우스에서의 FVIII-169/VWF-031 PK

마우스 균주	회수 (%)	$t_{1/2}$ (hr)	MRT (hr)	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

[0624]

[0625] FVIII/VWF DKO 마우스에서 FVIII-169/VWF-031의 반감기를 FVIII-169/Fc 및 FVIIIFc와 비교함으로써 XTEN 삽입 및 D'D3 단편의 FVIII 보호 능력을 평가하였다. 단일 IV 투여 후, FVIII-169/VWF-031에 대해 5분, 8시간, 24시간, 48시간 및 72시간에, FVIII-169/Fc에 대해 5분, 8시간, 24시간, 32시간, 48시간에 및 FVIIIFc에 대해 5분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간 및 8시간에 혈액 샘플을 수집하였다. 혈장 샘플의 FVIII 활성을 FVIII 발색 검정에 의해 시험하고, 윈논린 프로그램을 이용하여 FVIII-155/VWF-031의 반감기를 계산하였다.

[0626] 시험 결과가 도 8b 및 표 19에 요약되어 있고, rFVIIIFc는 VWF 보호의 손실로 인해 DKO 마우스에서 1.6시간 반감기를 갖는다. XTEN 삽입이 FVIIIFc 분자로 도입될 때, 생성된 FVIII-169/Fc 분자는 XTEN 삽입에 의해 4배 반감기 연장인 7시간 반감기를 갖는다. 마지막으로, D'D3 단편이 분자로 편입되어 FVIII-169/VWF-031을 형성할 때, D'D3 단편에 의한 또 다른 2.5배의 추가의 증가인 17시간 반감기가 관찰되었다. 반감기 개선 이외에, 개선된 평균 체류 시간(MRT), 청소율(Cl) 및 AUC가 표 19에 기재된 바대로 또한 관찰되었다.

[0627] FVIII-169/VWF-031은 HemA 및 FVIII/VWF DKO 마우스 둘 다에서 VWF 청소에 의해 부여된 $t_{1/2}$ 연장 상승한도의 상한치인 17 내지 18시간 $t_{1/2}$를 성취하였다. 더 많은 $t_{1/2}$ 연장 구성요소가 FVIII 내의 이 분자, 예컨대 제2 XTEN 삽입으로 추가로 편입될 수 있다. D'D3 단편 및 XTEN 삽입의 상승 효과는 이의 청소 경로로부터 FVIII에 대한 완전한 보호의 가능성을 제공하고, 2배 FVIII $t_{1/2}$ 연장 제한의 최종 돌파(breakthrough)는 FVIIIFc/XTEN/VWF 변이체에 의해 성취되었다.

표 19

FVIII/VWF DKO 마우스에서의 FVIII-169/VWF-031 PK

마우스 균주	처리	회수 (%)	$t_{1/2}$ (hr)	MRT (hr)	Cl (mL/hr/kg)	Vss (mL/kg)	AUC/D (hr*kg*mIU/mL/mIU)
FVIII/VWF DKO	rFVIIIFc	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

[0628]

[0629] 실시예 9: D'D3을 발현하는 FVIII/VWF DKO 마우스에서의 FVIII-XTEN 변이체 세포 배지 농축물 PK

[0630] FVII-XTEN의 $t_{1/2}$를 연장하는 D'D3 단편의 능력을 (실시예 2에 기재된 바대로) D'D3을 발현하는 FVIII/VWF DKO 마우스 모델에서 평가하였다. 이 연구에서, 순환으로 D'D3 이합체를 도입하기 위해 VWF-025를 사용하는 대신에, VWF-029 작제물을 사용하여 D'D3 단량체를 순환으로 도입하였다. FVIII-XTEN 변이체 단백질을 제조하기 위해, 소규모(50-100mL) 일시 형질감염 배양 배지를 형질감염 4일 후 준비하고, 세포 배양물을 수확하고, PK 연구에 적합한 10-20IU/mℓ의 FVIII 활성 범위에 도달하도록 농축하였다. 이후, 순환에서 D'D3이 있거나 없는 FVIII/VWF DKO 마우스에서 표준 PK 연구를 위해 농축된 세포 배지를 사용하였다.

[0631] 1-3개의 XTEN 삽입을 포함하는 전체 6개의 FVIII-XTEN 변이체를 시스템에서 시험하고, 이의 $t_{1/2}$가 표 20에 요약되어 있고, 대표적인 변이체로부터의 데이터가 도 9a에 도시되어 있다.

[0632] 순환에서 D'D3 단편의 존재로 모든 FVIII-XTEN 변이체에 대해 더 긴 반감기가 관찰되었고(표 20), 이는 이의 청소 경로로부터의 FVIII-XTEN에 대한 D'D3 보호를 나타낸다. 더욱이, HemA 마우스에서의 이의 14시간 반감기와 비교될 때, LSD0055.021은 D'D3 발현 DKO 마우스에서 20.4시간 $t_{1/2}$를 가져(도 9b, 표 20), 이는 FVIII 분자에 대해 2배 반감기 연장 상승한도의 최종 돌파를 나타낸다. FVIII(XTEN)/VWF 분자를 추가로 변형함으로써, 본 발명자들은 심지어 더 긴 FVIII $t_{1/2}$를 가능하게 성취하고 오직 1주 1회 또는 덜 빈번한 투약 섭생을 요하는 FVIII 단백질을 HemA 환자에 제공할 수 있었다.

표 20

D'D3 발현 FVIII/VWF DKO 마우스에서 FVIII-XTEN $t_{1/2}$

FVIII-XTEN 번호	XTEN 삽입의 수	삽입 자리	XTEN 크기	$t_{1/2}$ (hr) DKO 마우스	$t_{1/2}$ (hr) pLIVE-D'D3/DKO 마우스	$t_{1/2}$ (hr) HemA 마우스
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 는 XTEN 서열(예를 들면, 144)이 성숙 FVIII 서열에 상응하는 745 번 아미노산 잔기의 바로 하류에 삽입된다는 것을 나타낸다.

[0633]

[0634] 실시예 10: FVIII/VWF 이중 넉아웃(DKO) 혈장에서 VWF- 및 XTEN-함유 FVIII 변이체의 안정성

[0635] rFVIIIFc 단백질 변이체의 혈장 안정성을 FVIII/VWF 이중 넉아웃(DKO) 마우스 혈장에서 시험하였다. 안정성 검정을 위해, HEK293 세포를 rFVIIIFc 또는 FVIII-169(288 AE XTEN이 B 도메인 연접부에 삽입된 rFVIIIFc)의 발현을 지시하는 플라스미드 및 IgG-Fc 또는 VWF-031(IgG-Fc에 융합된 VWF D'D3 구역)의 발현을 지시하는 플라스

미드로 동시형질감염시켰다. 형질감염 후 4일에, 세포 배양 배지를 수확하고, FVIII 발색 활성에 기초하여 30IU/㎖로 농축하였다. 이후, 농축된 세포 배양 배지를 5IU/㎖의 FVIII 활성을 생성시키도록 DKO 마우스 혈장에 첨가하고, 37℃에서 항온처리하였다. 발색 검정에 의한 활성 측정을 위해 상이한 시점에 분취량을 수집하였다. 각각의 시점에서의 활성을 2중으로 측정하고, 평균 활성을 시간의 함수로서 작도하였다. 중쇄 및 경쇄가 비공유 상호작용에 의해 함께 결합된 이중 사슬(dc) FVIII 분자인 FVIIIFc의 활성은 DKO 마우스 혈장에서 시간에 따라 감소한다(도 10). B 도메인 연접부에서 288 AE XTEN 삽입을 포함하는 FVIII-169:Fc의 활성은 rFVIIIFc에 비해 감소된 속도로 감퇴하고, 이는 안정성 증대가 XTEN 삽입에 의해 부여된다는 것을 나타낸다. VWF가 생체내 FVIII의 안정성을 증대시키는 것으로 제안되었다는 것을 고려하여, 본 발명자들은 FVIII-169:VWF-031의 혈장 안정성을 평가하였다. FVIII 구성요소 및 VWF D'D3 구성요소가 Fc의 각각의 반도메인에 융합된 이 이종이합체 분자는 FVIII-169:Fc에 비해 추가의 혈장 안정성을 나타내고, 이는 VWF D'D3 도메인 및 XTEN이 rFVIIIFc의 혈장 안정성에 상승 효과를 갖는다는 것을 나타낸다.

[0636] 실시예 11: Fc 융합, XTEN 삽입 및 VWF의 D'D3 단편의 FVIII 반감기에 대한 효과.

[0637] FVIII의 반감기에 대한 Fc 융합, XTEN 삽입 및 VWF의 D'D3 단편의 효과를 평가하기 위해, B 도메인 결실 재조합 FVIII(rBDD-FVIII), rFVIIIFc, FVIII-169:Fc 및 FVIII-169:VWF-031의 약동학적 특성을 FVIII/VWF 이중 넉아웃(DKO) 마우스에서 평가하였다.

[0638] DKO 마우스를 200IU/kg의 FVIII 단백질의 단일 정맥내 투여로 처리하고, 혈장 샘플을 도 11에 표시된 바대로 지정된 시점에 수집하였다. 혈장 샘플의 FVIII 활성을 FVIII 발색 검정에 의해 분석하고, 윈논린-휘닉스 프로그램을 이용하여 반감기를 계산하였다. 시험된 분자의 약동학적 매개변수가 표 21에 기재되어 있다. 각각의 FVIII 변이체에 대한 혈장 FVIII 활성의 시간 회귀 곡선이 도 11에 작도되었다.

[0639] 비변형 BDD-FVIII은 DKO 마우스에서 0.23시간의 반감기를 갖고, FVIIIFc 융합 단백질은 Fc:FcRn 상호작용을 통한 FVIIIFc 단백질의 재순환으로 인해 DKO 마우스에서 1.66시간의 연장된 반감기를 갖는다. AEXTEN 폴리펩타이드의 288개의 잔기가 FVIIIFc 분자 내의 FVIII의 B 도메인 구역으로 편입될 때, 생성된 FVIII169/Fc 단백질의 반감기는 DKO 마우스에서 7.41시간으로 추가로 연장되었다. 마지막으로, VWF의 D'D3 도메인의 부가에 의해, FVIII169/VWF031 이종이합체의 반감기는 DKO 마우스에서 17.9시간에 도달하였다(도 11, 표 21). 반감기의 부가에서, 모든 다른 PK 매개변수는 또한 각각의 구성요소의 부가에 비례하여 개선되었다(표 21). FVIII은 다수의 반감기 연장 구성요소를 용인할 수 있고, FVIII 반감기 연장에 대한 3개의 구성요소의 이 상승 효과는 FVIII-XTEN VWF 이종이합체의 추가의 반감기 개선이 가능하게 하였다.

표 21

FVIII 변이체의 PK 매개변수

FVIII	FVIII 동형	XTEN 삽입		$T_{1/2}$ (hr)	MRT (hr)	Cl (mL/hr/kg)	Vss (mL/kg)	AUC_D kg*hr/mL
		자리	XTEN 길이					
BDD-FVIII	dc			0.23	0.24	407.72	97.42	0.0025
FVIIIFc	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

* B는 XTEN 서열(예를 들면, 144)이 성숙 FVIII 서열에 상응하는 745번 아미노산 잔기의 바로 하류에 삽입된다는 것을 나타낸다.

[0640]

[0641] 실시예 12: 상이한 FVIII-XTEN_VWF 이종이합체의 약동학적 특성

[0642] FVIII 반감기에 대한 VWF-D'D3 단편 및 XTEN 삽입의 조합 효과를 평가하기 위해, FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 이종이합체의 약동학적 특성을 HemA 마우스에서 시험하고, BDD-FVIII(scBDD-FVIII) 및 FVIII-169:VWF-031(실시예 10)의 단일 사슬 동형과 비교하였다. 새로운 7개의 FVIII-XTEN-Fc 작제물을 생성하였다(단백질 서열은 표 24에 기재되어 있다). 이 작제물의 개략적 다이어그램이 도 14A 내지 14H에 도시되어 있다. FVIII-195 및 FVIII-199는 각각 1900번 및 1656번 위치에서 2개의 XTEN 삽입을 포함하는 각각 FVIII 이중 사슬 및 단일 사슬 동형이다. FVIII-196 및 FVIII-201은 각각 26번, 1656번 및 1900번 위치에서 3개의 XTEN 삽입을 포함하는 각각 FVIII 이중 사슬 및 단일 사슬 동형이다. FVIII-203, -204 및 -205는 B 도메인 연접부 및 각각 1900번, 403번 또는

18번 위치에서 2개의 XTEN 삽입을 갖는 sc-FVIIIFc 분자이다. 각각의 FVIII-XTEN-Fc 작제물은 HEK293 세포에서 VWF-031과 동시발현되어 FVIII-XTEN-Fc/VWF 이종이합체 단백질을 생성하였다. 형질감염 후 4일에, 세포 배양 배지를 수확하고, FVIII 발색 활성(FVIII-195:VWF-031, FVIII-196:VWF-031, FVIII-199:VWF-031, FVIII-203:VWF-031 및 FVIII-204:VWF-031)에 기초하여 20IU/㎖로 농축하거나 정제하였다(scBDD-FVIII, FVIII-169:VWF-031, FVIII-201:VWF-031 및 FVIII-205:VWF-031). FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 이종이합체(FVIII-169:VWF-031, 실시예 5)에서 D'D3 단편에 의한 내인성 VWF로부터의 FVIII 분자의 완전한 분자내 차폐로 입증된 바대로, PK 평가를 위해 HemA 마우스를 선택하였다. 정제된 단백질 또는 농축된 세포 배양 배지를 200IU/10㎖/kg의 용량으로 정맥내 투여에 의해 8주 내지 12주령 HemA 마우스에 투여하였다. 혈장 샘플을 투약 후 5분, 8시간, 16시간, 24시간, 32시간, 48시간, 72시간 및 96시간에 수집하였다. 혈장 샘플의 FVIII 활성을 FVIII 발색 검정에 의해 분석하고, 윈논린-휘닉스 프로그램을 이용하여 반감기를 계산하였다. 시험된 분자의 약동학적 매개변수가 표 22에 기재되어 있다. FVIII-XTEN-Fc/VWF-Fc 변이체에 대한 선택된 시점에서의 혈장 FVIII 활성이 도 12a 내지 도 12c에 작도되어 있다.

[0643] XTEN이 1900번 및 1656번 위치(FVIII-195, FVIII-199)로 삽입될 때, FVIII-169:VWF-031과 비교하여 scFVIII 동형(FVIII-199:VWF-031)에 대해 보통의 반감기 개선이 관찰되었다. 그러나, dcFVIII 동형은 FVIII-169:VWF-031보다 짧은 반감기를 나타냈고, 이는 단일 사슬 동형이 상응하는 이중 사슬 동형보다 상당히 더 안정하다는 것을 나타낸다(표 22 및 도 12a). 제3 XTEN 삽입이 26번 위치에서 FVIII-199로 편입될 때, 생성된 분자 FVIII-201:VWF-031의 반감기가 24.6시간에 도달하고, 이는 scBDD-FVIII에 비해 3배 초과의 반감기 개선을 나타낸다(표 22 및 도 12c). 본 발명자들은 또한 B 도메인 XTEN 삽입과 조합된 각각 403번(A2 도메인), 1900번(A3 도메인) 및 18번(A1 도메인) 위치에서의 제2 XTEN 삽입의 반감기 연장 효과를 시험하였다. A2 또는 A3 XTEN 삽입의 부가가 추가의 반감기 이익을 부여하지 않지만(표 22, 도 12b), A1 삽입의 부가는 FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 이종이합체의 반감기를 scBDD-FVIII보다 3배 초과인 29.4시간으로 추가로 연장시켰다(표 22, 도 12c).

[0644] XTEN이 FVIIIFc/VWF 이종이합체 작제물로 편입될 때, 생성된 분자의 반감기 개선의 정도는 가변적이고, XTEN 삽입의 자리 또는 수와 반감기 사이의 분명한 상관관계 관찰되지 않아서, FVIII-XTEN-Fc/VWF 이종이합체의 반감기가 XTEN 삽입의 수 또는 위치보다는 전체 분자의 통합성에 의해 결정된다는 것을 제시한다.

[0645] FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 이종이합체에 대해 관찰된 24.6시간 및 29.4시간 반감기는 FVIII 반감기 연장에 대한 1.6배 내지 2배 제한을 확실히 초과하였다. 이 발견이 HemA 환자에 적용되는 경우, 이는 FVIII 예방에 대한 1주 1회 또는 덜 빈번한 투약을 허용할 것이다.

표 22

FVIII-XTEN-Fc/VWF-Fc 이종이합체의 PK 매개변수

FVIII	FVIII 동형	XTEN 삽입		$T_{1/2}$ (hr)	MRT (hr)	Cl (mL/hr/kg)	Vss (mL/kg)	AUC_D kg*hr/mL
		자리	XTEN 길이					
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

* B는 XTEN 서열(예를 들면, 144)이 성숙 FVIII 서열에 상응하는 745번 아미노산 잔기의 바로 하류에 삽입된다는 것을 나타낸다.

[0646]

[0647] XTEN을 FVIII 분자로 편입하는 것 이외에, 본 발명자들은 또한 D'D3 단편과 Fc 단편 사이의 링커로서 XTEN을 편입하는 것의 가능한 반감기 연장 이익을 평가하였다. FVIII-155(scFVIIIFc)는 HEK293 세포에서 VWF-034(AE 288 XTEN 및 35개 잔기 트롬빈 개열 가능한 링커를 갖는 VWF-Fc)와 동시발현되었다. 형질감염 후 4일에, 세포 배양 배지를 수확하고, FVIII 활성 검정에 기초하여 20IU/㎖로 농축하였다. FVIII/VWF DKO 마우스에 단일 정맥내 주

사로 200IU/10㎖/kg에서 농축된 세포 배양 배지를 투약하였다. 혈장 샘플을 투약 후 5분, 8시간, 24시간, 48시간, 72시간 및 96시간에 수집하였다. 혈장 샘플의 FVIII 활성을 FVIII 발색 검정에 의해 분석하고, 시간의 함수로서의 혈장 FVIII 활성의 회귀 곡선을 작도하였다(도 13). FVIII-155/VWF-034는, 2개의 분자에 대한 중복 회귀 곡선에 의해 예시된 바대로, FVIII의 B 도메인 연접부로 삽입된 AE 288 XTEN을 갖는 FVIII-169/VWF-031과 동일한 반감기 개선을 나타냈다(도 13). VWF-Fc 폴리펩타이드로의 XTEN 삽입이 FVIII 폴리펩타이드의 B 도메인 연접부에서의 XTEN 삽입에 의해 부여된 것과 유사한 양의 반감기 개선을 부여한다는 증거는, FVIII 폴리펩타이드에서의 분자내 XTEN 삽입이 VWF-Fc 폴리펩타이드의 VWF 구성요소와 Fc 구성요소 사이의 도메인내 XTEN 삽입과 조합된 이종이합체 분자에서 추가의 반감기 개선이 가능할 수 있다는 것을 제시한다.

[0648] 실시예 13A: 추가의 FVIII-XTEN_VWF 이종이합체의 약동학적 특성

[0649] 표 22에 기재된 FVIII-XTEN VWF 이종이합체 이외에, FVIII의 단일 사슬 및 이중 사슬 버전인 XTEN 삽입의 상이한 조성을 포함하는 FVIII-XTEN VWF 이종이합체(표 23A)는 이의 약동학적 특성에 대해 HemA에서 시험되거나 시험될 것이다. 다양한 FVIII 작제물(표 23B) 및 VWF 작제물(표 23C)은 또한 하기 개시되어 있다. HemA 마우스는 200IU/10㎖/kg에서 이종이합체 단백질의 정맥내 투여의 단일 용량으로 치료될 것이다. 이후, 혈장 샘플은 투약 후 5분, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간 및 120시간에 수집될 것이다. 혈장 샘플의 FVIII 활성은 FVIII 발색 검정에 의해 분석되고, 윈논린-휘닉스 프로그램을 이용하여 반감기가 계산될 것이다. 기재된 이종이합체의 단백질 서열은 표 25에 기재되어 있다.

