

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 036944

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2021.01.19

(51) Int. Cl. C07K 14/755 (2006.01)  
A61K 48/00 (2006.01)  
C12N 15/86 (2006.01)

(21) Номер заявки  
201891138

(22) Дата подачи заявки  
2016.11.11

(54) ВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ, КОДИРУЮЩИЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВАРИАНТЫ FVIII С ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ГЕМОФИЛИИ А

(31) 62/255,323

(56) US-A1-2015071883

(32) 2015.11.13

DATABASE Geneseq [Online], 5 December 2013 (2013-12-05), "Human diseases associated protein encoding optimized ORF, SEQ ID 1811.", XP002766199, retrieved from EBI accession no. GSN:BAW43417, Database accession no. BAW43417, sequence & WO 2013/151666 A2 (MODERNA THERAPEUTICS [US]), 10 October 2013 (2013-10-10), abstract; claims 1,2; figure 1; sequence 1811

(33) US

US-A1-2013017997

(43) 2018.12.28

(86) PCT/US2016/061688

(87) WO 2017/083764 2017.05.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
БАКСАЛТА ИНКОРПОРЕЙТЕД  
(US); БАКСАЛТА ГМБХ (CH)

(72) Изобретатель:

Фалькнер Фалько-Гюнтер, Хорлинг  
Франциска, Ленглер Йоханнес,  
Роттенштайнер Ханспетер,  
Шайфлингер Фридрих (AT)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Данное изобретение предлагает, среди прочего, полинуклеотиды с измененными кодонами, кодирующие варианты фактора VIII для экспрессии в клетках млекопитающих. В некоторых вариантах реализации изобретения в описании также представлены векторы для генной терапии млекопитающих и способы лечения гемофилии А.

B1

036944

036944  
B1

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/255 323, поданной 13 ноября 2015 г., содержание которой включено в данное описание посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

### Список последовательностей

В данном приложении содержится список последовательностей, который представлен в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в данное описание посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 7 ноября 2016 г. имеет имя 008073\_5115\_WO\_Sequence\_Listing.txt и имеет размер 183,311 байт.

### Уровень техники

Коагуляция крови протекает посредством сложного и динамического биологического пути взаимозависимых биохимических реакций, называемого каскадом коагуляции. Фактор коагуляции VIII (FVIII) является ключевым компонентом каскада. Фактор VIII поступает в места кровотечения и образует комплекс Хазы с активированным Фактором IX (FIXa) и Фактором X (FX). Комплекс Хазы активирует FX, который, в свою очередь, активирует превращение протромбина в тромбин, который затем активирует другие компоненты в коагуляционном каскаде для создания стабильного тромба (см. Saenko et al., Trends Cardiovasc. Med., 9:185-192 (1999); Lenting et al., Blood, 92:3983-3996 (1998)).

Гемофилия А представляет собой врожденное Х-сцепленное расстройство свертывания крови, характеризующееся дефицитом активности фактора VIII. Уменьшенная активность фактора VIII ингибирует контур положительной обратной связи в каскаде коагуляции. Это приводит к неполной коагуляции, которая проявляется в виде случаев кровотечения с повышенной продолжительностью, обширного кровоподтека, спонтанным оральных и назальных кровотечений, суставной жесткостью и хронической болью и, возможно, внутреннего кровотечения и анемии в тяжелых случаях (Zhang et al., Clinic. Rev. Allerg. Immunol., 37:114-124 (2009)).

Обычно при гемофилии А применяется заместительная терапия фактора VIII, которая состоит из введения белка фактора VIII (например, полученного из плазмы или рекомбинантно фактора VIII) человеку с гемофилией А. Фактор VIII вводится профилактически для предотвращения или уменьшения частоты случаев кровотечения, в ответ на эпизод острого кровотечения и/или периоперационно, чтобы кровотечение было управляемым во время операции. Однако существует несколько нежелательных особенностей заместительной терапии фактора VIII.

Во-первых, заместительная терапия фактора VIII используется для лечения или контроля гемофилии А, но не излечивает лежащий в основе дефицит фактора VIII. Из-за этого люди с гемофилией А требуют заместительной терапии фактора VIII на протяжении всей своей жизни. Непрерывное лечение является дорогостоящим и требует от человека соблюдения строгого режима терапии, поскольку отсутствие приема лишь нескольких профилактических доз может иметь серьезные последствия для лиц с тяжелой формой гемофилии А.