[0650] [표 23A]

PK 및 활성 개선에 대한 타당한 FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 이종이합체 조합.

	pSYN VWF-015	pSYN VWF-031	pSYN VWF-034 **	pSYN VWF-036
pSYN FVIII 010	-	$t_{1/2}$ 8.7시간 DKO 마우스	시험 예정	-
pSYN FVIII 155	$t_{1/2}$ 6.3 시간 DKO 마우스	$t_{1/2}$ 10.8시간 HemA 마우스	$t_{1/2}$ 18.6시간 HemA 마우스	$t_{1/2}$ 13.3시간 HemA 마우스
pSYN FVIII 169 **	-	$t_{1/2}$ 16.7시간 HemA 마우스	$t_{1/2}$ 31.1시간 HemA 마우스	-
pSYN FVIII 173 **	-	$t_{1/2}$ 15.2시간 DKO 마우스	$t_{1/2}$ 28.9시간 HemA 마우스	시험 예정
pSYN FVIII 205	-	$t_{1/2}$ 29.4시간 HemA 마우스	$t_{1/2}$ 32.4시간 HemA 마우스	$t_{1/2}$ 29.7시간 HemA 마우스
pSYN FVIII 266	-	$t_{1/2}$ 24.5시간 HemA 마우스	$t_{1/2}$ 27.4시간 HemA 마우스	-
pSYN FVII 267	-	$t_{1/2}$ 23.0시간 HemA 마우스	$t_{1/2}$ 25.7시간 HemA 마우스	
pSYN FVIII 268	-	시험 예정	시험 예정	시험 예정
pSYN FVIII 268의 이중 사슬 동형		시험 예정	시험 예정	시험 예정
** XTEN의 길이는 72, 144, 288, 324, 333, 576 또는 864로 변경될 수 있다.				

[0651]

[0652] [표 23B]

FVIII 작제물:

pSYN FVIII 010	이중 사슬 FVIIIFc
pSYN FVIII 169	B-도메인에서의 288 AE XTEN을 갖는 단일 사슬 FVIIIFc
pSYN FVIII 173	B-도메인에서의 288 AE XTEN을 갖는 이중 사슬 FVIIIFc
pSYN FVIII 195	1656번 및 1900번 아미노산에서의 2개의 144 XTEN을 갖는 이중 사슬 FVIIIFc
pSYN FVIII 196	26번, 1656번 및 1900번 아미노산에서의 3개의 144 XTEN을 갖는 이중 사슬 FVIIIFc
pSYN FVIII 199	1656번 및 1900번 아미노산에서의 2개의 144 XTEN을 갖는 단일 사슬 FVIIIFc
pSYN FVIII 201	26번, 1656번 및 1900번 아미노산에서의 3개의 144 XTEN을 갖는 단일 사슬 FVIIIFc
pSYN FVIII 203	1900번 아미노산에서의 144 AE XTEN 및 B-도메인에서의 288 AE XTEN을 갖는 단일 사슬 FVIIIFc
pSYN FVIII 204	403번 아미노산에서의 144 AE XTEN 및 B-도메인에서의 288 AE XTEN을 갖는 단일 사슬 FVIIIFc
pSYN FVIII 205	18번 아미노산에서의 144 AE XTEN 및 B-도메인에서의 288 AE XTEN을 갖는 단일 사슬 FVIIIFc
pSYN FVIII 207	단일 사슬 FVIII (Fc 무, XTEN 무)
pSYN FVIII 266	18번 아미노산에서의 42 AE XTEN 및 B-도메인에서의 288 AE XTEN을 갖는 단일 사슬 FVIIIFc
pSYN FVIII 267	18번 아미노산에서의 72 AE XTEN 및 B-도메인에서의 288 AE XTEN을 갖는 단일 사슬 FVIIIFc
pSYN FVIII 268	18 번 아미노산에서의 144 AE XTEN을 갖는 단일 사슬 FVIIIFc
pSYN FVIII 269	18 번 아미노산에서의 72 AE XTEN을 단일 사슬 FVIIIFc
pSYN FVIII 271	18 번 아미노산에서의 42 AE XTEN을 갖는 단일 사슬 FVIIIFc
pSYN FVIII 272	18 번 아미노산에서의 144 AE XTEN 및 B-도메인에서의 288 AE XTEN을 갖는 단일 사슬 FVIII (Fc 무)

[0653]

[0654] [표 23C]

VWF 작제물:

pSYN VWF031	VWF-D1D2D'D3- 48aa 길이의 트롬빈 개열 가능한 GS 링커-C1099A/C1142A를 갖는 Fc
pSYN VWF034	VWF-D1D2D'D3- 288AE XTEN +35aa 길이의 트롬빈 개열 가능한 GS 링커-C1099A/C1142A를 갖는 Fc
pSYN VWF035	VWF-D1D2D'D3- 72aa 길이의 트롬빈 개열 가능한 GS 링커-C1099A/C1142A를 갖는 Fc
pSYN VWF036	VWF-D1D2D'D3- 98aa 길이의 트롬빈 개열 가능한 GS 링커-C1099A/C1142A를 갖는 Fc
pSYN VWF041	D3에서의 288 AE XTEN 및 D3 후의 48aa 길이의 트롬빈 개열 가능한 GS 링커를 갖는 VWF-D1D2D'D3-C1099A/C1142A를 갖는 Fc

[0655]

[0656] 실시예 13B: 추가의 FVIII-XTEN_VWF 이종이합체의 약동학적 특성.

[0657] FVIII-XTEN_VWF 이종이합체를 이의 약동학적 특성에 대해 HemA 마우스에서 시험하였다. 시험된 이종이합체는 FVIII169/VWF034, FVIII205/VWF034, FVIII205/VWF036 및 FVIII266/VWF031이다. HemA 마우스에 200IU/10㎖/kg에서 다양한 이종이합체 단백질의 단일 정맥내 용량으로 투여하였다. 혈장 샘플을 투약 후 5분, 24시간, 48시간, 72시간, 96시간 및 120시간에 수집하였다. 혈장 샘플의 FVIII 활성을 FVIII 발색 검정에 의해 분석하고, 윈논린-휘닉스 프로그램을 이용하여 반감기를 계산하였다. PK 결과가 하기 표 24에 기재되어 있다.

표 24

HemA 마우스에서의 추가의 FVIII-XTEN_VWF - PK

처리	5분 회수 (%)	HL (hr)	MRT (hr)	Cl (mL/hr/kg)	Vss (mL/kg)	AUC_D (hr*kg*mIU/mL/mIU)	scBDD-FVIII에 대한 $t_{1/2}$ 증가의 배수
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

[0658]

pSYNFVIII 010 뉴클레오타이드 서열-(이중 사슬 FVIIIFc) (서열 번호 125)

```
  1  ATGCAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT
  TGCGATTCTG
 51  CTTTAGTGCC ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA
  CTGTCATGGG
101  ACTATATGCA AAGTGATCTC GGTGAGCTGC CTGTGGACGC
  AAGATTTCCT
151  CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC ACCTCAGTCG
  TGTACAAAAA
201  GACTCTGTTT GTAGAATTCA 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 TGGAATGGGC
  ACCACTCCTG
851  AAGTGCACTC AATATTCCTC GAAGGTCACA CATTTCTTGT
  GAGGAACCAT
901  CGCCAGGCGT CCTTGGAAAT CTCGCCAATA ACTTTCCTTA
  CTGCTCAAAC
951  ACTCTTGATG GACCTTGGAC AGTTTCTACT GTTTTGTCAT
  ATCTCTTCCC
1001 ACCAACATGA TGGCATGGAA GCTTATGTCA AAGTAGACAG
  CTGTCCAGAG
1051 GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA GAAGCGGAAG
  ACTATGATGA
1101 TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT
  GATGACAACT
1151 CTCCTTCCTT TATCCAAATT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA
  TCCTAAAACT
1201 TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT
  ATGCTCCCTT
1251 AGTCCTCGCC CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT
  TTGAACAATG
1301 GCCCTCAGCG GATTGGTAGG AAGTACAAAA AAGTCCGATT
  TATGGCATAC
```

[0659]

```
1351  ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT ATTCAGCATG
  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 GTTTCGTTAA TATGGAGAGA GATCTAGCTT
  CAGGACTCAT
1701  TGGCCCTCTC CTCATCTGCT ACAAAGAATC TGTAGATCAA
  AGAGGAAACC
1751  AGATAATGTC AGACAAGAGG AATGTCATCC TGTTTTCTGT
  ATTTGATGAG
1801  AACCGAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTTC
  TCCCCAATCC
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 GAGAAACTGT
  CTTCATGTCG
2101  ATGGAAAACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACAACT
  CAGACTTTCG
2151  GAACAGAGGC ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT
  GACAAGAACA
2201  CTGGTGATTA TTACGAGGAC AGTTATGAAG ATATTTCAGC
  ATACTTGCTG
2251  AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAAGC TTCTCTCAAA
  ACCCACCAGT
2301  CTTGAAACGC CATCAACGGG AAATAACTCG TACTACTCTT
  CAGTCAGATC
2351  AAGAGGAAAT TGACTATGAT GATACCATAT CAGTTGAAAT
  GAAGAAGGAA
2401  GATTTTGACA TTTATGATGA GGATGAAAAT CAGAGCCCCC
  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
```

[0660]

```
2751  TGAGGAAGAT CAGAGGCAAG GAGCAGAACC TAGAAAAAAC
   TTTGTCAAGC
2801  CTAATGAAAC CAAAACTTAC TTTTGGAAAG TGCAACATCA
   TATGGCACCC
2851  ACTAAAGATG AGTTTGACTG CAAAGCCTGG GCTTATTTCT
   CTGATGTTGA
2901  CCTGGAAAAA GATGTGCACT CAGGCCTGAT TGGACCCCTT
   CTGGTCTGCC
2951  ACACTAACAC ACTGAACCCT GCTCATGGGA GACAAGTGAC
   AGTACAGGAA
3001  TTTGCTCTGT TTTTCACCAT CTTTGATGAG ACCAAAAGCT
   GGTACTTCAC
3051  TGAAAATATG GAAAGAAACT GCAGGGCTCC CTGCAATATC
   CAGATGGAAG
3101  ATCCCACTTT TAAAGAGAAT TATCGCTTCC ATGCAATCAA
   TGGCTACATA
3151  ATGGATACAC TACCTGGCTT AGTAATGGCT CAGGATCAAA
   GGATTCGATG
3201  GTATCTGCTC AGCATGGGCA GCAATGAAAA CATCCATTCT
   ATTCATTTCA
3251  GTGGACATGT GTTCACTGTA CGAAAAAAAG AGGAGTATAA
   AATGGCACTG
3301  TACAATCTCT ATCCAGGTGT TTTTGAGACA GTGGAAATGT
   TACCATCCAA
3351  AGCTGGAATT TGGCGGGTGG AATGCCTTAT TGGCGAGCAT
   CTACATGCTG
3401  GGATGAGCAC ACTTTTTCTG GTGTACAGCA ATAAGTGTCA
   GACTCCCCTG
3451  GGAATGGCTT CTGGACACAT TAGAGATTTT CAGATTACAG
   CTTCAGGACA
3501  ATATGGACAG TGGGCCCCAA AGCTGGCCAG ACTTCATTAT
   TCCGGATCAA
3551  TCAATGCCTG GAGCACCAAG 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  TTCATCCTAC TTTACCAATA TGTTTGCCAC CTGGTCTCCT
   TCAAAAGCTC
4001  GACTTCACCT CCAAGGGAGG AGTAATGCCT GGAGACCTCA
   GGTGAATAAT
4051  CCAAAAGAGT GGCTGCAAGT GGACTTCCAG AAGACAATGA
   AAGTCACAGG
4101  AGTAACTACT CAGGGAGTAA AATCTCTGCT TACCAGCATG
   TATGTGAAGG
```

[0661]

```
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 CGACAAAACT CACACATGCC
   CACCGTGCCC
4401  AGCTCCAGAA CTCCTGGGCG GACCGTCAGT CTTCCTCTTC
   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  GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC
   ACGCCTCCCG
4901  TGTTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ACAGCAAGCT
   CACCGTGGAC
4951  AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG
   TGATGCATGA
5001  GGCTCTGCAC AACCACTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG
   TCTCCGGGTA
5051  AATGA
```

pSYNFVIII 010 단백질 서열-(이중 사슬 FVIIIFc) (서열 번호 126)

```
   1  MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQSDL
   GELPVDARFP
  51  PRVPKSFPFN TSVVYKKTLF 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
```

[0662]

```
 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  NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV
  FDSLQLSVCL
 651  HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF
  PFSGETVFMS
 701  MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYYED
  SYEDISAYLL
 751  SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQREITRTTL QSDQEEIDYD
  DTISVEMKKE
 801  DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP
  HVLRNRAQSG
 851  SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA
  EVEDNIMVTF
 901  RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPRKN FVKPNETKTY
  FWKVQHHMAP
 951  TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP
  AHGRQVTVQE
1001  FALFFTIFDE TKSWYFTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN
  YRFHAINGYI
1051  MDTLPGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV
  RKKEEYKMAL
1101  YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL
  VYSNKCQTPL
1151  GMASGHIRDF QITASGQYGQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK
  EPFSWIKVDL
1201  LAPMIIHGIK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY
  RGNSTGTLMV
1251  FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME
  LMGCDLNSCS
1301  MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR
  SNAWRPQVNN
1351  PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLLTSM YVKEFLISSS
  QDGHQWTLFF
1401  QNGKVKVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH
  QIALRMEVLG
1451  CEAQDLYDKT 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 SPGK*
```

[0663]

[0664] 실시예 14: A형 혈우병 마우스에서 3배 초과의 반감기 연장을 갖는 새로운 유형의 응고 VIII 인자 분자

[0665] 2개의 폴리펩타이드를 포함하도록 새로운 유형의 FVIII 분자를 설계하였다; 하나는 FVIII 서열 내에 하나 이상의 위치에서 삽입된 XTEN을 갖는 단일 사슬 B 도메인 결실(BDD) FVIII로 이루어지고, 하나는 VWF의 D'D3 구역으로 이루어짐. 각각의 폴리펩타이드는 또한 IgG1의 Fc 구역에 재조합으로 융합되어 D'D3 구역이 FVIII 모이어티에 결합하도록 정확히 정렬되게 한다. 생성된 FVIII 변이체를 일시적 형질감염에 의해 HEK 293 세포에서 발현시키고 순화 배지로부터 정제하였다. FVIII 활성을 FVIII 발색 검정에 의해 평가하고, FVIII 넉아웃(HemA) 및 FVIII/VWF 이중 넉아웃(DKO) 마우스 둘 다에서 약동학적 특성을 평가하였다.

[0666] XTEN 및 VWF의 D'D3 구역의 rFVIII로의 편입은 이의 순환 반감기를 연장시키면서 내인성 VWF로부터의 융합 단백질의 청소의 언커플링을 발생시켰다. 이 융합 입체구성에서의 FVIII은, 바이오레이어 간섭법(옥테트) 분석에 의해 측정된 바대로, VWF와의 상호작용을 완전히 차폐하였다. 이와 일치하게, HemA 및 DKO 마우스에서의 이의 약동학적 프로필은 동일한 것으로 발견되어, 마우스에서의 이의 청소 속도가 VWF로부터 효과적으로 분리된다는 것을 나타낸다. XTEN을 삽입하기 위한 XTEN 길이 및 위치의 최적화는, BDD-FVIII에 비해 4배 개선을 나타내는 HemA 마우스에서의 30시간 이하의 순환 반감기에 도달하는, VWF 제한(16시간)을 초과한 단백질의 하위세트를 확인하였다. 중요한 것은, 이 단백질이 FVIII 발색 검정에 의해 판단된 바대로 이의 기능을 유지한다는 것이다.

[0667] VWF 의존성은 치료학적 FVIII의 반감기에 대한 기본적인 제한을 설정하였다. VWF 청소 경로로부터의 FVIII의 언커플링은, VWF의 D'D3 구역 및 XTEN의 융합에 의해 반감기를 연장시키면서, 4배 반감기 연장을 갖는 신규한 FVIII 분자를 생성시켰다. 이는 오래 지속되는 FVIII의 개발에 있어서의 산업 전체의 노력을 통해 관찰된 반감기 제한을 초과한 조작된 FVIII의 처음의 보고이어서, A형 혈우병의 예방학적 치료에서의 가능한 상당한 진전을 나타낸다.

표 25

FVIII-XTEN-Fc 및 VWF-Fc 작제물의 단백질 서열

FVIII 195 단백질 서열 (아미노산 1656번 및 1900번에서의 2개의 144 AE XTEN을 갖는 이중 사슬 FVIIIFc) (서열 번호 105)

```
   1  MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQ
  GELPVDARFP
  51  PRVPKSFPFN TSVVYKKTLF 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  NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV
  FDSLQLSVCL
 651  HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF
  PFSGETVFMS
 701  MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYYED
  SYEDISAYLL
 751  SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQREITRTTL QGAPGTPGSG
  TASSSPGASP
 801  GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSPSAST
  GTGPGTPGSG
 851  TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG
  SPGSSTPSGA
 901  TGSPGSSTPS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SSDQEEIDYD
  DTISVEMKKE
 951  DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP
  HVLRNRAQSG
1001  SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA
  EVEDNIMVTF
1051  RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPRKN FVKPNETKTY
  FWKVQHHMAP
1101  TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP
  AHGRQVTVQE
1151  FALFFTIFDE TKSWYFTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG
  SEPATSGSET
1201  PGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS
  TEPSEGSAPG
1251  TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGSP TSTEEGSPAG
  SPTSTEEGTS
```

[0668]

```
1301  ESATPESGPG TSTEPSEGSA PGASSAPCNI QMEDPTFKEN
  YRFHAINGYI
1351  MDTLPGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV
  RKKEEYKMAL
1401  YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL
  VYSNKCQTPL
1451  GMASGHIRDF QITASGQYGQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK
  EPFSWIKVDL
1501  LAPMIIHGIK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY
  RGNSTGTLMV
1551  FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME
  LMGCDLNSCS
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 단백질 서열(26번, 1656번 및 1900번 아미노산에서의 3개의 144 AE XTEN을 갖는 이중 사슬 FVIIIFc)(서열 번호 106)

```
  1       MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQSDL
  GELPVGAPGS
 51  SPSASTGTGP GSSPSASTGT GPGASPGTSS TGSPGASPGT
  SSTGSPGSST
101  PSGATGSPGS SPSASTGTGP GASPGTSSTG SPGSSPSAST
  GTGPGTPGSG
151  TASSSPGSST PSGATGSPGS STPSGATGSP GASPGTSSTG
  SPASSDARFP
201  PRVPKSFPFN TSVVYKKTLF 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  WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR
  KYKKVRFMAY
601  TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR
  PYNIYPHGIT
```

[0669]

```
 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 DKNTGDYYED
  SYEDISAYLL
 901  SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQREITRTTL QGAPGTPGSG
  TASSSPGASP
 951  GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSPSAST
  GTGPGTPGSG
1001  TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG
  SPGSSTPSGA
1051  TGSPGSSTPS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SSDQEEIDYD
  DTISVEMKKE
1101  DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP
  HVLRNRAQSG
1151  SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA
  EVEDNIMVTF
1201  RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPRKN FVKPNETKTY
  FWKVQHHMAP
1251  TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP
  AHGRQVTVQE
1301  FALFFTIFDE TKSWYFTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG
  SEPATSGSET
1351  PGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS
  TEPSEGSAPG
1401  TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGSP TSTEEGSPAG
  SPTSTEEGTS
1451  ESATPESGPG TSTEPSEGSA PGASSAPCNI QMEDPTFKEN
  YRFHAINGYI
1501  MDTLPGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV
  RKKEEYKMAL
1551  YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL
  VYSNKCQTPL
1601  GMASGHIRDF QITASGQYGQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK
  EPFSWIKVDL
1651  LAPMIIHGIK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY
  RGNSTGTLMV
1701  FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME
  LMGCDLNSCS
1751  MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR
  SNAWRPQVNN
1801  PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLLTSM YVKEFLISSS
  QDGHQWTLFF
1851  QNGKVKVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH
  QIALRMEVLG
1901  CEAQDLYDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
  SRTPEVTCVV
1951  VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
  SVLTVLHQDW
2001  LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
  SRDELTKNQV
```

[0670]

2051 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS
FFLYSKLTVD
2101 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

FVIII 199 단백질 서열(1656번 및 1900번 아미노산에서의
3개의 144 AE XTEN을 갖는 단일 사슬 FVIIIFc)(서열 번호 107)

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQSDL
GELPVDARFP
51 PRVPKSFPFN TSVVYKKTLF 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 NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV
FDSLQLSVCL
651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF
PFSGETVFMS
701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYYED
SYEDISAYLL
751 SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQAEITRTTL QGAPGTPGSG
TASSSPGASP
801 GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSPSAST
GTGPGTPGSG
851 TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG
SPGSSTPSGA
901 TGSPGSSTPS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SSDQEEIDYD
DTISVEMKKE
951 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP
HVLRNRAQSG
1001 SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA
EVEDNIMVTF
1051 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPRKN FVKPNETKTY
FWKVQHHMAP
1101 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP
AHGRQVTVQE
1151 FALFFTIFDE TKSWYFTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG
SEPATSGSET

[0671]

```
1201  PGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS
   TEPSEGSAPG
1251  TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGSP TSTEEGSPAG
   SPTSTEEGTS
1301  ESATPESGPG TSTEPSEGSA PGASSAPCNI QMEDPTFKEN
   YRFHAINGYI
1351  MDTLPGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV
   RKKEEYKMAL
1401  YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL
   VYSNKCQTPL
1451  GMASGHIRDF QITASGQYGQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK
   EPFSWIKVDL
1501  LAPMIIHGIK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY
   RGNSTGTLMV
1551  FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME
   LMGCDLNSCS
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 201 단백질 서열(26번, 1656번 및 1900번 아미노산에서의 3개의 144 AE XTEN을 갖는 단일 사슬 FVIIIFc)(서열 번호 108)

```
  1  MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQSDL
   GELPVGAPGS
 51  SPSASTGTGP GSSPSASTGT GPGASPGTSS TGSPGASPGT
   SSTGSPGSST
101  PSGATGSPGS SPSASTGTGP GASPGTSSTG SPGSSPSAST
   GTGPGTPGSG
151  TASSSPGSST PSGATGSPGS STPSGATGSP GASPGTSSTG
   SPASSDARFP
201  PRVPKSFPFN TSVVYKKTLF 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
```

[0672]

```
 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  NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV
  FDSLQLSVCL
 801  HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF
  PFSGETVFMS
 851  MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYYED
  SYEDISAYLL
 901  SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQAEITRTTL QGAPGTPGSG
  TASSSPGASP
 951  GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSPSAST
  GTGPGTPGSG
1001  TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG
  SPGSSTPSGA
1051  TGSPGSSTPS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SSDQEEIDYD
  DTISVEMKKE
1101  DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP
  HVLRNRAQSG
1151  SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA
  EVEDNIMVTF
1201  RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPRKN FVKPNETKTY
  FWKVQHHMAP
1251  TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP
  AHGRQVTVQE
1301  FALFFTIFDE TKSWYFTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG
  SEPATSGSET
1351  PGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS
  TEPSEGSAPG
1401  TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGSP TSTEEGSPAG
  SPTSTEEGTS
1451  ESATPESGPG TSTEPSEGSA PGASSAPCNI QMEDPTFKEN
  YRFHAINGYI
1501  MDTLPGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV
  RKKEEYKMAL
1551  YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL
  VYSNKCQTPL
1601  GMASGHIRDF QITASGQYGQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK
  EPFSWIKVDL
1651  LAPMIIHGIK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY
  RGNSTGTLMV
1701  FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME
  LMGCDLNSCS
1751  MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR
  SNAWRPQVNN
1801  PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLLTSM YVKEFLISSS
  QDGHQWTLFF
1851  QNGKVKVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH
  QIALRMEVLG
1901  CEAQDLYDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
  SRTPEVTCVV
```

[0673]

1951 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
SVLTVLHQDW
2001 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
SRDELTKNQV
2051 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS
FFLYSKLTVD
2101 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

FVIII 203 단백질 서열(B-도메인에서의 1개의 288AE XTEN 및 1900번 아미노산에서의 1개의 144 AE XTEN인 2개의 AE XTEN을 갖는 단일 사슬 FVIIIFc)(서열 번호 109)

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQSDL
GELPVDARFP
51 PRVPKSFPFN TSVVYKKTLF 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 NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV
FDSLQLSVCL
651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF
PFSGETVFMS
701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYYED
SYEDISAYLL
751 SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET
PGTSESATPE
801 SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG
SPAGSPTSTE
851 EGTSESATPE SGPGSEPATS 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

[0674]

```
1101  EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR
   AQSGSVPQFK
1151  KVVFQEFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI
   MVTFRNQASR
1201  PYSFYSSLIS YEEDQRQGAE PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH
   HMAPTKDEFD
1251  CKAWAYFSDV DLEKDVHSGL IGPLLVCHTN TLNPAHGRQV
   TVQEFALFFT
1301  IFDETKSWYF TENMERNCRG APTSESATPE SGPGSEPATS
   GSETPGTSES
1351  ATPESGPGSE PATSGSETPG TSESATPESG PGTSTEPSEG
   SAPGTSESAT
1401  PESGPGSPAG SPTSTEEGSP AGSPTSTEEG SPAGSPTSTE
   EGTSESATPE
1451  SGPGTSTEPS EGSAPGASSA 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 LRMELMGCDL
   NSCSMPLGME
1751  SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP
   QVNNPKEWLQ
1801  VDFQKTMKVT GVTTQGVKSL 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*
```

FVIII 204 단백질 서열(B-도메인에서의 1개의 288AE XTEN 및 403번 아미노산에서의 1개의 144 AE XTEN인 2개의 AE XTEN을 갖는 단일 사슬 FVIIIFc)(서열 번호 110)

```
   1  MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQSDL
   GELPVDARFP
  51  PRVPKSFPFN TSVVYKKTLF VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL
   LGPTIQAEVY
 101  DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR
   EKEDDKVFPG
 151  GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG
   LIGALLVCRE
 201  GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD
   AASARAWPKM
```

[0675]

```
 251  HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL
  EGHTFLVRNH
 301  RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME
  AYVKVDSCPE
 351  EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI
  RSVAKKHPKT
 401  WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDGAPTSTEP SEGSAPGSPA
  GSPTSTEEGT
 451  STEPSEGSAP GTSTEPSEGS APGTSESATP ESGPGTSTEP
  SEGSAPGTSE
 501  SATPESGPGS EPATSGSETP GTSTEPSEGS APGTSTEPSE
  GSAPGTSESA
 551  TPESGPGTSE SATPESGPGA SSDRSYKSQY LNNGPQRIGR
  KYKKVRFMAY
 601  TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL 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 DKNTGDYYED
  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  KVVFQEFTDG 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
  KVDLLAPMII
```

[0676]

```
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  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*
```

FVIII 205 단백질 서열(B-도메인에서의 1 개의 288AE XTEN 및 18 번 아미노산에서의 1 개의 144 AE XTEN 인 2 개의 AE XTEN 을 갖는 단일 사슬 FVIIIFc)(서열 번호 111)

```
   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 TSVVYKKTLF 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  WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR
  KYKKVRFMAY
 601  TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR
  PYNIYPHGIT
 651  DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP
  TKSDPRCLTR
 701  YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR
  NVILFSVFDE
```

[0677]

```
 751  NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV
   FDSLQLSVCL
 801  HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF
   PFSGETVFMS
 851  MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYYED
   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  KVVFQEFTDG 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
   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  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*
```

[0678]

pSYN FVIII 266 단백질 서열(18번 아미노산에서의 42 AE-XTEN 및
B-도메인에서의 288 AE XTEN을 갖는 FVIII Fc) 서열 번호 112

```
   1  MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQGAP
  GSPAGSPTST
  51  EEGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPASSS DLGELPVDAR
  FPPRVPKSFP
 101  FNTSVVYKKT LFVEFTDHLF NIAKPRPPWM GLLGPTIQAE
  VYDTVVITLK
 151  NMASHPVSLH AVGVSYWKAS EGAEYDDQTS QREKEDDKVF
  PGGSHTYVWQ
 201  VLKENGPMAS DPLCLTYSYL SHVDLVKDLN SGLIGALLVC
  REGSLAKEKT
 251  QTLHKFILLF AVFDEGKSWH SETKNSLMQD RDAASARAWP
  KMHTVNGYVN
 301  RSLPGLIGCH RKSVYWHVIG MGTTPEVHSI FLEGHTFLVR
  NHRQASLEIS
 351  PITFLTAQTL LMDLGQFLLF CHISSHQHDG MEAYVKVDSC
  PEEPQLRMKN
 401  NEEAEDYDDD LTDSEMDVVR FDDDNSPSFI QIRSVAKKHP
  KTWVHYIAAE
 451  EEDWDYAPLV LAPDDRSYKS QYLNNGPQRI GRKYKKVRFM
  AYTDETFKTR
 501  EAIQHESGIL GPLLYGEVGD TLLIIFKNQA SRPYNIYPHG
  ITDVRPLYSR
 551  RLPKGVKHLK DFPILPGEIF KYKWTVTVED GPTKSDPRCL
  TRYYSSFVNM
 601  ERDLASGLIG PLLICYKESV DQRGNQIMSD KRNVILFSVF
  DENRSWYLTE
 651  NIQRFLPNPA GVQLEDPEFQ ASNIMHSING YVFDSLQLSV
  CLHEVAYWYI
 701  LSIGAQTDFL SVFFSGYTFK HKMVYEDTLT LFPFSGETVF
  MSMENPGLWI
 751  LGCHNSDFRN RGMTALLKVS SCDKNTGDYY EDSYEDISAY
  LLSKNNAIEP
 801  RSFSQNGAPG 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 GLIGPLLVCH TNTLNPAHGR QVTVQEFALF
  FTIFDETKSW
```

[0679]

```
1351  YFTENMERNC RAPCNIQMED PTFKENYRFH AINGYIMDTL
   PGLVMAQDQR
1401  IRWYLLSMGS NENIHSIHFS GHVFTVRKKE EYKMALYNLY
   PGVFETVEML
1451  PSKAGIWRVE CLIGEHLHAG MSTLFLVYSN KCQTPLGMAS
   GHIRDFQITA
1501  SGQYGQWAPK LARLHYSGSI NAWSTKEPFS WIKVDLLAPM
   IIHGIKTQGA
1551  RQKFSSLYIS QFIIMYSLDG KKWQTYRGNS TGTLMVFFGN
   VDSSGIKHNI
1601  FNPPIIARYI RLHPTHYSIR STLRMELMGC DLNSCSMPLG
   MESKAISDAQ
1651  ITASSYFTNM FATWSPSKAR LHLQGRSNAW RPQVNNPKEW
   LQVDFQKTMK
1701  VTGVTTQGVK SLLTSMYVKE FLISSSQDGH 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 ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
   QQGNVFSCSV
2001  MHEALHNHYT QKSLSLSPGK *
```

pSYN FVIII 267 단백질 서열(18번 아미노산에서의 72 AE-XTEN 및 B-도메인에서의 288 AE XTEN을 갖는 FVIII Fc) 서열 번호 113

```
  1  MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQGAP
   TSESATPESG
 51  PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS
   ESATPESGPG
101  TSTEPSEGSA PGASSSDLGE LPVDARFPPR VPKSFPFNTS
   VVYKKTLFVE
151  FTDHLFNIAK PRPPWMGLLG PTIQAEVYDT VVITLKNMAS
   HPVSLHAVGV
201  SYWKASEGAE YDDQTSQREK EDDKVFPGGS 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  EMDVVRFDDD NSPSFIQIRS VAKKHPKTWV HYIAAEEEDW
   DYAPLVLAPD
501  DRSYKSQYLN NGPQRIGRKY KKVRFMAYTD ETFKTREAIQ
   HESGILGPLL
551  YGEVGDTLLI IFKNQASRPY NIYPHGITDV RPLYSRRLPK
   GVKHLKDFPI
601  LPGEIFKYKW TVTVEDGPTK SDPRCLTRYY SSFVNMERDL
   ASGLIGPLLI
```

[0680]

```
 651  CYKESVDQRG NQIMSDKRNV ILFSVFDENR SWYLTENIQR
  FLPNPAGVQL
 701  EDPEFQASNI MHSINGYVFD SLQLSVCLHE VAYWYILSIG
  AQTDFLSVFF
 751  SGYTFKHKMV YEDTLTLFPF SGETVFMSME NPGLWILGCH
  NSDFRNRGMT
 801  ALLKVSSCDK NTGDYYEDSY EDISAYLLSK NNAIEPRSFS
  QNGAPGTSES
 851  ATPESGPGSE PATSGSETPG TSESATPESG PGSEPATSGS
  ETPGTSESAT
 901  PESGPGTSTE PSEGSAPGSP AGSPTSTEEG TSESATPESG
  PGSEPATSGS
 951  ETPGTSESAT PESGPGSPAG SPTSTEEGSP AGSPTSTEEG
  TSTEPSEGSA
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 SPHVLRNRAQ SGSVPQFKKV VFQEFTDGSF
  TQPLYRGELN
1251  EHLGLLGPYI RAEVEDNIMV TFRNQASRPY SFYSSLISYE
  EDQRQGAEPR
1301  KNFVKPNETK TYFWKVQHHM APTKDEFDCK AWAYFSDVDL
  EKDVHSGLIG
1351  PLLVCHTNTL NPAHGRQVTV QEFALFFTIF DETKSWYFTE
  NMERNCRAPC
1401  NIQMEDPTFK ENYRFHAING YIMDTLPGLV MAQDQRIRWY
  LLSMGSNENI
1451  HSIHFSGHVF TVRKKEEYKM ALYNLYPGVF ETVEMLPSKA
  GIWRVECLIG
1501  EHLHAGMSTL FLVYSNKCQT PLGMASGHIR DFQITASGQY
  GQWAPKLARL
1551  HYSGSINAWS TKEPFSWIKV DLLAPMIIHG IKTQGARQKF
  SSLYISQFII
1601  MYSLDGKKWQ TYRGNSTGTL MVFFGNVDSS GIKHNIFNPP
  IIARYIRLHP
1651  THYSIRSTLR MELMGCDLNS CSMPLGMESK AISDAQITAS
  SYFTNMFATW
1701  SPSKARLHLQ GRSNAWRPQV NNPKEWLQVD FQKTMKVTGV
  TTQGVKSLLT
1751  SMYVKEFLIS SSQDGHQWTL FFQNGKVKVF QGNQDSFTPV
  VNSLDPPLLT
1801  RYLRIHPQSW VHQIALRMEV LGCEAQDLYD KTHTCPPCPA
  PELLGGPSVF
1851  LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG
  VEVHNAKTKP
1901  REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNKALPAP
  IEKTISKAKG
1951  QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW
  ESNGQPENNY
2001  KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA
  LHNHYTQKSL
```

[0681]

2051 SLSPGK*

pSYN FVIII 268 단백질 서열(18번 아미노산에서의 144 AE-XTEN을 갖는 FVIII Fc)
서열 번호 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 TSVVYKKTLF 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  WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR
  KYKKVRFMAY
 601  TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL 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 DKNTGDYYED
  SYEDISAYLL
 901  SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQAEITRTTL QSDQEEIDYD
  DTISVEMKKE
 951  DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP
  HVLRNRAQSG
1001  SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA
  EVEDNIMVTF
1051  RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPRKN FVKPNETKTY
  FWKVQHHMAP
1101  TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP
  AHGRQVTVQE
1151  FALFFTIFDE TKSWYFTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN
  YRFHAINGYI
1201  MDTLPGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV
  RKKEEYKMAL
1251  YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL
  VYSNKCQTPL
```

[0682]

```
1301  GMASGHIRDF QITASGQYGQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK
   EPFSWIKVDL
1351  LAPMIIHGIK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY
   RGNSTGTLMV
1401  FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME
   LMGCDLNSCS
1451  MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR
   SNAWRPQVNN
1501  PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLLTSM YVKEFLISSS
   QDGHQWTLFF
1551  QNGKVKVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH
   QIALRMEVLG
1601  CEAQDLYDKT HTCPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
   SRTPEVTCVV
1651  VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
   SVLTVLHQDW
1701  LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
   SRDELTKNQV
1751  SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS
   FFLYSKLTVD
1801  KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*
```

pSYN FVIII 269 단백질 서열(18번 아미노산에서의 72 AE-XTEN을 갖는 FVIII Fc)
서열 번호 115

```
   1  MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQGAP
   TSESATPESG
  51  PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS
   ESATPESGPG
 101  TSTEPSEGSA PGASSSDLGE LPVDARFPPR VPKSFPFNTS
   VVYKKTLFVE
 151  FTDHLFNIAK PRPPWMGLLG PTIQAEVYDT VVITLKNMAS
   HPVSLHAVGV
 201  SYWKASEGAE YDDQTSQREK EDDKVFPGGS 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  EMDVVRFDDD NSPSFIQIRS VAKKHPKTWV HYIAAEEEDW
   DYAPLVLAPD
 501  DRSYKSQYLN NGPQRIGRKY KKVRFMAYTD ETFKTREAIQ
   HESGILGPLL
 551  YGEVGDTLLI IFKNQASRPY NIYPHGITDV RPLYSRRLPK
   GVKHLKDFPI
 601  LPGEIFKYKW TVTVEDGPTK SDPRCLTRYY SSFVNMERDL
   ASGLIGPLLI
 651  CYKESVDQRG NQIMSDKRNV ILFSVFDENR SWYLTENIQR
   FLPNPAGVQL
 701  EDPEFQASNI MHSINGYVFD SLQLSVCLHE VAYWYILSIG
   AQTDFLSVFF
 751  SGYTFKHKMV YEDTLTLFPF SGETVFMSME NPGLWILGCH
   NSDFRNRGMT
```

[0683]

```
 801  ALLKVSSCDK NTGDYYEDSY EDISAYLLSK NNAIEPRSFS
  QNPPVLKRHQ
 851  AEITRTTLQS DQEEIDYDDT ISVEMKKEDF DIYDEDENQS
  PRSFQKKTRH
 901  YFIAAVERLW DYGMSSSPHV LRNRAQSGSV PQFKKVVFQE
  FTDGSFTQPL
 951  YRGELNEHLG LLGPYIRAEV EDNIMVTFRN QASRPYSFYS
  SLISYEEDQR
1001  QGAEPRKNFV KPNETKTYFW KVQHHMAPTK DEFDCKAWAY
  FSDVDLEKDV
1051  HSGLIGPLLV CHTNTLNPAH 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 PMIIHGIKTQ
  GARQKFSSLY
1301  ISQFIIMYSL DGKKWQTYRG NSTGTLMVFF GNVDSSGIKH
  NIFNPPIIAR
1351  YIRLHPTHYS IRSTLRMELM GCDLNSCSMP LGMESKAISD
  AQITASSYFT
1401  NMFATWSPSK ARLHLQGRSN AWRPQVNNPK EWLQVDFQKT
  MKVTGVTTQG
1451  VKSLLTSMYV KEFLISSSQD GHQWTLFFQN GKVKVFQGNQ
  DSFTPVVNSL
1501  DPPLLTRYLR IHPQSWVHQI ALRMEVLGCE AQDLYDKTHT
  CPPCPAPELL
1551  GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF
  NWYVDGVEVH
1601  NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN
  KALPAPIEKT
1651  ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS
  DIAVEWESNG
1701  QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC
  SVMHEALHNH
1751  YTQKSLSLSP GK*
```

pSYNFVIII 271 단백질 서열(18번 아미노산에서의 42 AE-XTEN을 갖는 FVIII Fc)
서열 번호 116

```
   1  MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQGAP
  GSPAGSPTST
  51  EEGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPASSS DLGELPVDAR
  FPPRVPKSFP
 101  FNTSVVYKKT LFVEFTDHLF NIAKPRPPWM GLLGPTIQAE
  VYDTVVITLK
 151  NMASHPVSLH AVGVSYWKAS EGAEYDDQTS QREKEDDKVF
  PGGSHTYVWQ
 201  VLKENGPMAS DPLCLTYSYL SHVDLVKDLN SGLIGALLVC
  REGSLAKEKT
 251  QTLHKFILLF AVFDEGKSWH SETKNSLMQD RDAASARAWP
  KMHTVNGYVN
 301  RSLPGLIGCH RKSVYWHVIG MGTTPEVHSI FLEGHTFLVR
  NHRQASLEIS
```

[0684]