Во-вторых, поскольку фактор VIII имеет относительно короткий период полувыведения *in vivo*, традиционная профилактическая заместительная терапия фактора VIII требует введения каждый второй или третий день. Это налагает нагрузку на человека в виде соблюдения терапии на протяжении всей его жизни. В то время как препараты третьего поколения «длительного действия» фактора VIII могут снизить частоту введения, профилактическая заместительная терапия фактора FVIII с этими препаратами по-прежнему требует ежемесячного, еженедельного или более частого применения в течении неограниченного срока. Например, профилактическое лечение с помощью ELOCTATE™ [Antihemophilic Factor (Recombinant), Fc Fusion Protein] требует введения каждые три-пять дней (ELOCTATE™ Prescription Information, Biogen Idec Inc., (2015)). Более того, долгосрочные эффекты химически модифицированных биологических препаратов (например, пегилированных полипептидов) еще не полностью изучены.

В-третьих, от 15 до 30% всех лиц, получающих заместительную терапию фактора VIII, образуют ингибирующие антитела к фактору VIII, что делает терапию неэффективной. Обходная терапия фактора VIII (например, введение комплексных концентратов протромбинового комплекса из плазмы или полученного рекомбинантно) можно использовать для лечения гемофилии у индивидуумов, у которых образуются ингибирующие антитела. Однако обходная терапия фактора VIII менее эффективна, чем заместительная терапия фактора VIII (Mannucci P.M., J Thromb Haemost., 1 (7) : 1349-55 (2003) ) и может быть связана с повышенным риском сердечно-сосудистых осложнений (Luu and Ewenstein, Haemophilia, 10 Suppl. 2:10-16 (2004)).

Соматическая генная терапия имеет большие перспективы в лечении гемофилии А, потому что она устраняет лежащую в основе недостаточную экспрессию фактора VIII (например, из-за миссенс- или нонсенс-мутаций), а не обеспечивает одноразовую дозу активности фактора VIII для индивида. Из-за этой разницы в механизме действия по сравнению с заместительной терапией фактора VIII однократное введение вектора генной терапии фактора VIII может в течение нескольких лет обеспечивать индивидуума фактором VIII, снижая затраты на лечение и устранивая необходимость в продолжении соблюдения терапии пациентом.

Генная терапия фактора коагуляции IX (FIX) была эффективно использована для лечения людей с гемофилией В, связанного с ней состояния свертывания крови, характеризующегося сниженной активностью фактора IX (Manno C.S., et al., Nat Med., 12(3):342-47 (2006)). Однако генная терапия фактора VIII имеет несколько уникальных проблем. Например, полноразмерный полипептид фактора VIII дикого типа (2351 аминокислота, номер доступа UniProt P00451) в пять раз больше, чем полноразмерный полипептид фактора IX дикого типа (461 аминокислота, номер доступа UniProt P00740). По существу, кодирующая последовательность фактора VIII дикого типа представляет собой 7053 пары оснований, которые слишком велики для вставки в векторы генной терапии AAV. Кроме того, наблюдаемая экспрессия рекомбинантных вариантов с удаленным В-доменом фактора VIII (BDD-FVIII) была низкой. Таким образом, несколько групп пытались изменить использование кодонов конструкций BDD-FVIII с ограниченным успехом.

#### Краткое описание сущности изобретения

Соответственно, существует потребность в вариантах фактора VIII, кодирующие последовательности которых более эффективно упаковываются и переносятся с помощью векторов генной терапии. Существует также потребность в синтетических нуклеиновых кислотах с измененными кодонами, которые экспрессируют фактор VIII более эффективно. Такие варианты фактора VIII и нуклеиновые кислоты с измененными кодонами, позволяют улучшить лечение дефицитов фактора VIII (например, гемофилии А). Вышеупомянутые недостатки и другие проблемы, связанные с лечением дефицитов фактора VIII (например, гемофилии А), снижаются или устраняются описанными вариантами фактора VIII с измененными кодонами.

В соответствии с некоторыми вариантами реализации данное изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующими варианты фактора VIII, которые имеют высокую идентичность последовательности с описанными последовательностями с измененными кодонами тяжелой цепи фактора VIII (например, CS01-HC-NA, CS04-HC-NA или CS23-HC-NA) и легкой цепи (CS01-LC-NA, CS04-LC-NA или CS23-LC-NA). В некоторых вариантах реализации изобретения эти нуклеиновые кислоты дополнительно содержат последовательность, кодирующую линкерную последовательность, которая заменяет нативный В-домен фактора VIII (например, линкерные последовательности, содержащие фуриновый сайт расщепления) между последовательностями, кодирующими тяжелые и легкие цепи фактора VIII.

В одном аспекте данное изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фактора VIII. Полипептид фактора VIII содержит легкую цепь, тяжелую цепь и полипептидный линкер, соединяющий С-конец тяжелой цепи с N-концом легкой цепи. Тяжелая цепь полипептида фактора VIII кодируется первой нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS04-HC-NA (SEQ ID NO: 3). Легкая цепь полипептида фактора FVIII кодируется второй нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS04-LC-NA (SEQ ID NO: 4). Полипептидный линкер содержит фуриновый сайт расщепления.

В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полипептидный линкер кодируется третьей нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью BDLO04 (SEQ ID NO: 6).

В одном аспекте данное изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фактора VIII. Полипептид фактора VIII содержит легкую цепь, тяжелую цепь и полипептидный линкер, соединяющий С-конец тяжелой цепи с N-концом легкой цепи. Тяжелая цепь полипептида фактора VIII кодируется первой нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS01-HC-NA (SEQ ID NO: 24). Легкая цепь полипептида фактора FVIII кодируется второй нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS01-LC-NA (SEQ ID NO: 25). Полипептидный линкер содержит фуриновый сайт расщепления.

В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полипептидный линкер кодируется третьей нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью BDLO01 (SEQ ID NO: 5).

В одном аспекте данное изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фактора VIII. Полипептид фактора VIII содержит легкую цепь, тяжелую цепь и полипептидный линкер, соединяющий С-конец тяжелой цепи с N-концом легкой цепи. Тяжелая цепь полипептида фактора VIII кодируется первой нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS23-HC-NA (SEQ ID NO: 22). Легкая цепь полипептида фактора FVIII кодируется второй нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS23-LC-NA (SEQ ID NO: 23). Полипептидный линкер содержит фуриновый сайт расщепления.

В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полипептидный линкер кодируется третьей нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью BDLO23 (SEQ ID NO: 7).

В одном варианте реализации описанных выше полинуклеотидов первая нуклеотидная последова-







ность имеет по меньшей мере 97% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из CS01-FL-NA, CS01-HC-NA, CS01-LC-NA, CS04-FL-NA, CS04-HC-NA, CS04-LC-NA, CS23-FL-NA, CS23-HC-NA, CS23-LC-NA, CS01-SC1-NA, CS04-SC1-NA, CS23-SC1-NA, CS01-SC2-NA, CS04-SC2-NA и CS23-SC2-NA.

В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из CS01-FL-NA, CS01-HC-NA, CS01-LC-NA, CS04-FL-NA, CS04-HC-NA, CS04-LC-NA, CS23-FL-NA, CS23-HC-NA, CS23-LC-NA, CS01-SC1-NA, CS04-SC1-NA, CS23-SC1-NA, CS01-SC2-NA, CS04-SC2-NA и CS23-SC2-NA.

В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из CS01-FL-NA, CS01-HC-NA, CS01-LC-NA, CS04-FL-NA, CS04-HC-NA, CS04-LC-NA, CS23-FL-NA, CS23-HC-NA, CS23-LC-NA, CS01-SC1-NA, CS04-SC1-NA, CS23-SC1-NA, CS01-SC2-NA, CS04-SC2-NA и CS23-SC2-NA.

В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99,5% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из CS01-FL-NA, CS01-HC-NA, CS01-LC-NA, CS04-FL-NA, CS04-HC-NA, CS04-LC-NA, CS23-FL-NA, CS23-HC-NA, CS23-LC-NA, CS01-SC1-NA, CS04-SC1-NA, CS23-SC1-NA, CS01-SC2-NA, CS04-SC2-NA и CS23-SC2-NA.

В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99,5% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из CS01-FL-NA, CS01-HC-NA, CS01-LC-NA, CS04-FL-NA, CS04-HC-NA, CS04-LC-NA, CS23-FL-NA, CS23-HC-NA, CS23-LC-NA, CS01-SC1-NA, CS04-SC1-NA, CS23-SC1-NA, CS01-SC2-NA, CS04-SC2-NA и CS23-SC2-NA.