```
 351  PITFLTAQTL LMDLGQFLLF CHISSHQHDG MEAYVKVDSC
  PEEPQLRMKN
 401  NEEAEDYDDD LTDSEMDVVR FDDDNSPSFI QIRSVAKKHP
  KTWVHYIAAE
 451  EEDWDYAPLV LAPDDRSYKS QYLNNGPQRI GRKYKKVRFM
  AYTDETFKTR
 501  EAIQHESGIL GPLLYGEVGD TLLIIFKNQA SRPYNIYPHG
  ITDVRPLYSR
 551  RLPKGVKHLK DFPILPGEIF KYKWTVTVED GPTKSDPRCL
  TRYYSSFVNM
 601  ERDLASGLIG PLLICYKESV DQRGNQIMSD KRNVILFSVF
  DENRSWYLTE
 651  NIQRFLPNPA GVQLEDPEFQ ASNIMHSING YVFDSLQLSV
  CLHEVAYWYI
 701  LSIGAQTDFL SVFFSGYTFK HKMVYEDTLT LFPFSGETVF
  MSMENPGLWI
 751  LGCHNSDFRN RGMTALLKVS SCDKNTGDYY EDSYEDISAY
  LLSKNNAIEP
 801  RSFSQNPPVL KRHQAEITRT TLQSDQEEID YDDTISVEMK
  KEDFDIYDED
 851  ENQSPRSFQK KTRHYFIAAV ERLWDYGMSS SPHVLRNRAQ
  SGSVPQFKKV
 901  VFQEFTDGSF TQPLYRGELN EHLGLLGPYI RAEVEDNIMV
  TFRNQASRPY
 951  SFYSSLISYE EDQRQGAEPR KNFVKPNETK TYFWKVQHHM
  APTKDEFDCK
1001  AWAYFSDVDL EKDVHSGLIG PLLVCHTNTL NPAHGRQVTV
  QEFALFFTIF
1051  DETKSWYFTE NMERNCRAPC NIQMEDPTFK ENYRFHAING
  YIMDTLPGLV
1101  MAQDQRIRWY LLSMGSNENI HSIHFSGHVF TVRKKEEYKM
  ALYNLYPGVF
1151  ETVEMLPSKA GIWRVECLIG EHLHAGMSTL FLVYSNKCQT
  PLGMASGHIR
1201  DFQITASGQY GQWAPKLARL HYSGSINAWS TKEPFSWIKV
  DLLAPMIIHG
1251  IKTQGARQKF SSLYISQFII MYSLDGKKWQ TYRGNSTGTL
  MVFFGNVDSS
1301  GIKHNIFNPP IIARYIRLHP THYSIRSTLR MELMGCDLNS
  CSMPLGMESK
1351  AISDAQITAS SYFTNMFATW SPSKARLHLQ GRSNAWRPQV
  NNPKEWLQVD
1401  FQKTMKVTGV TTQGVKSLLT SMYVKEFLIS SSQDGHQWTL
  FFQNGKVKVF
1451  QGNQDSFTPV VNSLDPPLLT RYLRIHPQSW VHQIALRMEV
  LGCEAQDLYD
1501  KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC
  VVVDVSHEDP
1551  EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ
  DWLNGKEYKC
1601  KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN
  QVSLTCLVKG
1651  FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT
  VDKSRWQQGN
1701  VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK*
```

[0685]

pSYN FVIII 단백질 서열 272(18번 아미노산에서의 144 AE XTEN 및
B-도메인-무 Fc에서의 244 AE XTEN을 갖는 FVIII) 서열 번호 117

```
   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 TSVVYKKTLF 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  WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR
  KYKKVRFMAY
 601  TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL 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 DKNTGDYYED
  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  KVVFQEFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI
  MVTFRNQASR
```

[0686]

```
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
   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 단백질 서열(VWF D1D2D'D3-48aa 길이의 트롬빈 개열 가능한 GS 링커-Fc) 서열 번호 118

```
 1   MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS
   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  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 IQLPLLKGDL RIQHTVTASV
   RLSYGEDLQM
501  DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG
   LAEPRVEDFG
551  NAWKLHGDCQ DLQKQHSDPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP
   TFEACHRAVS
601  PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV
   AWREPGRCEL
651  NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP
   PGLYMDERGD
701  CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM
   SGVPGSLLPD
```

[0687]

```
 751  AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK
  TCQNYDLECM
 801  SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE
  TVKIGCNTCV
 851  CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ
  YVLVQDYCGS
 901  NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE
  VNVKRPMKDE
 951  THFEVVESGR YIILLLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE
  KVCGLCGNFD
1001  GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD
  SSPATCHNNI
1051  MKQTMVDSSC RILTSDVFQD CNKLVDPEPY LDVCIYDTCS
  CESIGDCAAF
1101  CDTIAAYAHV CAQHGKVVTW RTATLCPQSC EERNLRENGY
  EAEWRYNSCA
1151  PACQVTCQHP EPLACPVQCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC
  VDPEDCPVCE
1201  VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP
  ISGGGGSGGG
1251  GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSLVPRGSGG GGSGGGGSDK
  THTCPPCPAP
1301  ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
  VKFNWYVDGV
1351  EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
  VSNKALPAPI
1401  EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF
  YPSDIAVEWE
1451  SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
  FSCSVMHEAL
1501  HNHYTQKSLS LSPGK*
```

pSYN VWF 034 단백질 서열(VWF D1D2D'D3-288AE XTEN-35aa 길이의 트롬빈 개열 가능한 GS 링커-Fc) 서열 번호 119

```
 1   MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS
  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  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 IQLPLLKGDL RIQHTVTASV
  RLSYGEDLQM
501  DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG
  LAEPRVEDFG
```

[0688]

```
 551  NAWKLHGDCQ DLQKQHSDPC 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 HQGKEYAPGE
  TVKIGCNTCV
 851  CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ
  YVLVQDYCGS
 901  NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE
  VNVKRPMKDE
 951  THFEVVESGR YIILLLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE
  KVCGLCGNFD
1001  GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD
  SSPATCHNNI
1051  MKQTMVDSSC RILTSDVFQD CNKLVDPEPY LDVCIYDTCS
  CESIGDCAAF
1101  CDTIAAYAHV CAQHGKVVTW RTATLCPQSC EERNLRENGY
  EAEWRYNSCA
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
  GGSLVPRGSG
1551  GDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV
  TCVVVDVSHE
1601  DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL
  HQDWLNGKEY
1651  KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT
  KNQVSLTCLV
1701  KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK
  LTVDKSRWQQ
1751  GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*
```

pSYN VWF 036 단백질 서열(VWF D1D2D'D-98aa 길이의 트롬빈 개열 가능한 GS 링커-Fc)
서열 번호 120

```
   1  MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS
  DFVNTFDGSM
  51  YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE
  FFDIHLFVNG
```

[0689]

```
 101  TVTQGDQRVS 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 IQLPLLKGDL RIQHTVTASV
  RLSYGEDLQM
 501  DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG
  LAEPRVEDFG
 551  NAWKLHGDCQ DLQKQHSDPC 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 HQGKEYAPGE
  TVKIGCNTCV
 851  CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ
  YVLVQDYCGS
 901  NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE
  VNVKRPMKDE
 951  THFEVVESGR YIILLLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE
  KVCGLCGNFD
1001  GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD
  SSPATCHNNI
1051  MKQTMVDSSC RILTSDVFQD CNKLVDPEPY LDVCIYDTCS
  CESIGDCAAF
1101  CDTIAAYAHV CAQHGKVVTW RTATLCPQSC EERNLRENGY
  EAEWRYNSCA
1151  PACQVTCQHP EPLACPVQCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC
  VDPEDCPVCE
1201  VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP
  ISGGGGSGGG
1251  GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG
  GSGGGGSGGG
1301  GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSLVPRGSGG GGSGGGGSDK
  THTCPPCPAP
1351  ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE
  VKFNWYVDGV
1401  EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK
  VSNKALPAPI
1451  EKTISKAKGQ PREPQVYTLP PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF
  YPSDIAVEWE
```

[0690]

```
1501  SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
  FSCSVMHEAL
1551  HNHYTQKSLS LSPGK*
```

pSYN Fc-015 단백질 서열(IgG-Fc 도메인) 서열 번호 121

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

[0691]

[0692] 실시예 15: FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 이종이합체는 야생형 BDD-FVIII과 비교하여 정상 FVIII 비활성을 유지하였다.

[0693] FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 이종이합체의 FVIII 비활성을 결정하였다. 이종이합체를 2단계 크로마토그래피 공정을 이

용하여 정제하였다. 약음이온 교환 수지, 이어서 친화도 크로마토그래피를 이용하였다. 최종 정제된 생성물은 SEC-HPLC에 의해 허용되는 순도를 갖는다. 비활성을 FVIII 발색 검정 및 A280 농도로 측정된 바대로 B 도메인 결실 FVIII(BDD-FVIII)과 비교하였다. 데이터가 표 26에 제시되어 있다. 모든 시험된 분자는 BDD-FVIII에 필적하는 FVIII 비활성을 나타냈다. 분자의 각각의 모이어티의 순도 및 존재를 SDS-PAGE 및 웨스턴 블로팅에 의해 확인하였다.

표 26

FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 이종이합체의 FVIII 비활성

작제물	FVIII 207 scBDDFVIII	FVIII-66 dcBDD FVIII)	FVIII 155/vWF31	FVIII 155/vWF39	FVIII 169/vWF31	FVIII 205/vWF31	FVIII 169/vWF34
측정된 비활성 (IU/nmol)	1473	1592	1534	1796	1511	1345	1505

[0694]

[0695] rFVIII-XTEN/D'D3 및 BDD-FVIII의 반감기를 HemA 마우스에서 비교하였다(도 15; 표 27). 도 15에 도시된 바대로, rFVIII-XTEN/D'D3은 BDD-FVIII에 의해 성취된 반감기보다 4배 긴 반감기를 성취하였다.

표 27

HemA 마우스에서의 rFVIII-XTEN/D'D3 및 BDD-FVIII

처리	5분 회수 (%)	HL (hr)	MRT (hr)	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
rFVIIIFc	78	16	20	2.9	57.8	0.35
rFVIII-XTEN/D'D3	86	30	36	1.8	63.4	0.57

[0696]

[0697] 실시예 16: 1단계 aPTT 검정에 의해 측정된 지혈에서의 FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 이종이합체의 효력(FVIII 활성)

[0698] 지혈에서의 FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 이종이합체의 효력을 표 28에 요약된 이의 FVIII 특이적 aPTT 활성에 대해 평가하였다. 표 28에 의해 입증된 바대로, VWF D'D3 단편의 부가 및 FVIII의 도메인내로의 XTEN의 삽입이 (FVIII155/VWF031 데이터 및 FVIII205/VWF031 데이터로 표시된 바대로) 이종이합체의 FVIII 특이적 aPTT 활성을 감소시키지만, FVIII B 도메인 구역 또는 VWF D'D3 단편의 C 말단에서의 XTEN 삽입은 (FVIII169/VWF031 데이터 및 FVIII169/VWF034 데이터로 표시된 바대로) FVIII 특이적 aPTT 활성에 부정적 영향을 갖지 않았다. 이중사슬 BDD-FVIII(dcBDD-FVIII)과 비교하여, FVIII155/VWF031, FVIII169/VWF031, FVIII169/VWF034 및 VWF205/VWF031은 각각 2.5배, 2.8배, 2.6배 및 5.5배로 특이적 aPTT 활성의 감소를 나타냈다.

표 28

FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 이종이합체의 FVIII 특이적 aPTT 활성

작제물	FVIII 207 scBDD-FVIII	FVIII-66 dcBDD-FVIII	FVIII 155/VWF31	FVIII 169/VWF31	FVIII 205/VWF31	FVIII 169/VWF34
측정된 특이적 aPTT 활성 (IU/nmol)	818±153	1188±213	448±111	416±70	214±38	436±189

[0699]

[0700] FVIII 특이적 aPTT 검정

[0701] FVIII 변이체를 선형 검정 범위(200 내지 1.6mU/㎖)로 aPTT 완충제(0.15M NaCl, 0.05M 트라이스-HCl, 1% BSA, pH 7.4)에 의해 희석하였다. 50㎕의 희석된 샘플 또는 표준품을 순차적으로 50㎕의 37℃의 나이브 인간 HemA 혼주된 혈장, 50㎕의 37℃의 aPTT 시약(액틴(ACTIN)(등록상표) FSL 활성화 세팔로플라스틴 시약 - Dade Behring, 기준품 B4219-2호)과 혼합하고, 37℃에서 4분 동안 항온처리하였다. 이후, 50㎕의 20mM $CaCl_2$(Dade Behring[기준품 ORF037호])를 반응 혼합물에 첨가하여 응고 반응을 개시시켰다. 각각의 샘플의 응고 시간($CaCl_2$의 첨가로부터 혈전 형성의 개시까지의 시간)을 이용하여, 제8 국제 표준 FVIII 농축물로 생성된 표준품에 대해 aPTT 활성을 계산하였다. OD280에 의해 측정된 각각의 분자의 단백질 농도에 대해 특이적 aPTT 활성을 계산하였다.

[0702] 실시예 17: HemA 마우스 꼬리 클립 출혈 모델에서의 FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc 이종이합체의 *생체내* 효율

[0703] 이종이합체의 지혈 효력을 추가로 평가하기 위해, HemA 마우스 꼬리 클립 출혈 모델에서 BDD-FVIII과 비교하여 FVIII169/VWF034 및 FVIII205/VWF031의 급성 효율을 평가하였다. HemA 마우스를 200, 65 및 20IU/kg에서 BDD-FVIII의 단일 IV 주사로 처리하여 꼬리 클립 손상 후 혈액 손실 대조군 수치를 생성하였다. 200IU/kg의 FVIII169/VWF034 또는 FVIII205/VWF031로 처리된 마우스로부터 손실된 혈액을 BDD-FVIII 치료된 대조군 마우스와 비교하여 지혈에 대한 이의 효력을 추산하였다. 비히클 처리 동물을 사용하여 모델에 대한 혈액 손실 기준치를 생성하였다. 도 16에 도시된 바대로, 비히클 처리 동물과 비교하여 모든 FVIII 치료군으로부터 상당한 혈액 손실 감소가 관찰되었다($p<0.05$). FVIII169/VWF034 및 FVIII205/VWF031 둘 다 HemA 마우스 꼬리 클립 모델에서 효과적이었다. BDD-FVIII과 비교하여, 65IU/kg의 BDD-FVIII 및 200IU/kg의 FVIII169/VWF034에 의해 성취된 유사한 혈액 손실 감소로 입증된 바대로 FVIII169/VWF034에 대해 약 3배 더 낮은 효력이 관찰되었다. FVIII205/VWF034에서처럼, 20IU/kg의 BDD-FVIII 및 200IU/kg의 FVIII205/VWF031에 의해 성취된 유사한 혈액 손실 감소로 입증된 바대로 10배 효력 감소가 관찰되었다.

[0704] FVIII69/VWF034 및 FVIII205/VWF031이 rBDD-FVIII과 비교하여 유사한 특이적 FVIII 발색 활성을 갖더라도, 이의 FVIII aPTT 활성 및 *생체내* 효력은 분자의 변형으로 인해 둘 다 감소하였다. 이 데이터는 FVIII 분자의 aPTT 활성이 FVIII 발색 활성보다 지혈에 대한 이의 *생체내* 효력을 예측하는 데 있어서 더 정확한 측정이라는 것을 나타낸다.

[0705] HemA 마우스 꼬리 클립 출혈 모델

[0706] 8주 내지 10주령의 수컷 HemA 마우스를 연구에 사용하였다. 꼬리 클립 손상 전에, 마우스를 50㎎/kg의 케타민/0.5㎎/kg의 덱스메데토미딘 칵테일로 마취시키고, 37℃ 가열 패드에 위치시켜 체온 유지를 도왔다. 이후, 마우스의 꼬리를 37℃ 물 중에 10분 동안 액침시켜 측정맥을 확장시켰다. 정맥 확장 후, rFVIII 또는 비히클 용액을 꼬리 정맥을 통해 주사하고, 5분 후, 꼬리의 원위의 1㎝를 직선 가장자리로 11호 메스를 사용하여 절단하였다. 보관 혈액을 30분 동안 13㎖의 37℃의 따뜻한 식염수로 수집하고, 이후 마우스를 양측 개흉술(bilateral thoracotomy)에 의해 계속 마취 중에 있게 하면서 안락사시켰다. 혈액을 그램 단위로 수집하기 전과 후의 혈액 수집 관의 질량 변화(1밀리리터(㎖)의 혈액 손실 용적(1g 질량 변화 = 1㎖ 혈액 손실)으로 바뀜)에 의해 중량측정법으로 혈액 손실을 정량화하였다.

[0707] 특정한 실시형태의 상기 설명은, 당해 분야의 기술 내의 지식을 적용함으로써, 다양한 용도에 이러한 특정한 실시형태는, 부당한 실험 없이, 본 발명의 일반 개념을 벗어나지 않으면서, 용이하게 변형 및/또는 적용할 수 있는 본 발명의 일반 성질을 더 완전히 밝힐 것이다. 따라서, 이러한 적용 및 변형은 본 명세서에 제시된 교시내용 및 가이드라인에 기초하여 개시된 실시형태의 의미 및 등가물 범위 내에 있는 것으로 의도된다. 본 명세서의 어법 또는 전문용어는 설명의 목적이고 예시가 아니어서, 본 명세서의 어법 또는 전문용어는 교시내용 및 가이드라인의 견지에서 당업자에 의해 해석되는 것으로 이해될 것이다.

[0708] 본 발명의 다른 실시형태는 본 명세서에 개시된 본 발명의 설명 및 실행의 고려사항으로부터 당해 분야의 당업자에게 명확할 것이다. 명세서 및 예는 오직 예시로 생각되는 것으로 의도되고, 본 발명의 진정한 범위 및 정신은 하기 특허청구범위에 의해 표시된다.

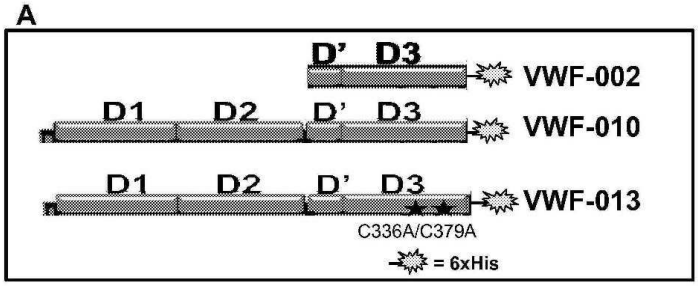
[0709] 본 명세서에 인용된 모든 특허 및 공보는 그 전체가 참조문헌으로 본 명세서에 포함된다.

도면

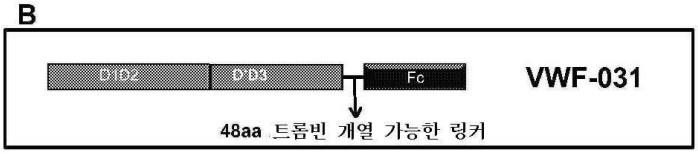
도면1

상이한 VWF 작제물

A



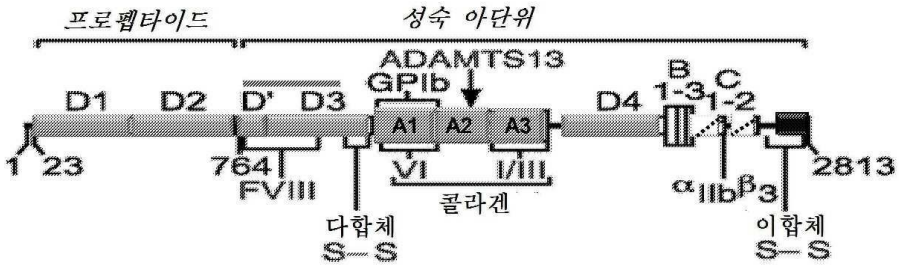
B



C

VWF-025: pLIVE 벡터에서의 D1D2D'D3 코돈 서열
VWF-029: pLIVE 벡터에서의 $D1D2D'D3C_{336A/C379A}$

D. 폰 빌레브란트 인자



- 약 250kDa 단백질, 이황화 결합에 의해 다합체(20MDa 초과)를 형성한다
- 비공유 복합체에서 FVIII과 회합한다(95%~98%)
  - 프로테아제 개열/활성화로부터 FVIII을 보호한다
  - 중쇄 및 경쇄를 안정화시킨다
  - 스캐빈저 수용체에 의한 FVIII의 청소를 방지한다

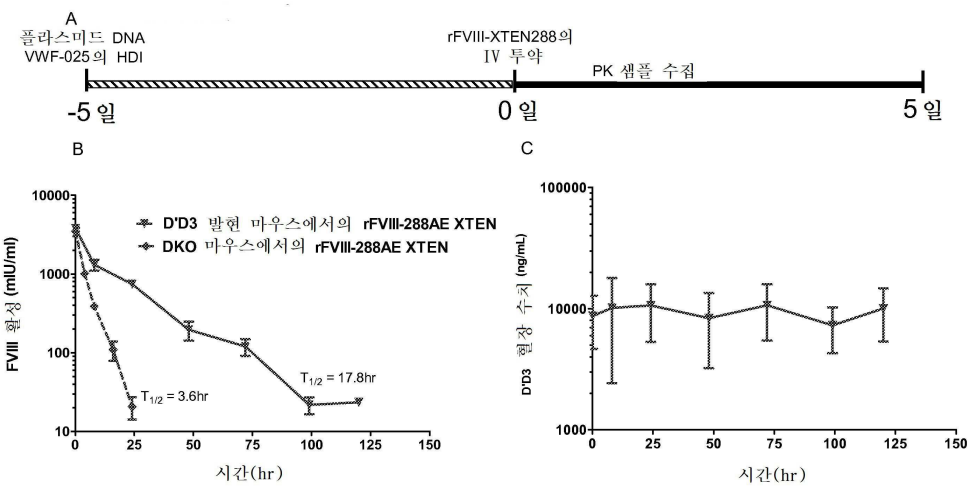
  } 반감기 연장

  - vWF-수용체를 통한 FVIII-vWF 복합체의 청소
  - 음세포작용의 방지 및 rFVIIIFc의 재순환?

  } 반감기 제한

도면2

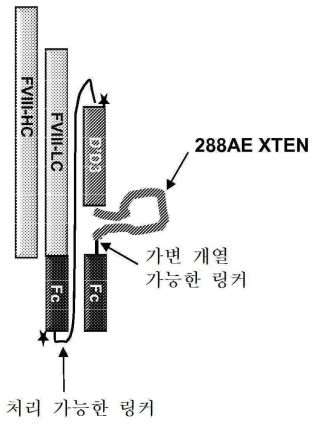
VWF D'D3 발현 마우스에서의 **rFVIII-XTEN PK**



VWF D'D3 단편으로부터의 FVIII-XTEN의 5배 추가의 반감기 연장

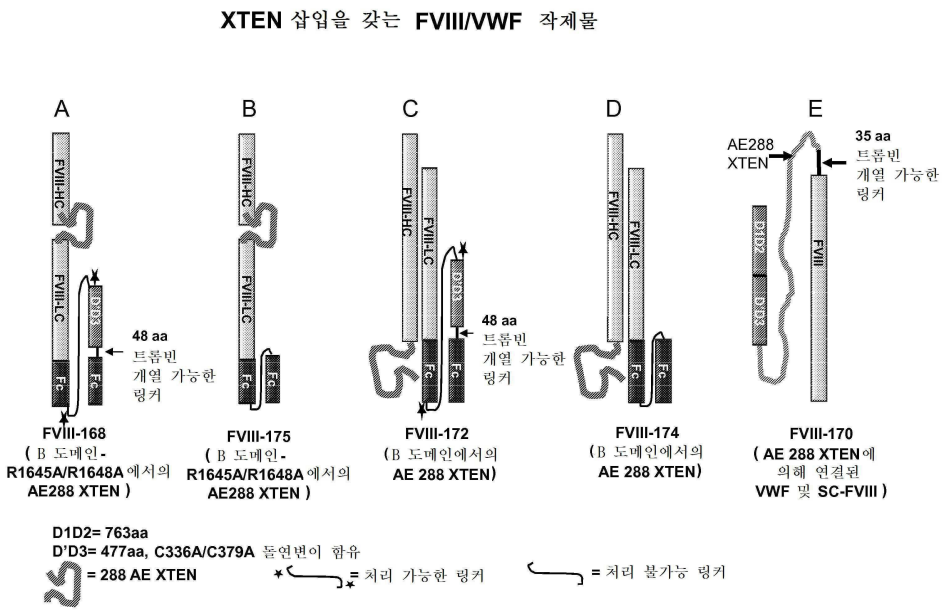
도면3

FVIIIFC/VWF 이종이합체 작제물(가변 링커)

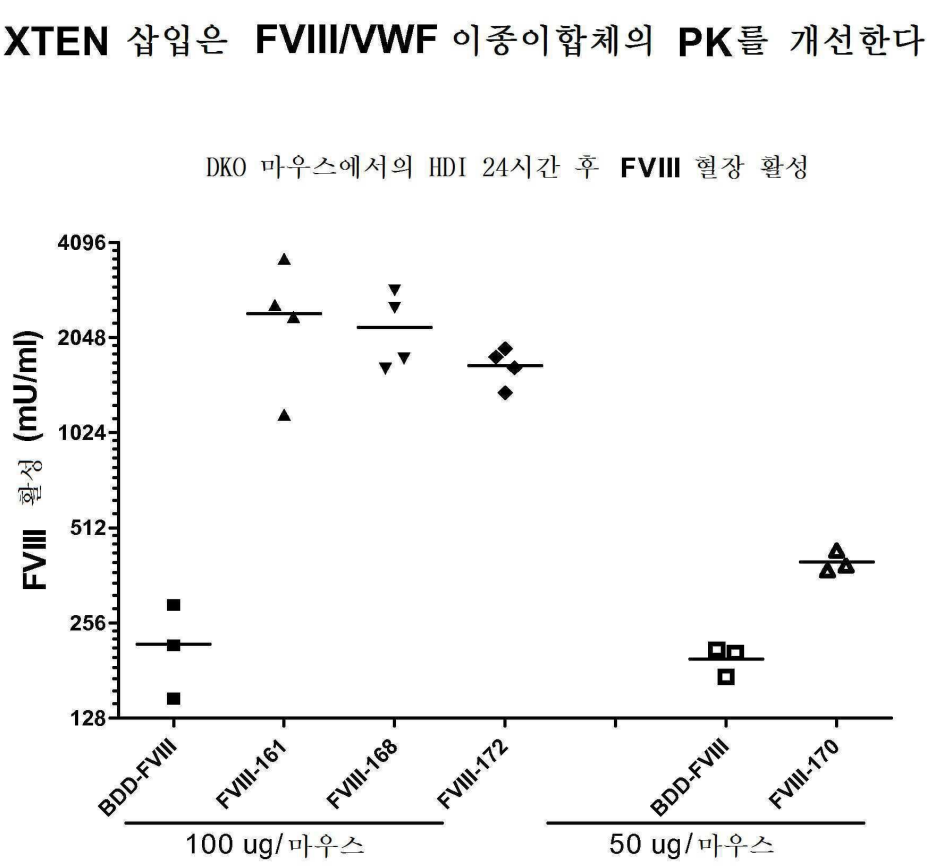


DNA 작제물	VWF와 Fc 사이의 링커
FVIII-161	288AE XTEN + IS{5X(GGGGS)}LVPRGSGG
D'D3= C336A/C379A를 갖는 1개 내지 477개의 aa	

도면4

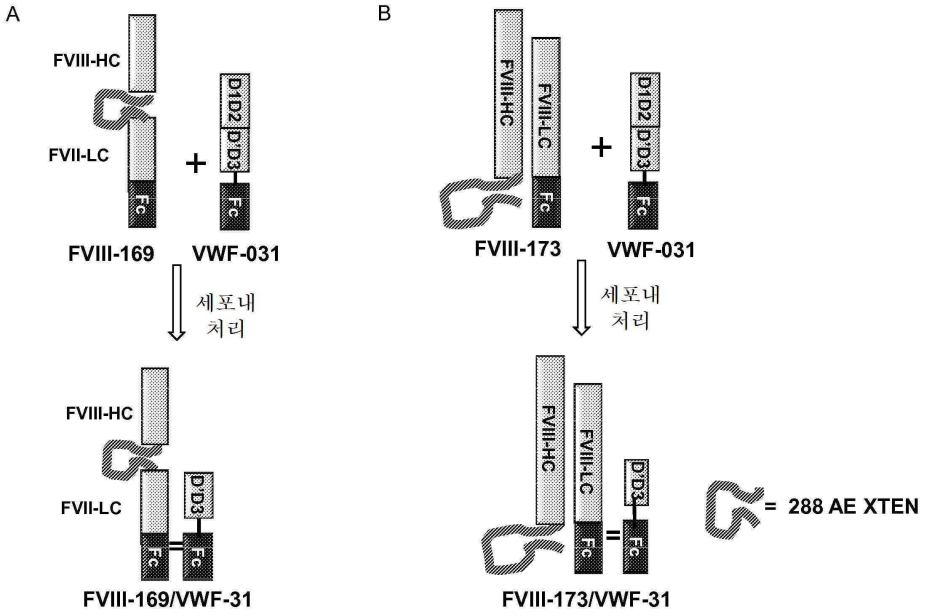

XTEN 삽입을 갖는 FVIII/VWF 작제물
A
B
C
D
E
FVIII-HC
FVIII-LC
Fc
D1D2
D'D3
48 aa
트롬빈
개열 가능한
링커
AE288
XTEN
35 aa
트롬빈
개열 가능한
링커
FVIII
FVIII-168
(B 도메인-
R1645A/R1648A 에서의
AE288 XTEN)
FVIII-175
(B 도메인-
R1645A/R1648A 에서의
AE288 XTEN)
FVIII-172
(B 도메인에서의
AE 288 XTEN)
FVIII-174
(B 도메인에서의
AE 288 XTEN)
FVIII-170
(AE 288 XTEN에
의해 연결된
VWF 및 SC-FVIII)
D1D2= 763aa
D'D3= 477aa, C336A/C379A 돌연변이 함유
= 288 AE XTEN
= 처리 가능한 링커
= 처리 불가능 링커

도면5


XTEN 삽입은 FVIII/VWF 이종이합체의 PK를 개선한다
DKO 마우스에서의 HDI 24시간 후 FVIII 혈장 활성
FVIII 활성 (mU/ml)
4096
2048
1024
512
256
128
BDD-FVIII
FVIII-161
FVIII-168
FVIII-172
BDD-FVIII
FVIII-170
100 ug/마우스
50 ug/마우스

도면6

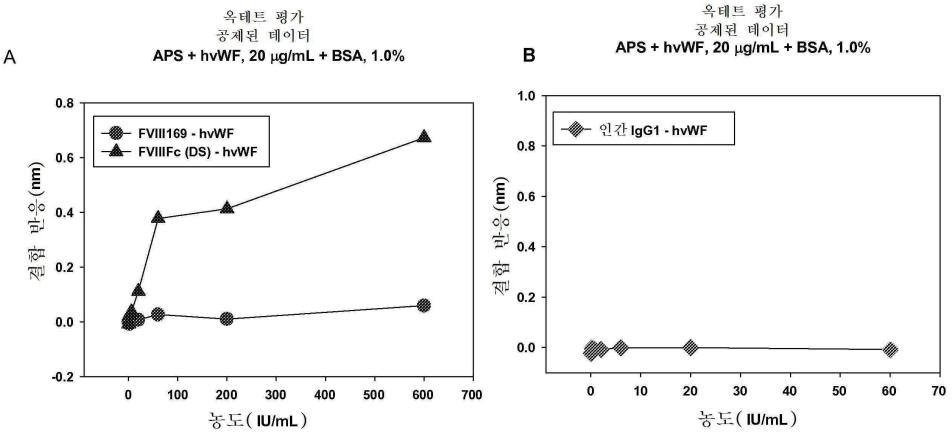
FVIII 작제물(동시형질감염 시스템)



FVIII-169	단일 Fc에 직접 융합된 288 AE XTEN B 도메인 삽입을 갖는 **SC- FVIII R1645A/R1648A**
FVIII-173	단일 Fc에 직접 융합된 288 AE XTEN B 도메인 삽입을 갖는 이중 사슬 FVIII
VWF-031	48aa 트롬빈 개열 가능한 링커에 의해 단일 Fc에 연결된 **D1D2D'D3 (763aa-477aa / C336A/C379A)** 단편

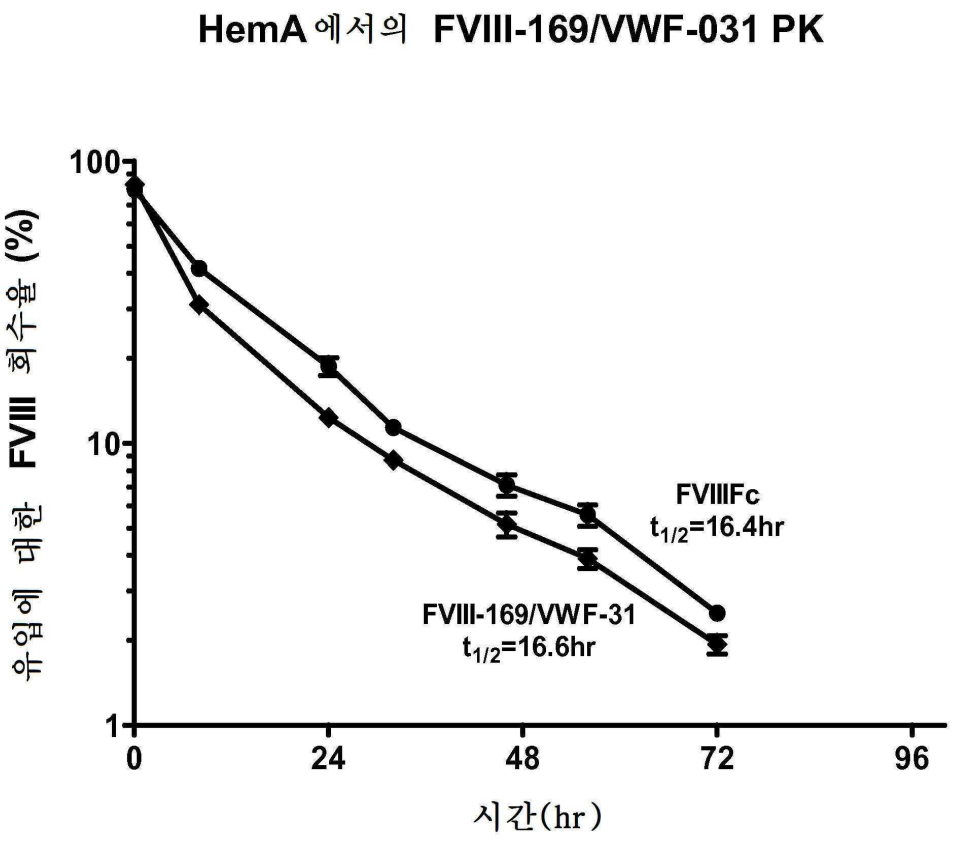
도면7

FVIII-169/VWF-31 은 부동화 hVWF에 대한 검출 가능한 결합을 갖지 않는다

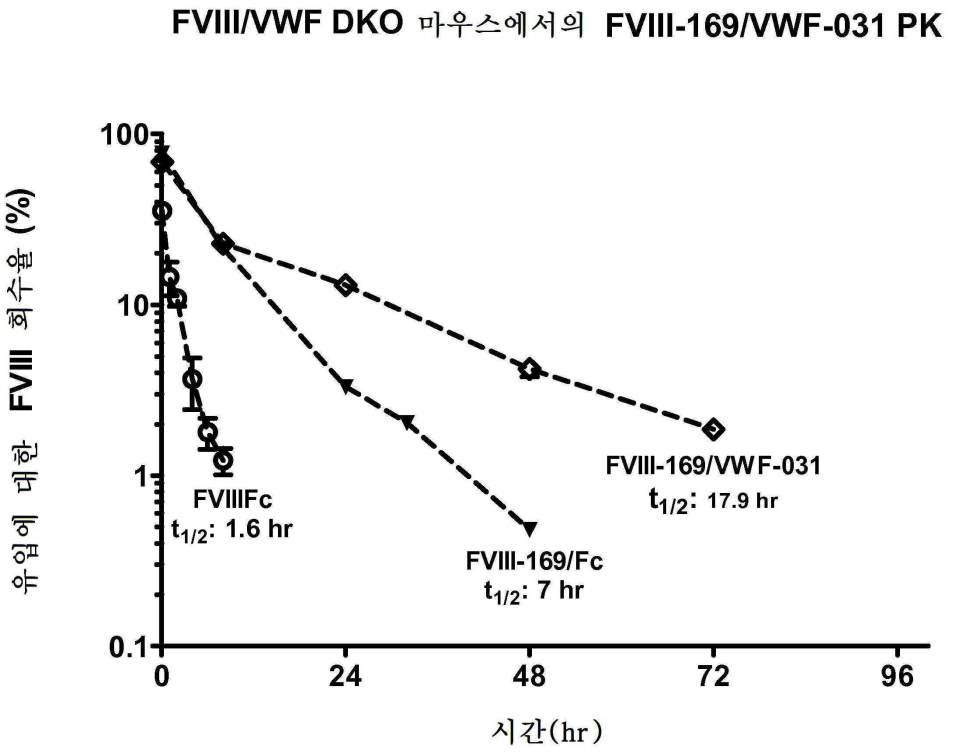


분석물	APS 프로브 + hVWF	단백질 G 프로브
FVIII-169/VWF-031	**-**	**+**
rFVIIIFc	**+**	**+**
인간 **IgG1**	**-**	**+**

도면8a

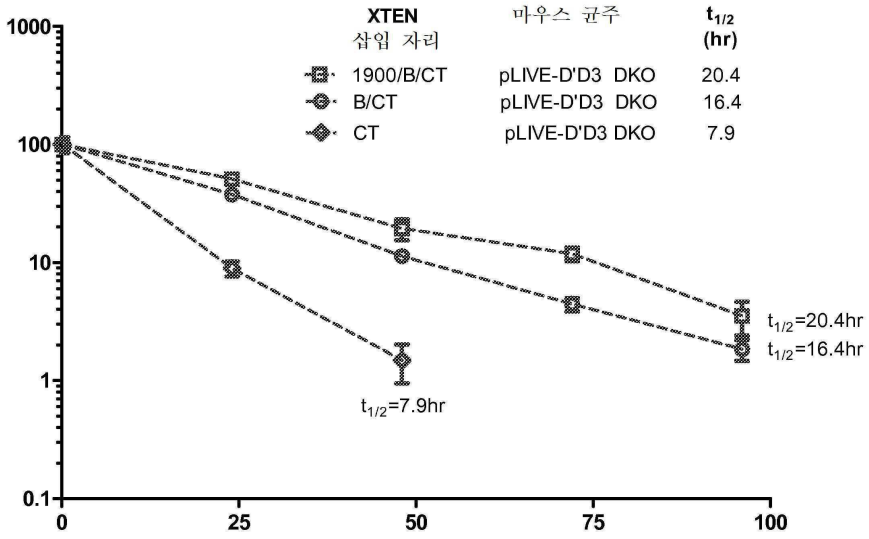

HemA에서의 FVIII-169/VWF-031 PK
유입에 대한 FVIII 회수율 (%)
100
10
1
0
24
48
72
96
시간(hr)
FVIIIFc
t1/2=16.4hr
FVIII-169/VWF-31
t1/2=16.6hr

도면8b


FVIII/VWF DKO 마우스에서의 FVIII-169/VWF-031 PK
유입에 대한 FVIII 회수율 (%)
100
10
1
0.1
0
24
48
72
96
시간(hr)
FVIIIFc
t1/2: 1.6 hr
FVIII-169/Fc
t1/2: 7 hr
FVIII-169/VWF-031
t1/2: 17.9 hr