В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из CS01-FL-NA, CS01-HC-NA, CS01-LC-NA, CS04-FL-NA, CS04-HC-NA, CS04-LC-NA, CS23-FL-NA, CS23-HC-NA, CS23-LC-NA, CS01-SC1-NA, CS04-SC1-NA, CS23-SC1-NA, CS01-SC2-NA, CS04-SC2-NA и CS23-SC2-NA.

В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, кодируемый полипептид фактора VIII содержит гликозилируемый полипептид, расположенный между двумя последовательными аминокислотами.

В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полинуклеотид также содержит промоторный элемент, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим полипептид фактора VIII.

В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полинуклеотид также содержит энхансерный элемент, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим полипептид фактора VIII.

В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полинуклеотид также содержит элемент полиаденилирования, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим полипептид фактора VIII.

В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полинуклеотид также содержит инtron, оперативно связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид фактора VIII.

В одном варианте реализации описанных выше полинуклеотидов инtron расположен между промоторным элементом и сайтом инициации трансляции (например, первым кодирующим ATG) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид фактора VIII.

В другом аспекте описание предлагает вектор генной терапии млекопитающих, содержащий полинуклеотид, как описано выше.

В одном варианте реализации вектора генной терапии млекопитающих, описанного выше, вектор генной терапии млекопитающих представляет собой вектор аденоассоциированного вируса (AAV).

В одном варианте реализации вектора генной терапии млекопитающих, описанного выше, вектор AAV представляет собой вектор AAV-8.

В другом аспекте описание предлагает способ лечения гемофилии А, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, вектора генной терапии млекопитающих, как описано выше.

В другом аспекте описание предлагает вектор генной терапии млекопитающих, как описано выше для лечения гемофилии А.

В другом аспекте описание предлагает использование вектора генной терапии млекопитающих, как описано выше, для изготовления лекарственного средства для лечения гемофилии А.

#### Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 изображены схематические иллюстрации белковых конструкций фактора VIII человека дикого типа и ReFacto-типа.

На фиг. 2А и 2В изображена нуклеотидная последовательность CS04 с измененными кодонами

(SEQ ID NO: 1), кодирующая вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS04-FL-NA" для полноразмерной кодирующей последовательности).

На фиг. 3 изображена аминокислотная последовательность фактора VIII (SEQ ID NO: 2), кодируемая нуклеотидной последовательностью CS04 с измененными кодонами, в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS04-FL-AA" для полноразмерной аминокислотной последовательности).

На фиг. 4 изображена часть нуклеотидной последовательности CS04 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 3), кодирующая тяжелую цепь варианта фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS04-HC-NA").

На фиг. 5 изображена часть нуклеотидной последовательности CS04 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 4), кодирующая легкую цепь варианта фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS04-LC-NA").

На фиг. 6 изображены примерные кодирующие последовательности (SEQ ID NOS: 5-7) для линкеров, замещающих В-домен в соответствии с некоторыми вариантами реализации. BDLO01 (SEQ ID NO: 5), BDLO04 (SEQ ID NO: 6) и BDLO23 (SEQ ID NO: 7) являются соответствующими частями CS01, CS04 и CS23 нуклеотидных последовательностей с измененными кодонами, которые кодируют линкер, замещающий В-домен соответственно.

На фиг. 7А, 7В и 7С изображена векторная последовательность AAV (SEQ ID NO: 8), содержащая нуклеотидную последовательность CS04 с измененными кодонами, в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS04-AV-NA").

На фиг. 8А и 8В изображена нуклеотидная последовательность CS04Δ с измененными кодонами (760-1667) (SPI; CS04Δ (741-1648), SPE) (SEQ ID NO: 9), кодирующая одноцепочечный вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS04-SC1-NA").

На фиг. 9 изображена аминокислотная последовательность варианта фактора VIII (SEQ ID NO: 10), кодируемая CS01Δ (760-1667) (SPI; CS01Δ (741-1648), SPE), CS04Δ (760-1667) (SPI, CS04Δ (741-1648), SPE) и CS23Δ (760-1667) (SPI; CS23Δ (741-1648), SPE) нуклеотидными последовательностями с измененными кодонами в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS01-SC1-AA" "CS04-SC1-AA" и "CS23-SC1-AA" соответственно).

На фиг. 10А и 10В изображена нуклеотидная последовательность CS04Δ с измененными кодонами (772-1667) (SPI; CS04Δ (753-1648), SPE) (SEQ ID NO: 11), кодирующая одноцепочечный вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS04-SC2-NA").