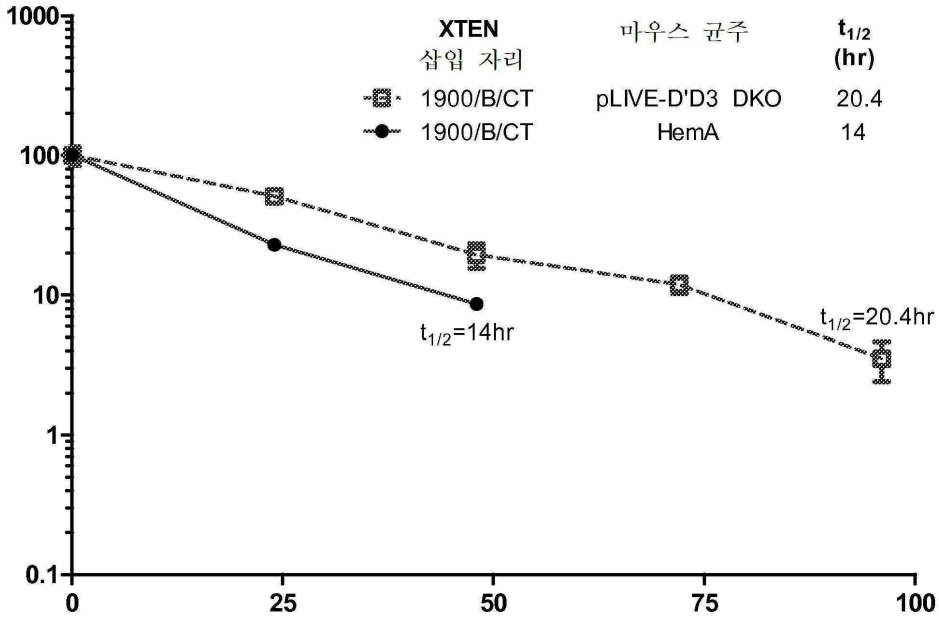
도면9a

D'D3 발현 FVIII/VWF DKO 마우스에서의 FVIII-XTEN 변이체 반감기

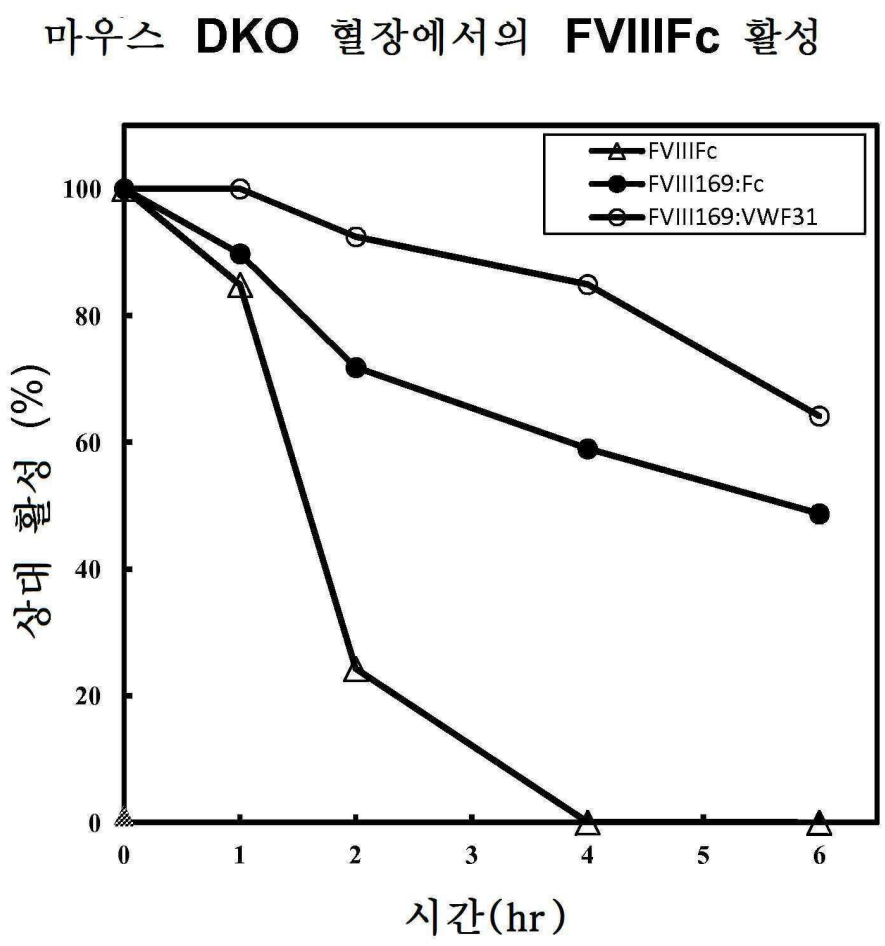


도면9b

3개의 XTEN 삽입을 갖는 FVIII-XTEN의 PK

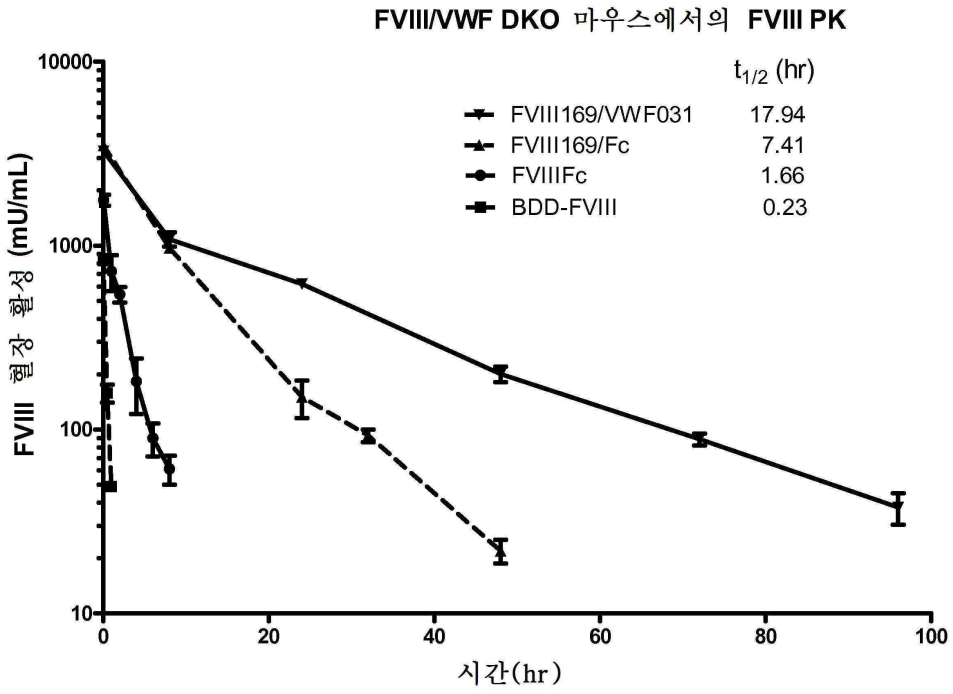


도면10


마우스 DKO 혈장에서의 FVIIIFc 활성
FVIIIFc
FVIII169:Fc
FVIII169:VWF31
상대 활성 (%)
100
80
60
40
20
0
0
1
2
3
4
5
6
시간(hr)

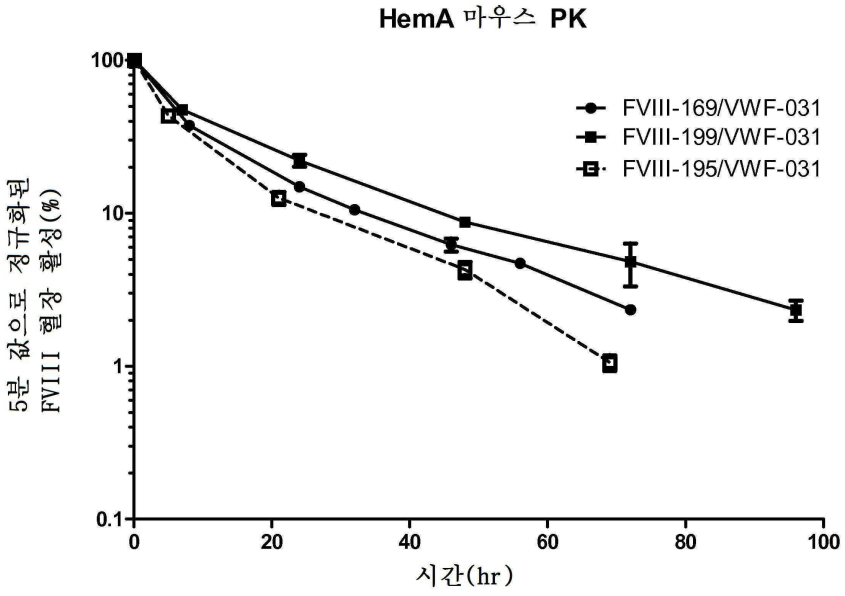
도면11

FVIII 반감기 연장에서의 Fc, XTEN 및 VWF-D'D3 단편의 상가 효과



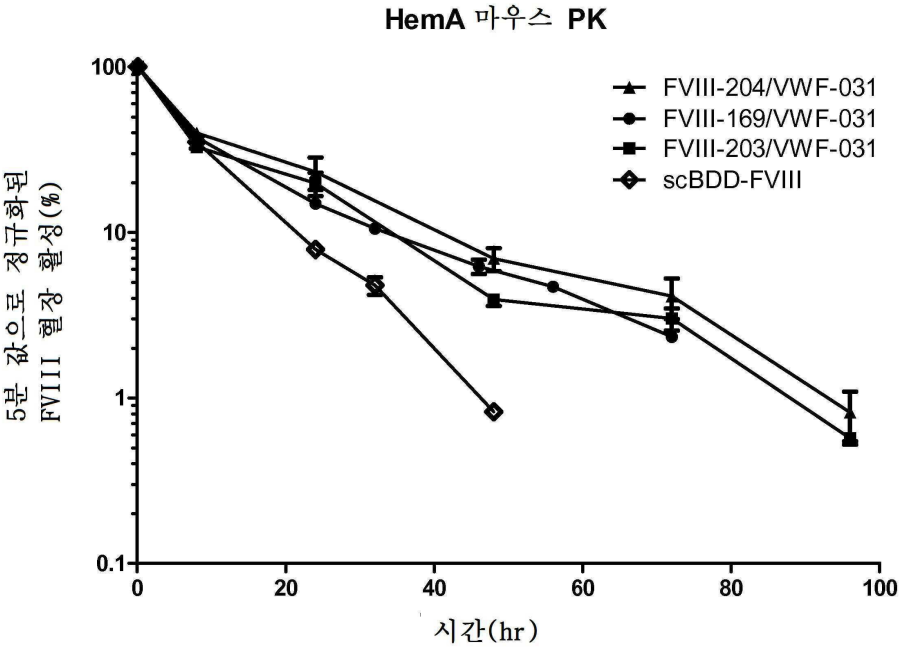
도면12a

HemA 마우스에서의 rFVIII-XTEN/VWF 이종이합체 PK에 대한 상이한 XTEN의 효과



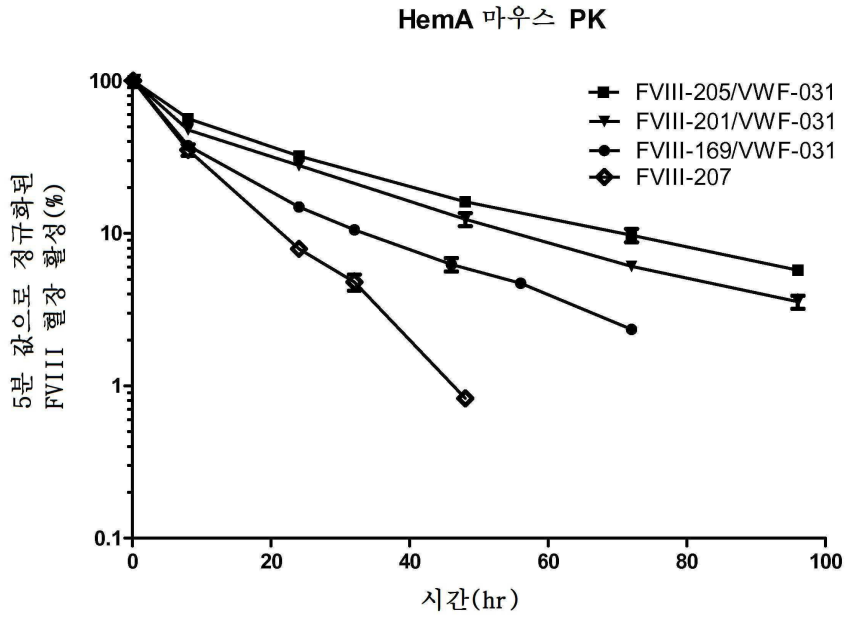
도면12b

HemA 마우스에서의 rFVIII-XTEN/VWF 이종이합체 PK에 대한 상이한 XTEN의 효과



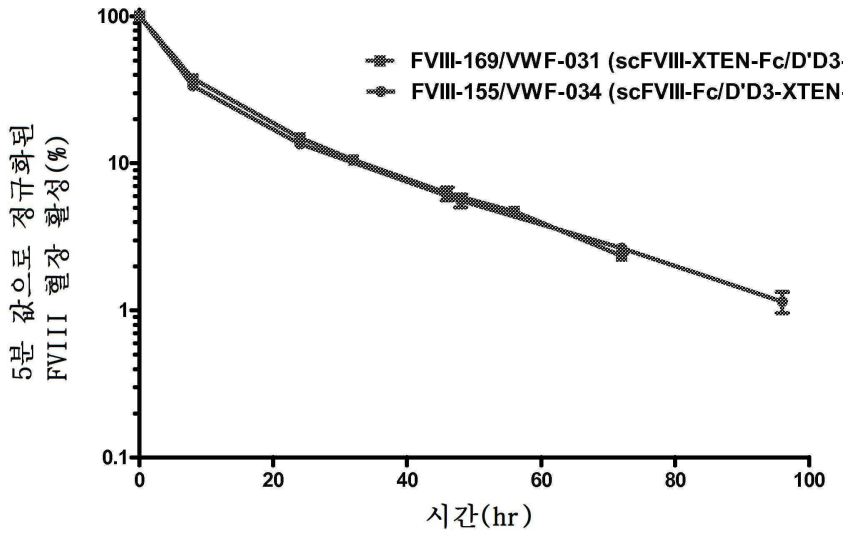
도면12c

HemA 마우스에서의 rFVIII-XTEN/VWF 이종이합체 PK에 대한 상이한 XTEN의 효과



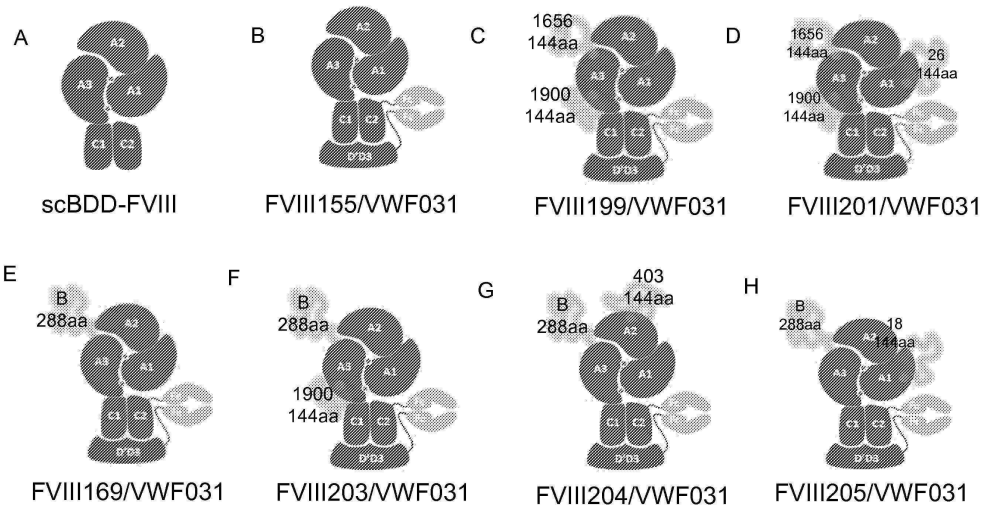
도면13

FVIII/VWF DKO 마우스에서의 **rFVIII-XTEN/VWF-XTEN** 이종이합체 PK

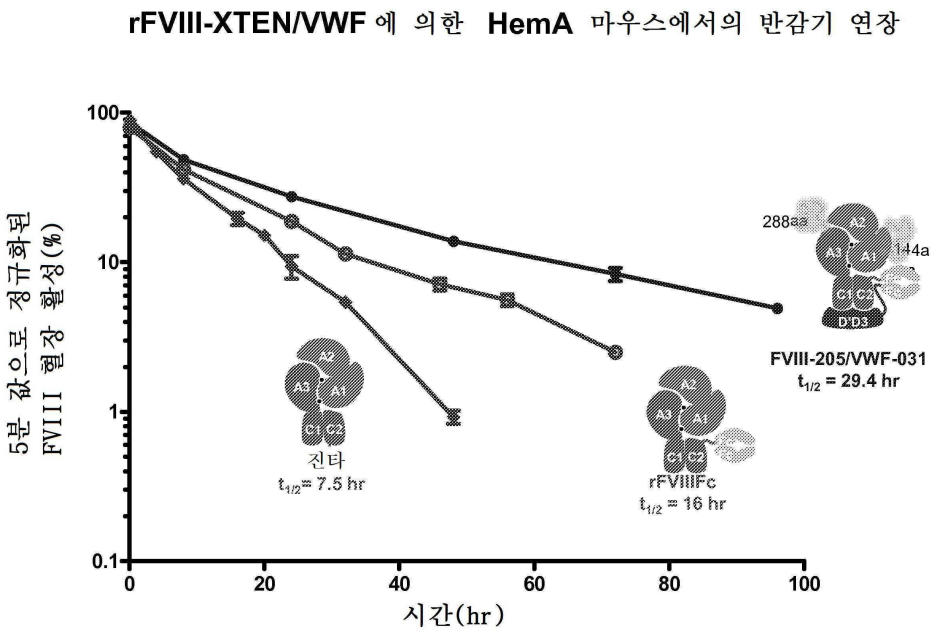


도면14

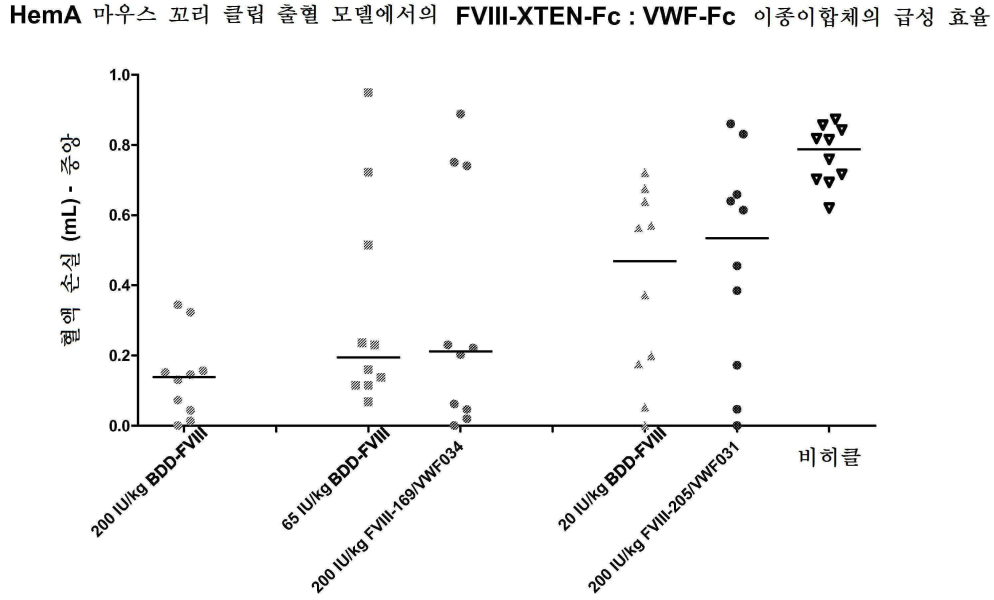
HemA 마우스에서의 **rFVIII-XTEN/VWF** 이종이합체 PK



도면15



도면16



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> BIOGEN IDEC MA INC.

AMUNIX OPERATING INC.