На фиг. 11 изображена аминокислотная последовательность фактора VIII (SEQ ID NO: 12), кодируемая CS01Δ (772-1667) (SPI; CS01Δ (753-1648), SPE), CS04Δ (772-1667) (SPI, CS04Δ (753-1648), SPE) и CS23Δ (772-1667) (SPI; CS23Δ (753-1648), SPE) нуклеотидными последовательностями с измененными кодонами, в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS01-SC2-AA" "CS04-SC2-AA" и "CS23-SC2-AA" соответственно).

На фиг. 12А и 12В изображена нуклеотидная последовательность CS01 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 13), кодирующая вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS01-FL-NA").

На фиг. 13А и 13В изображена нуклеотидная последовательность CS08 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 14), кодирующая вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS08-FL-NA").

На фиг. 14А и 14В изображена нуклеотидная последовательность CS10 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 15), кодирующая вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS10-FL-NA").

На фиг. 15А и 15В изображена нуклеотидная последовательность CS11 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 16), кодирующая вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS11-FL-NA").

На фиг. 16А и 16В изображена кодирующая последовательность ReFacto дикого типа CS40 (SEQ ID NO: 17) в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS40-FL-NA").

На фиг. 17А и 17В изображена нуклеотидная последовательность CH25 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 18), кодирующая вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CH25-FL-NA").

На фиг. 18 изображена аминокислотная последовательность фактора VIII дикого типа человека (SEQ ID NO: 19) в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("FVIII-FL-AA").

На фиг. 19 изображена схема клонирования конструкций pCS40, pCS01, pCS04, pCS08, pCS10, pCS11 и pCh25 путем вставки синтетических последовательностей ДНК BDD-FVTII типа Refacto в векторную основную цепь pCh-BB01 с помощью сайтов рестрикции AscI и NotI.

На фиг. 20 изображена целостность препаратов генома AAV-вектора, анализируемая с помощью электрофореза в агарозном геле. Дорожка 1, маркер ДНК; дорожка 2, VCS40; дорожка 3, vCS01; дорожка 4, VCS04. AAV-векторы все имеют одинаковые размеры генома, мигрирующие примерно на 5 кб (стрелка, правая сторона). Шкала с левой стороны указывает размер фрагментов ДНК в килобазах (кб).

На фиг. 21 изображен белковый анализ векторных препаратов AAV с помощью PAGE и окрашивания серебром. Дорожка 1, маркер белка (M) ; дорожка 2, vCS40; дорожка 3, vCS01 и дорожка 4, vCS04. Все конструкции имеют одинаковые капсиды AAV8, состоящие из VP1, VP2 и VP3 (стрелки справа) . Шкала на левой стороне указывает размер маркера белка в килодалтонах (кДа).

На фиг. 22А и 22В изображена нуклеотидная последовательность CS23 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 20), кодирующая вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS23-FL-NA").

На фиг. 23 изображена аминокислотная последовательность фактора VIII (SEQ ID NO: 21), кодируемая нуклеотидной последовательностью CS23 с измененными кодонами, в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS23-FL-AA").

На фиг. 24 изображена часть нуклеотидной последовательности CS23 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 22), кодирующая тяжелую цепь варианта фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS23-HC-NA").

На фиг. 25 изображена часть нуклеотидной последовательности CS23 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 23), кодирующая легкую цепь варианта фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS23-LC-NA").

На фиг. 26 изображена часть нуклеотидной последовательности CS01 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 24), кодирующая тяжелую цепь варианта фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS01-HC-NA").

На фиг. 27 изображена часть нуклеотидной последовательности CS01 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 25), кодирующая легкую цепь варианта фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS01-LC-NA").

На фиг. 28А и 28В изображена нуклеотидная последовательность CS01Δ (760-1667) (SPI; CS01Δ (741-1648), SPE) с измененными кодонами (SEQ ID NO: 26), кодирующая одноцепочечный вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS01-SC1-NA").

На фиг. 29А и 29В изображена нуклеотидная последовательность CS01Δ (772-1667) (SPI; CS01Δ (753-1648), SPE) с измененными кодонами (SEQ ID NO: 27), кодирующая одноцепочечный вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS01-SC2-NA").