<120> FACTOR VIII COMPLEX WITH XTEN AND VON WILLEBRAND FACTOR PROTEIN,

AND USES THEREOF

<130> WO2014/011819

<140> PCT/US2013/049989

<141> 2013-07-10

<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 version 2.0

<210> 1

<211> 8442

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgattcctg ccagatttgc cggggtgctg cttgctctgg ccctcatttt gccagggacc 60

ctttgtgcag aaggaactcg cggcaggtca tccacggccc gatgcagcct tttcggaagt 120

gacttcgtca acacctttga tgggagcatg tacagctttg cgggatactg cagttacctc 180

ctggcagggg gctgccagaa acgctccttc tcgattattg gggacttcca gaatggcaag 240

agagtgagcc tctccgtgta tcttggggaa ttttttgaca tccatttgtt 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 ctttgctgaa gatgacttta tgacccaaga agggaccttg 540

acctcggacc cttatgactt tgccaactca tgggctctga gcagtggaga acagtggtgt 600

gaacgggcat ctcctcccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat gcagaagggc 660

ctgtgggagc agtgccagct tctgaagagc acctcggtgt ttgcccgctg ccaccctctg 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 ccctcccggc 1080

acctccctct ctcgagactg caacacctgc atttgccgaa acagccagtg gatctgcagc 1140

aatgaagaat gtccagggga gtgccttgtc actggtcaat cccacttcaa gagctttgac 1200

aacagatact tcaccttcag tgggatctgc cagtacctgc tggcccggga ttgccaggac 1260

cactccttct ccattgtcat tgagactgtc cagtgtgctg atgaccgcga cgctgtgtgc 1320

acccgctccg tcaccgtccg gctgcctggc ctgcacaaca gccttgtgaa actgaagcat 1380

ggggcaggag ttgccatgga tggccaggac atccagctcc ccctcctgaa aggtgacctc 1440

cgcatccagc atacagtgac 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

ccgctgccct acctgcggaa ctgccgctac gacgtgtgct cctgctcgga cggccgcgag 1860

tgcctgtgcg gcgccctggc cagctatgcc gcggcctgcg cggggagagg cgtgcgcgtc 1920

gcgtggcgcg agccaggccg ctgtgagctg aactgcccga aaggccaggt gtacctgcag 1980

tgcgggaccc cctgcaacct gacctgccgc tctctctctt acccggatga ggaatgcaat 2040

gaggcctgcc tggagggctg cttctgcccc ccagggctct acatggatga gaggggggac 2100

tgcgtgccca aggcccagtg cccctgttac tatgacggtg agatcttcca gccagaagac 2160

atcttctcag accatcacac catgtgctac tgtgaggatg gcttcatgca ctgtaccatg 2220

agtggagtcc ccggaagctt gctgcctgac gctgtcctca gcagtcccct gtctcatcgc 2280

agcaaaagga gcctatcctg tcggcccccc atggtcaagc tggtgtgtcc cgctgacaac 2340

ctgcgggctg aagggctcga gtgtaccaaa acgtgccaga actatgacct ggagtgcatg 2400

agcatgggct gtgtctctgg ctgcctctgc cccccgggca tggtccggca tgagaacaga 2460

tgtgtggccc tggaaaggtg tccctgcttc catcagggca aggagtatgc ccctggagaa 2520
acagtgaaga ttggctgcaa cacttgtgtc tgtcgggacc ggaagtggaa ctgcacagac 2580
catgtgtgtg atgccacgtg ctccacgatc ggcatggccc actacctcac cttcgacggg 2640
ctcaaatacc tgttccccgg ggagtgccag tacgttctgg tgcaggatta ctgcggcagt 2700
aaccctggga cctttcggat cctagtgggg aataagggat gcagccaccc ctcagtgaaa 2760
tgcaagaaac gggtcaccat cctggtggag ggaggagaga ttgagctgtt tgacggggag 2820
gtgaatgtga agaggcccat gaaggatgag actcactttg aggtggtgga gtctggccgg 2880

tacatcattc tgctgctggg caaagccctc tccgtggtct gggaccgcca cctgagcatc 2940
tccgtggtcc tgaagcagac ataccaggag aaagtgtgtg gcctgtgtgg gaattttgat 3000
ggcatccaga acaatgacct caccagcagc aacctccaag tggaggaaga ccctgtggac 3060
tttgggaact cctggaaagt gagctcgcag tgtgctgaca ccagaaaagt gcctctggac 3120
tcatcccctg ccacctgcca taacaacatc atgaagcaga cgatggtgga ttcctcctgt 3180
agaatcctta ccagtgacgt cttccaggac tgcaacaagc tggtggaccc cgagccatat 3240
ctggatgtct gcatttacga cacctgctcc tgtgagtcca ttggggactg cgcctgcttc 3300

tgcgacacca ttgctgccta tgcccacgtg tgtgcccagc atggcaaggt ggtgacctgg 3360
aggacggcca cattgtgccc ccagagctgc gaggagagga atctccggga gaacgggtat 3420
gagtgtgagt ggcgctataa cagctgtgca cctgcctgtc aagtcacgtg tcagcaccct 3480
gagccactgg cctgccctgt gcagtgtgtg gagggctgcc atgcccactg ccctccaggg 3540
aaaatcctgg atgagctttt gcagacctgc gttgaccctg aagactgtcc agtgtgtgag 3600
gtggctggcc ggcgttttgc ctcaggaaag aaagtcacct tgaatcccag tgaccctgag 3660
cactgccaga tttgccactg tgatgttgtc aacctcacct gtgaagcctg ccaggagccg 3720

ggaggcctgg tggtgcctcc cacagatgcc ccggtgagcc ccaccactct gtatgtggag 3780
gacatctcgg aaccgccgtt gcacgatttc tactgcagca ggctactgga cctggtcttc 3840
ctgctggatg gctcctccag gctgtccgag gctgagtttg aagtgctgaa ggcctttgtg 3900
gtggacatga tggagcggct gcgcatctcc cagaagtggg tccgcgtggc cgtggtggag 3960
taccacgacg gctcccacgc ctacatcggg ctcaaggacc ggaagcgacc gtcagagctg 4020
cggcgcattg ccagccaggt gaagtatgcg ggcagccagg tggcctccac cagcgaggtc 4080
ttgaaataca cactgttcca aatcttcagc aagatcgacc gccctgaagc ctcccgcatc 4140

gccctgctcc tgatggccag ccaggagccc caacggatgt cccggaactt tgtccgctac 4200

gtccagggcc tgaagaagaa gaaggtcatt gtgatcccgg tgggcattgg gccccatgcc 4260

aacctcaagc agatccgcct catcgagaag caggccccctg agaacaaggc cttcgtgctg 4320

agcagtgtgg atgagctgga gcagcaaagg gacgagatcg ttagctacct ctgtgacctt 4380

gcccctgaag cccctcctcc tactctgccc cccgacatgg cacaagtcac tgtgggcccg 4440

gggctcttgg gggtttcgac cctggggccc aagaggaact ccatggttct ggatgtggcg 4500

ttcgtcctgg aaggatcgga caaaattggt gaagccgact tcaacaggag caaggagttc 4560

atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggccaggaca gcatccacgt cacggtgctg 4620

cagtactcct acatggtgac cgtggagtac cccttcagcg aggcacagtc caaaggggac 4680

atcctgcagc gggtgcgaga gatccgctac cagggcggca acaggaccaa cactgggctg 4740

gccctgcggt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc agggtgaccg ggagcaggcg 4800

cccaacctgg tctacatggt caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa gaggctgcct 4860

ggagacatcc aggtggtgcc cattggagtg ggccctaatg ccaacgtgca ggagctggag 4920

aggattggct ggcccaatgc ccctatcctc atccaggact ttgagacgct cccccgagag 4980

gctcctgacc tggtgctgca gaggtgctgc tccggagagg ggctgcagat ccccaccctc 5040

tcccctgcac ctgactgcag ccagcccctg gacgtgatcc ttctcctgga tggctcctcc 5100

agtttcccag cttcttattt tgatgaaatg aagagtttcg ccaaggcttt catttcaaaa 5160

gccaatatag ggcctcgtct cactcaggtg tcagtgctgc agtatggaag catcaccacc 5220

attgacgtgc catggaacgt ggtcccggag aaagcccatt tgctgagcct tgtggacgtc 5280

atgcagcggg agggaggccc cagccaaatc ggggatgcct tgggctttgc tgtgcgatac 5340

ttgacttcag aaatgcatgg tgccaggccg ggagcctcaa aggcggtggt catcctggtc 5400

acggacgtct ctgtggattc agtggatgca gcagctgatg ccgccaggtc caacagagtg 5460

acagtgttcc ctattggaat tggagatcgc tacgatgcag cccagctacg gatcttggca 5520

ggcccagcag gcgactccaa cgtggtgaag ctccagcgaa tcgaagacct ccctaccatg 5580

gtcaccttgg gcaattcctt cctccacaaa ctgtgctctg gatttgttag gatttgcatg 5640

gatgaggatg ggaatgagaa gaggcccggg gacgtctgga ccttgccaga ccagtgccac 5700

accgtgactt gccagccaga tggccagacc ttgctgaaga gtcatcgggt caactgtgac 5760

cgggggctga ggccttcgtg ccctaacagc cagtcccctg ttaaagtgga agagacctgt 5820

ggctgccgct ggacctgccc ctgygtgtgc acaggcagct ccactcggca catcgtgacc 5880

tttgatgggc agaatttcaa gctgactggc agctgttctt atgtcctatt tcaaaacaag 5940

gagcaggacc tggaggtgat tctccataat ggtgcctgca gccctggagc aaggcagggc 6000

tgcatgaaat ccatcgaggt gaagcacagt gccctctccg tcgagstgca cagtgacatg 6060

gaggtgacgg tgaatgggag actggtctct gttccttacg tgggtgggaa catggaagtc 6120

aacgtttatg gtgccatcat gcatgaggtc agattcaatc accttggtca catcttcaca 6180

ttcactccac aaaacaatga gttccaactg cagctcagcc ccaagacttt tgcttcaaag 6240

acgtatggtc tgtgtgggat ctgtgatgag aacggagcca atgacttcat gctgagggat 6300

ggcacagtca ccacagactg gaaaacactt gttcaggaat ggactgtgca gcggccaggg 6360

cagacgtgcc agcccatcct ggaggagcag tgtcttgtcc ccgacagctc ccactgccag 6420

gtcctcctct taccactgtt tgctgaatgc cacaaggtcc tggctccagc cacattctat 6480

gccatctgcc agcaggacag ttgccaccag gagcaagtgt gtgaggtgat cgcctcttat 6540

gcccacctct gtcggaccaa cggggtctgc gttgactgga ggacacctga tttctgtgct 6600

atgtcatgcc caccatctct ggtctacaac cactgtgagc atggctgtcc ccggcactgt 6660

gatggcaacg tgagctcctg tggggaccat ccctccgaag gctgtttctg ccctccagat 6720

aaagtcatgt tggaaggcag ctgtgtccct gaagaggcct gcactcagtg cattggtgag 6780

gatggagtcc agcaccagtt cctggaagcc tgggtcccgg accaccagcc ctgtcagatc 6840

tgcacatgcc tcagcgggcg gaaggtcaac tgcacaacgc agccctgccc cacggccaaa 6900

gctcccacgt gtggcctgtg tgaagtagcc cgcctccgcc agaatgcaga ccagtgctgc 6960

cccgagtatg agtgtgtgtg tgacccagtg agctgtgacc tgcccccagt gcctcactgt 7020

gaacgtggcc tccagcccac actgaccaac cctggcgagt gcagacccaa cttcacctgc 7080

gcctgcagga aggaggagtg caaaagagtg tccccaccct cctgcccccc gcaccgtttg 7140

cccacccttc ggaagaccca gtgctgtgat gagtatgagt gtgcctgcaa ctgtgtcaac 7200

tccacagtga gctgtcccct tgggtacttg gcctcaaccg ccaccaatga ctgtggctgt 7260

accacaacca cctgccttcc cgacaaggtg tgtgtccacc gaagcaccat ctaccctgtg 7320

ggccagttct gggaggaggg ctgcgatgtg tgcacctgca ccgacatgga ggatgccgtg 7380

atgggcctcc gcgtggccca gtgctcccag aagccctgtg aggacagctg tcggtcgggc 7440

ttcacttacg ttctgcatga aggcgagtgc tgtggaaggt gcctgccatc tgcctgtgag 7500

gtggtgactg gctcaccgcg gggggactcc cagtcttcct ggaagagtgt cggctcccag 7560

tgggcctccc cggagaaccc ctgcctcatc aatgagtgtg tccgagtgaa ggaggaggtc 7620

tttatacaac aaaggaacgt ctcctgcccc cagctggagg tccctgtctg cccctcgggc 7680

tttcagctga gctgtaagac ctcagcgtgc tgcccaagct gtcgctgtga gcgcatggag 7740

gcctgcatgc tcaatggcac tgtcattggg cccgggaaga ctgtgatgat cgatgtgtgc 7800

acgacctgcc gctgcatggt gcaggtgggg gtcatctctg gattcaagct ggagtgcagg 7860

aagaccacct gcaacccctg ccccctgggt tacaaggaag aaaataacac aggtgaatgt 7920

tgtgggagat gtttgcctac ggcttgcacc attcagctaa gaggaggaca gatcatgaca 7980

ctgaagcgtg atgagacgct ccaggatggc tgtgatactc acttctgcaa ggtcaatgag 8040

agaggagagt acttctggga gaagagggtc acaggctgcc cacccтttga 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 tgtaccatga ggttctcaat 8400

gccatggagt gcaaatgctc ccccaggaag tgcagcaagt ga 8442

<210> 2

<211> 2813

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(22)

<223> VWF Signal Peptide

<220><221> misc_feature

<222> (23)..(763)

<223> VWF D1D2 region

<220><221> misc_feature

<222> (764)..(866)

<223> VWF D'Domain

<220><221> misc_feature

<222> (867)..(1240)

<223> VWF D3 Domain

<220><221

> misc_feature

<222> (1241)..(1479)

<223> VWF A1 Domain

<220><221> misc_feature

<222> (2016)..(2016)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<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> Homo sapiens

<400> 5

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 tttcaacatc 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 ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540

gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcattggag ccctactagt atgtagagaa 600

gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta 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 catttcttgt gaggaaccat 900

cgccaggcgt ccttggaaat ctcgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg 960

gaccttggac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacatga tggcatggaa 1020

gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaaccccaac 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 gggaagttgg agacacactg 1440
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact 1500
gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaaaggtg taaaacattt gaaggatttt 1560
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca 1620
actaaatcag atcctcggtg cctgacccgc tattactcta gtttcgttaa tatggagaga 1680
gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa 1740
agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag 1800

aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tccccaatcc agctggagtg 1860
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtt 1920
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggtgg catactggta cattctaagc 1980
attggagcac agactgactt cctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa 2040
atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg 2100
atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc 2160
atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac 2220

agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc 2280
ttctcccaga attcaagaca ccctagcact aggcaaaagc aatttaatgc caccacaatt 2340
ccagaaaatg acatagagaa gactgaccct tggtttgcac acagaacacc tatgcctaaa 2400
atacaaaatg tctcctctag tgatttgttg atgctcttgc gacagagtcc tactccacat 2460
gggctatcct tatctgatct ccaagaagcc aaatatgaga ctttttctga tgatccatca 2520
cctggagcaa tagacagtaa taacagcctg tctgaaatga cacacttcag gccacagctc 2580
catcacagtg gggacatggt atttacccct gagtcaggcc tccaattaag attaaatgag 2640

aaactgggga caactgcagc aacagagttg aagaaacttg atttcaaagt ttctagtaca 2700
tcaaataatc tgatttcaac aattccatca gacaatttgg cagcaggtac tgataataca 2760
agttccttag gacccccaag tatgccagtt cattatgata gtcaattaga taccactcta 2820
tttggcaaaa agtcatctcc ccttactgag tctggtggac ctctgagctt gagtgaagaa 2880
aataatgatt caaagttgtt agaatcaggt ttaatgaata gccaagaaag ttcatgggga 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 aaatggtcca acagaaaaaa 3300

gagggcccca ttccaccaga tgcacaaaat ccagatatgt cgttctttaa gatgctattc 3360

ttgccagaat cagcaaggtg gatacaaagg actcatggaa agaactctct gaactctggg 3420

caaggcccca gtccaaagca attagtatcc ttaggaccag aaaaatctgt ggaaggtcag 3480

aatttcttgt ctgagaaaaa caaagtggta gtaggaaagg gtgaatttac aaaggacgta 3540

ggactcaaag agatggtttt tccaagcagc agaaacctat ttcttactaa cttggataat 3600

ttacatgaaa ataatacaca caatcaagaa aaaaaaattc aggaagaaat agaaaagaag 3660

gaaacattaa tccaagagaa tgtagttttg cctcagatac atacagtgac tggcactaag 3720

aatttcatga agaacctttt cttactgagc actaggcaaa atgtagaagg ttcatatgac 3780

ggggcatatg ctccagtact tcaagatttt aggtcattaa atgattcaac aaatagaaca 3840

aagaaacaca cagctcattt ctcaaaaaaa ggggaggaag aaaacttgga aggcttggga 3900

aatcaaacca agcaaattgt agagaaatat gcatgcacca caaggatatc tcctaataca 3960

agccagcaga attttgtcac gcaacgtagt aagagagctt tgaaacaatt cagactccca 4020

ctagaagaaa cagaacttga aaaaaggata attgtggatg acacctcaac ccagtggtcc 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 caaaaaaaat 4380

aacctttctt tagccattct aaccttggag atgactggtg atcaaagaga ggttggctcc 4440

ctggggacaa gtgccacaaa ttcagtcaca tacaagaaag ttgagaacac tgttctcccg 4500

aaaccagact tgcccaaaac atctggcaaa gttgaattgc ttccaaaagt tcacatttat 4560

cagaaggacc tattccctac ggaaactagc aatgggtctc ctggccatct ggatctcgtg 4620

gaagggagcc ttcttcaggg aacagaggga gcgattaagt ggaatgaagc aaacagacct 4680

ggaaaagttc cctttctgag agtagcaaca gaaagctctg caaagactcc ctccaagcta 4740

ttggatcctc ttgcttggga taaccactat ggtactcaga taccaaaaga agagtggaaa 4800

tcccaagaga agtcaccaga aaaaacagct tttaagaaaa aggataccat tttgtccctg 4860

aacgcttgtg aaagcaatca tgcaatagca gcaataaatg agggacaaaa taagcccgaa 4920

atagaagtca cctgggcaaa gcaaggtagg actgaaaggc tgtgctctca aaacccacca 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 aagaaacagg 5220

gctcagagtg gcagtgtccc tcagttcaag aaagttgttt tccaggaatt tactgatggc 5280

tcctttactc agcccttata ccgtggagaa ctaaatgaac atttgggact cctggggcca 5340

tatataagag cagaagttga agataatatc atggtaactt tcagaaatca ggcctctcgt 5400

ccctattcct tctattctag ccttatttct tatgaggaag atcagaggca aggagcagaa 5460

cctagaaaaa actttgtcaa gcctaatgaa accaaaactt acttttggaa agtgcaacat 5520

catatggcac ccactaaaga tgagtttgac tgcaaagcct gggcttattt ctctgatgtt 5580

gacctggaaa aagatgtgca ctcaggcctg attggacccc ttctggtctg ccacactaac 5640

acactgaacc ctgctcatgg gagacaagtg acagtacagg aatttgctct gtttttcacc 5700

atctttgatg agaccaaaag ctggtacttc actgaaaata tggaaagaaa ctgcagggct 5760

ccctgcaata tccagatgga agatcccact tttaaagaga attatcgctt ccatgcaatc 5820

aatggctaca taatggatac actacctggc ttagtaatgg ctcaggatca aaggattcga 5880

tggtatctgc tcagcatggg cagcaatgaa aacatccatt ctattcattt cagtggacat 5940

gtgttcactg tacgaaaaaa agaggagtat aaaatggcac tgtacaatct ctatccaggt 6000

gtttttgaga cagtggaaat gttaccatcc aaagctggaa tttggcgggt ggaatgcctt 6060

attggcgagc atctacatgc tgggatgagc acacttttтc tggtgtacag caataagtgt 6120

cagactcccc tgggaatggc ttctggacac attagagatt ttcagattac agcttcagga 6180

caatatggac agtgggcccc aaagctggcc agacttcatt attccggatc aatcaatgcc 6240

tggagcacca aggagccctt ttcttggatc aaggtggatc tgttggcacc aatgattatt 6300

cacggcatca agacccaggg tgcccgtcag aagttctcca gcctctacat ctctcagttt 6360

atcatcatgt atagtcttga tgggaagaag tggcagactt atcgaggaaa ttccactgga 6420

accttaatgg tcttctttgg caatgtggat tcatctggga taaaacacaa tatttttaac 6480

cctccaatta ttgctcgata catccgtttg cacccaactc attatagcat tcgcagcact 6540

cttcgcatgg agttgatggg ctgtgattta aatagttgca gcatgccatt gggaatggag 6600

agtaaagcaa tatcagatgc acagattact gcttcatcct actttaccaa tatgtttgcc 6660

acctggtctc cttcaaaagc tcgacttcac ctccaaggga ggagtaatgc ctggagacct 6720

caggtgaata atccaaaaga gtggctgcaa gtggacttcc agaagacaat gaaagtcaca 6780

ggagtaacta ctcagggagt aaaatctctg cttaccagca tgtatgtgaa ggagttcctc 6840

atctccagca gtcaagatgg ccatcagtgg actctctttt ttcagaatgg caaagtaaag 6900

gtttttcagg gaaatcaaga ctccttcaca cctgtggtga actctctaga cccaccgtta 6960

ctgactcgct accttcgaat tcacccccag agttgggtgc accagattgc cctgaggatg 7020

gaggttctgg gctgcgaggc acaggacctc tac 7053

<210> 6

<211> 1438

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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 tttcaacatc 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 ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540

gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcattggag ccctactagt atgtagagaa 600

gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta 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 catttcttgt gaggaaccat 900

cgccaggcgt ccttggaaat ctcgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg 960

gaccttggac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacatga tggcatggaa 1020

gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaaccccaac 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 gggaagttgg agacacactg 1440

ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact 1500

gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaaaggtg taaaacattt gaaggatttt 1560

ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca 1620

actaaatcag atcctcggtg cctgacccgc tattactcta gtttcgttaa tatggagaga 1680

gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa 1740

agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag 1800

aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tccccaatcc agctggagtg 1860

cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtt 1920

tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggtgg catactggta cattctaagc 1980

attggagcac agactgactt cctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa 2040

atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg 2100

atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc 2160

atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt 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 gaagttgaag ataatatcat ggtaactttc 2700

agaaatcagg cctctcgtcc ctattccttc tattctagcc ttatttctta tgaggaagat 2760

cagaggcaag gagcagaacc tagaaaaaac tttgtcaagc ctaatgaaac caaaacttac 2820

ttttggaaag tgcaacatca tatggcaccc actaaagatg agtttgactg caaagcctgg 2880

gcttatttct ctgatgttga cctggaaaaa gatgtgcact caggcctgat tggacccctt 2940

ctggtctgcc acactaacac actgaaccct gctcatggga gacaagtgac agtacaggaa 3000

tttgctctgt ttttcaccat ctttgatgag accaaaagct ggtacttcac tgaaaatatg 3060

gaaagaaact gcagggctcc ctgcaatatc cagatggaag atcccacttt taaagagaat 3120

tatcgcttcc atgcaatcaa tggctacata atggatacac tacctggctt agtaatggct 3180

caggatcaaa ggattcgatg gtatctgctc agcatgggca gcaatgaaaa catccattct 3240

attcatttca gtggacatgt gttcactgta cgaaaaaaag aggagtataa aatggcactg 3300

tacaatctct atccaggtgt ttttgagaca gtggaaatgt taccatccaa agctggaatt 3360

tggcgggtgg aatgccttat tggcgagcat ctacatgctg ggatgagcac acttttctg 3420

gtgtacagca ataagtgtca gactcccctg ggaatggctt ctggacacat tagagatttt 3480

cagattacag cttcaggaca atatggacag tgggccccaa agctggccag acttcattat 3540

tccggatcaa tcaatgcctg gagcaccaag gagccctttt cttggatcaa ggtggatctg 3600

ttggcaccaa tgattattca cggcatcaag acccagggtg cccgtcagaa gttctccagc 3660

ctctacatct ctcagtttat catcatgtat agtcttgatg ggaagaagtg gcagacttat 3720

cgaggaaatt ccactggaac cttaatggtc ttctttggca atgtggattc atctgggata 3780

aaacacaata tttttaaccc tccaattatt gctcgataca tccgtttgca cccaactcat 3840

tatagcattc gcagcactct tcgcatggag ttgatgggct gtgatttaaa tagttgcagc 3900

atgccattgg gaatggagag taaagcaata tcagatgcac agattactgc ttcatcctac 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 tctcttttt 4200

cagaatggca aagtaaaggt ttttcaggga aatcaagact ccttcacacc tgtggtgaac 4260

tctctagacc caccgttact gactcgctac cttcgaattc acccccagag ttgggtgcac 4320

cagattgccc tgaggatgga ggttctgggc tgcgaggcac aggacctcta c 4371

<210> 8

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<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> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 9

Arg Arg Arg Arg
1

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 10

Arg Lys Arg Arg Lys Arg
1 5

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 11

Arg Arg Arg Arg Ser
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 12

Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg

1 5

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 13

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg

1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 14

Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg

1 5 10

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 15

Thr Thr Lys Ile Lys Pro Arg

1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 16

Leu Val Pro Arg Gly

1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 17

Ala Leu Arg Pro Arg

1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 18

Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr

1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 19

Asp Phe Thr Arg Val Val Gly

1 5

<210> 20

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 20

Thr Met Thr Arg Ile Val Gly Gly

1 5

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 21

Ser Pro Phe Arg Ser Thr Gly Gly

1 5

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 22

Leu Gln Val Arg Ile Val Gly Gly

1 5

<210> 23

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 23

Pro Leu Gly Arg Ile Val Gly Gly

1 5

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 24

Ile Glu Gly Arg Thr Val Gly Gly

1 5

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 25

Leu Thr Pro Arg Ser Leu Leu Val

1 5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 26

Leu Gly Pro Val Ser Gly Val Pro

1 5

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 27

Val Ala Gly Asp Ser Leu Glu Glu

1 5

<210> 28

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 28

Gly Pro Ala Gly Leu Gly Gly Ala

1 5

<210> 29

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 29

Gly Pro Ala Gly Leu Arg Gly Ala

1 5

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 30

Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Arg

1 5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 31

Pro Ala Leu Pro Leu Val Ala Gln

1 5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 32

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly

1 5

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 33

Asp Asp Asp Lys Ile Val Gly Gly

1 5

<210> 34

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 34

Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro

1 5

<210> 35

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 35

Leu Pro Lys Thr Gly Ser Glu Ser

1 5

<210> 36

<211> 42

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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
Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly
65 70 75 80
Ser Glu Thr Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro

85 90 95
Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu
100 105 110
Ser Ala Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser
115 120 125
Glu Thr Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
130 135 140

<210> 38

<211> 144

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AG144

<400> 38

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 Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr
20 25 30

Gly Thr Gly Pro Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro
35 40 45
Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro
50 55 60

Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala
65 70 75 80
Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro
85 90 95
Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Pro
100 105 110
Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala
115 120 125

Ser Ser Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro
130 135 140

<210> 39
<211> 288
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> AE288
<400> 39
Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
1 5 10 15
Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
20 25 30
Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro

35 40 45
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> Artificial Sequence

<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

65 70 75 80

Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser

85 90 95

Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser

100 105 110

Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser

115 120 125

Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser

130 135 140

Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ser Ser

145 150 155 160

Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser

165 170 175

Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly

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 Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly

225 230 235 240

Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser

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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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 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

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu 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

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr

625 630 635 640

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr

645 650 655

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro

660 665 670

Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu

675 680 685

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr

690 695 700

Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu

705 710 715 720

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu

725 730 735

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro

740 745 750

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro

755 760 765

Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Glu Pro

770 775 780

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr

785 790 795 800

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> Artificial Sequence

<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
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
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 Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
165 170 175
Thr Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro
180 185 190
Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Pro
195 200 205
Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr
210 215 220

Gly Thr Gly Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro
225 230 235 240
Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro
245 250 255
Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
260 265 270

Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro
275 280 285

Gly Thr Pro Gly Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ala Ser Pro
290 295 300
Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
305 310 315 320
Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro
325 330 335
Gly Ser Ser Pro Ser Ala Ser Thr Gly Thr Gly Pro Gly Thr Pro Gly
340 345 350

Ser Gly Thr Ala Ser Ser Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser
355 360 365
Thr Gly Ser Pro Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro
370 375 380
Gly Ala Ser Pro Gly Thr Ser Ser Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr
385 390 395 400
Pro Ser Gly Ala Thr Gly Ser Pro Gly Ser Ser Thr Pro Ser Gly Ala
405 410 415

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> Artificial Sequence
<220><223> cleavage site
<400> 45
Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg
1 5
<210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> cleavage site
<400> 46
Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg
1 5 10
<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> cleavage site

<400> 47

Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg

1 5 10

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 48

Thr Thr Lys Ile Lys Pro Arg

1 5

<210> 49

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 49

Leu Val Pro Arg Gly

1 5

<210> 50

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 50

Ala Leu Arg Pro Arg

1 5

<210

> 51

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> sortase recognition motif

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 51

Leu Pro Xaa Thr Gly

1 5

<210> 52

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 52

Pro Lys Asn Ser Ser Met Ile Ser Asn Thr Pro

1 5 10

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 53

His Gln Ser Leu Gly Thr Gln

1 5

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 54

His Gln Asn Leu Ser Asp Gly Lys

1 5

<210> 55

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<400> 55

His Gln Asn Ile Ser Asp Gly Lys

1 5

<210> 56

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> polypeptide

<400> 56

Val Ile Ser Ser His Leu Gly Gln

1 5

<210> 57

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(4)

<223> Repeat from 1 to 100 times

<400> 57

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 58

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(3)

<223> May be repeated 1 to 100 times

<220><221> REPEAT

<222> (4)..(8)

<223> May be repeated 1 to 100 times

<400> 58

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<400> 59

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser

1 5

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<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> Artificial Sequence

<220><223> linker

<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> Artificial Sequence

<220><223> linker

<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

> Artificial Sequence

<220><223> linker

<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> Artificial Sequence

<220><223> linker

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(5)

<223> May be repeated 1-20 times

<400> 64

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> Cleavage site

<400> 65

Lys Leu Thr Arg Ala Glu Thr

1 5

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> Cleavage site

<400> 66

Asp Phe Thr Arg Val Val Gly

1 5

<210> 67

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> Cleavage Site

<400

> 67

Thr Met Thr Arg Ile Val Gly Gly

1 5

<210> 68

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> Cleavage site

<400> 68

Ser Pro Phe Arg Ser Thr Gly Gly

1 5

<210> 69

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> Cleavage site

<400> 69

Leu Gln Val Arg Ile Val Gly Gly

1 5

<210> 70

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> Cleavage site

<400> 70

Pro Leu Gly Arg Ile Val Gly Gly

1 5

<210> 71

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> Cleavage site

<400> 71

Ile Glu Gly Arg Thr Val Gly Gly

1 5

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> cleavage site

<400> 72

Leu Thr Pro Arg Ser Leu Leu Val

1 5

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> cleavage site

<400> 73

Leu Gly Pro Val Ser Gly Val Pro

1 5

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> Cleavage site

<400> 74

Val Ala Gly Asp Ser Leu Glu Glu

1 5

<210> 75

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> Cleavage site

<400> 75

Gly Pro Ala Gly Leu Gly Gly Ala

1 5

<210> 76

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> Cleavage site

<400> 76

Gly Pro Ala Gly Leu Arg Gly Ala

1 5

<210> 77

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> Cleavage site

<400> 77

Ala Pro Leu Gly Leu Arg Leu Arg

1 5

<210> 78

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<

220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> Cleavage site

<400> 78

Pro Ala Leu Pro Leu Val Ala Gln

1 5

<210> 79

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(7)

<223> Cleavage site

<400> 79

Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly

1 5

<210> 80

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> Cleavage site

<400> 80

Asp Asp Asp Lys Ile Val Gly Gly

1 5

<210> 81

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(7)

<223> Cleavage site

<400> 81

Leu Glu Val Leu Phe Gln Gly Pro

1 5

<210> 82

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> Cleavage site

<400> 82

Leu Pro Lys Thr Gly Ser Glu Ser

1 5

<210> 83

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 83

Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg

1 5

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 84

Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg

1 5 10

<210> 85

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> cleavage site

<400> 85

Asp Phe Leu Ala Glu Gly Gly Gly Val Arg

1 5 10

<210> 86

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 86

Thr Thr Lys Ile Lys Pro Arg

1 5

<210> 87

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 87

Leu Val Pro Arg Gly

1 5

<210> 88

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> cleavage site

<400> 88

Ala Leu Arg Pro Arg Val Val Gly Gly Ala

1 5 10

<210> 89

<211> 1896

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> ESC48- Fwd - VWF-D'D3 with VIII signal and BsiW1 site

<400> 90

tcgcgacgta cggccgccac catgcaaata gagctctcca cctgcttctt tctgtgcctt 60

ttgcgattct gctttagcct atcctgtcgg ccccccatg 99

<210> 91

<211> 74

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ESC51- Rev- VWF D'D3 (1-477 amino acid) with 6His and Not 1 site

<400> 91

tgacctcgag cggccgctca gtggtgatgg tgatgatgcg gctcctggca ggcttcacag 60

gtgaggttga caac 74

<210> 92

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ESC 89-fwd with Nhelsite

<400> 92

ctcactatag ggagacccaa gctggctagc cg 32

<210> 93

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ESC 91-rev with Sall

<400> 93

ctggatcccg ggagtcgact cgtcagtggt gatggtgatg atg 43

<210> 94

<211> 40

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<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> Artificial Sequence

<220><223> LW 22-FWD-VWF-D'D3 with FVIII signal sequence and BsiW1 site

<400> 95

gcgccggccg tacgatgcaa atagagctct ccacctgctt ctttctgtgc cttttgcgat 60

tctgctttag cctatcctgt cggccccca tg 92

<210> 96

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LW 23-Rev- Fc with stop codon and Not1 site

<400> 96

tcatcaatgt atcttatcat gtctgaattc gcggccgctc atttacc 47

<210> 97

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LW24- Fwd- VWF D1D2D'D3 cloning oligo with BsiW1 site

<400> 97

gcgccggccg tacgatgatt cctgccagat ttgccggggt g 41

<210> 98

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LW27-Rev-VWF D'D3 oligo with EcoRV

<400> 98

ccaccgccag atatcggctc ctggcaggct tcacaggtga g 41

<210> 99

<211> 1240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> VWF-D1D2D'D3 protein sequence 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> Artificial Sequence

<220><223> VWF-D'D3 protein sequence 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> Artificial Sequence

<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 Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1685 1690 1695

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser 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> Artificial Sequence

<220><223> pSYN-FVIII-170 protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> pSYN-FVIII-169 mature Protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> pSYN-FVIII-173 mature Protein

<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> Artificial Sequence

<220><223> FVIII 195 protein sequence
<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> Artificial Sequence

<220><223> FVIII 196 protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> FVIII 199 protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> FVIII 201 protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> FVIII 203 protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> FVIII 204 protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> FVIII 205 protein sequence

<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> Artificial Sequence
<220><223> pSYN FVIII 266 protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> pSYN FVIII 267 protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> pSYN FVIII 268 protein sequence

<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> Artificial Sequence
<220><223> pSYN FVIII 269 protein sequence
<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> Artificial Sequence

<220><223> pSYNFVIII 271 protein sequence

<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> Artificial Sequence
<220><223> pSYN FVIII protein sequence 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> Artificial Sequence

<220><223> pSYN VWF 031 protein sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> pSYN VWF 034 protein sequence

<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> Artificial Sequence
<220><223> pSYN VWF 036 protein sequence
<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> Artificial Sequence

<220><223> pSYN Fc-015 protein sequence

<400> 121

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

20 25 30

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

35 40 45

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

50 55 60

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

65 70 75 80

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

85 90 95

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

100 105 110

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

115 120 125

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

130 135 140

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys

145 150 155 160

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> Artificial Sequence

<220><223> polypeptide

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<220><223> pSYNFVIII 010

<400> 125

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 tttcaacatc 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 ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540

gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcattggag ccctactagt atgtagagaa 600

gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta 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 catttcttgt gaggaaccat 900

cgccaggcgt ccttggaaat ctcgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg 960

gaccttggac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacatga tggcatggaa 1020

gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaaccccaac 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 gggaagttgg agacacactg 1440

ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact 1500

gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaaaggtg taaaacattt gaaggatttt 1560

ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca 1620

actaaatcag atcctcggtg cctgacccgc tattactcta gtttcgttaa tatggagaga 1680

gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa 1740

agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag 1800

aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tccccaatcc agctggagtg 1860

cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtt 1920

tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggtgg catactggta cattctaagc 1980

attggagcac agactgactt cctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa 2040

atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg 2100

atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc 2160

atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt 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 gaagttgaag ataatatcat ggtaactttc 2700

agaaatcagg cctctcgtcc ctattccttc tattctagcc ttatttctta tgaggaagat 2760

cagaggcaag gagcagaacc tagaaaaaac tttgtcaagc ctaatgaaac caaaacttac 2820

ttttggaaag tgcaacatca tatggcaccc actaaagatg agtttgactg caaagcctgg 2880

gcttatttct ctgatgttga cctggaaaaa gatgtgcact caggcctgat tggacccctt 2940

ctggtctgcc acactaacac actgaaccct gctcatggga gacaagtgac agtacaggaa 3000

tttgctctgt ttttcaccat ctttgatgag accaaaagct ggtacttcac tgaaaatatg 3060

gaaagaaact gcagggctcc ctgcaatatc cagatggaag atcccacttt taaagagaat 3120

tatcgcttcc atgcaatcaa tggctacata atggatacac tacctggctt agtaatggct 3180

caggatcaaa ggattcgatg gtatctgctc agcatgggca gcaatgaaaa catccattct 3240

attcatttca gtggacatgt gttcactgta cgaaaaaaag aggagtataa aatggcactg 3300

tacaatctct atccaggtgt ttttgagaca gtggaaatgt taccatccaa agctggaatt 3360

tggcgggtgg aatgccttat tggcgagcat ctacatgctg ggatgagcac acttttttctg 3420

gtgtacagca ataagtgtca gactcccctg ggaatggctt ctggacacat tagagatttt 3480

cagattacag cttcaggaca atatggacag tgggccccaa agctggccag acttcattat 3540

tccggatcaa tcaatgcctg gagcaccaag gagccctttt cttggatcaa ggtggatctg 3600

ttggcaccaa tgattattca cggcatcaag acccagggtg cccgtcagaa gttctccagc 3660

ctctacatct ctcagtttat catcatgtat agtcttgatg ggaagaagtg gcagacttat 3720

cgaggaaatt ccactggaac cttaatggtc ttctttggca atgtggattc atctgggata 3780

aaacacaata tttttaaccc tccaattatt gctcgataca tccgtttgca cccaactcat 3840

tatagcattc gcagcactct tcgcatggag ttgatgggct gtgatttaaa tagttgcagc 3900

atgccattgg gaatggagag taaagcaata tcagatgcac agattactgc ttcatcctac 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 tctcttttt 4200

cagaatggca aagtaaaggt ttttcaggga aatcaagact ccttcacacc tgtggtgaac 4260

tctctagacc caccgttact gactcgctac cttcgaattc acccccagag ttgggtgcac 4320

cagattgccc tgaggatgga ggttctgggc tgcgaggcac aggacctcta cgacaaaact 4380

cacacatgcc caccgtgccc agctccagaa ctcctgggcg gaccgtcagt cttcctcttc 4440

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc 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 gcctggtcaa 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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence
<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> Artificial Sequence
<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
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 Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly
85 90 95

Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly
100 105 110
Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu 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> 131

<211> 144

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AE144_5A

<400> 131

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

Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser

65 70 75 80

Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly

85 90 95

Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser

100 105 110

Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser

115 120 125

Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly

130 135 140

<210> 132

<211> 144

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AE144_6B

<400> 132

Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser

1 5 10 15

Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu
20 25 30
Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly
35 40 45

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> Artificial Sequence
<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence

<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> Artificial Sequence
<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> Artificial Sequence

<220><223> linker

<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> Artificial Sequence

<220><223> linker

<220><221> REPEAT

<222> (1)..(5)

<223> May be repeated 1 to 10 times

<400> 139

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 140

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> linker

<220><221> REPEAT

<222> (2)..(6)

<223> May be repeated 1 to 10 times

<400> 140

Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

(a)(i) 폰 빌레브란트 인자 (von Willebrand Factor: VWF) 의 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 VWF 단편,

(ii) 제 1 연장된 길이의 폴리펩타이드 (XTEN), 및

(iii) 제 1 Fc 구역

을 포함하는 제 1 폴리펩타이드 및

(b)(i) VIII 인자 (FVIII) 단백질 및

(ii) 제 2 Fc 구역

을 포함하는 제 2 폴리펩타이드

를 포함하는 키메라 단백질로서,

VWF 단편의 D' 도메인은 서열 번호 2 의 764 번 내지 866 번 아미노산으로 이루어지고, VWF 단편의 D3 도메인은 서열 번호 2 의 867 번 내지 1240 번 아미노산아미노산에서 1099 번 잔기, 1142 번 잔기 또는 1099 번 및 1142 번 잔기 모두가 시스테인 이외의 아미노산으로 치환된 아미노산 서열로 이루어지고,

제 1 Fc 구역 및 제 2 Fc 구역 간에 하나 이상의 이황화 결합이 형성되는 것인,

키메라 단백질.

【변경후】

(a)(i) 폰 빌레브란트 인자 (von Willebrand Factor: VWF) 의 D' 도메인 및 D3 도메인을 포함하는 VWF 단편,

(ii) 제 1 연장된 길이의 폴리펩타이드 (XTEN), 및

(iii) 제 1 Fc 구역

을 포함하는 제 1 폴리펩타이드 및

(b)(i) VIII 인자 (FVIII) 단백질 및

(ii) 제 2 Fc 구역

을 포함하는 제 2 폴리펩타이드

를 포함하는 키메라 단백질로서,

VWF 단편의 D' 도메인은 서열 번호 2 의 764 번 내지 866 번 아미노산으로 이루어지고, VWF 단편의 D3 도메인은 서열 번호 2 의 867 번 내지 1240 번 아미노산에서 1099 번 잔기, 1142 번 잔기 또는 1099 번 및 1142 번 잔기 모두가 시스테인 이외의 아미노산으로 치환된 아미노산 서열로 이루어지고,

제 1 Fc 구역 및 제 2 Fc 구역 간에 하나 이상의 이황화 결합이 형성되는 것인,

키메라 단백질.