На фиг. 30А и 30В изображена нуклеотидная последовательность CS23Δ(760-1667) (SPI; CS23Δ(741-1648), SPE) с измененными кодонами (SEQ ID NO: 28), кодирующая одноцепочечный вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS23-SC1-NA").

На фиг. 31А и 31В изображена нуклеотидная последовательность CS23Δ с измененными кодонами (772-1667) (SPI; CS23Δ (753-1648), SPE) (SEQ ID NO: 29), кодирующая одноцепочечный вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS23-SC2-NA").

### Подробное описание сущности изобретения

#### Введение

Генная терапия на основе AAV имеет большие перспективы для лечения гемофилии. Для гемофилии В первые клинические данные обнадеживают тем, что уровни FIX около 10% могут поддерживаться, по крайней мере, у некоторых пациентов более 1 года. Однако для гемофилии А достижение терапевтических уровней экспрессии 5-10% с помощью векторов AAV остается сложным по различным причинам. Во-первых, кодирующая последовательность

фактора VIII слишком велика для обычных векторов на основе AAV. Во-вторых, сконструированные конструкции фактора VIII с удаленным или укороченным В-доменом проявляют слабую экспрессию *in vivo*, даже при оптимизации кодонов. В-третьих, эти варианты фактора VIII с удаленным или укороченным В-доменом имеют короткий период полураспада *in vivo*, что усугубляет последствия слабой экспрессии. В-четвертых, даже при экспрессии FVIII эффективно не секретируется из клеток, как и другие факторы свертывания, такие как фактор IX.

Более того, эти проблемы не могут быть решены путем простого введения более высоких доз конструкции генной терапии. Согласно современным знаниям, доза вектора генной терапии на основе AAV должна быть увеличена выше  $2 \times 10^{12}$  vg/kg массы тела (векторных геномов/кг). Это связано с тем, что при таких высоких дозах активируется Т-клеточный иммунный ответ, который разрушает трансфектированные клетки и, как следствие, трансгенная экспрессия уменьшается или даже пропадает. Поэтому необходимы стратегии улучшения экспрессии FVIII, чтобы сделать генную терапию FVIII жизнеспособным вариантом терапии для пациентов с гемофилией А.

Данное описание относится к обнаружению вариантов кодирующих последовательностей фактора VIII с измененными кодонами, которые решают эти и другие проблемы, связанные с генной терапией фактора VIII. Например, описанные в данном документе полинуклеотиды обеспечивают заметно улучшенную экспрессию в клетках млекопитающих и демонстрируют улучшенную упаковку вириона из-за стабилизированных взаимодействий упаковки. В некоторых вариантах реализации эти преимущества реализованы с использованием кодирующих последовательностей для тяжелых и легких цепей фактора VIII с высокой идентичностью последовательностей с конструкциями с измененными кодонами CS01,

CS04 и CS23 (например, с высокой идентичностью последовательности в сравнении с одной из CS01-НС, CS04-НС и CS23-НС тяжелой цепи и высокой идентичностью последовательности в сравнении с одной из последовательностей CS01-LC, CS04-LC и CS23-LC, кодирующих легкую цепь).

В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы фактора VIII, кодируемые описанными в данном документе полинуклеотидами, были укорочены путем усечения, удаления или замены В-домена дикого типа. Как таковые, полинуклеотиды лучше подходят для экспрессии фактора VIII с помощью обычных векторов генной терапии, которые неэффективно экспрессируют более крупные полипептиды, такие как фактор VIII дикого типа.

Преимущественно в данном документе показано, что кодирующие последовательности CS01, CS04 и CS23 с измененными кодонами, кодирующие фактор VIII, обеспечивают превосходную экспрессию конструкции фактора VIII с удаленным В-доменом *in vivo*. Например, в примере 2 и в табл. 4 показано, что внутривенное введение векторов генной терапии на основе AAV, имеющих CS01 (SEQ ID NO: 13), CS04 (SEQ ID NO: 1) и CS23 (SEQ ID NO: 20) обеспечивают 18-кратное, 74-кратное и 30-кратное увеличение экспрессии фактора VIII по сравнению с соответствующей конструкцией CS40, кодированной полинуклеотидной последовательностью дикого типа (SEQ ID NO: 17), в нокаутных мышах по фактору VIII (табл. 4).

Кроме того, в данном документе также показано, что вариабельные кодирующие последовательности CS01 и CS04 фактора VIII с измененными кодонами, обеспечивают превосходную упаковку вирионов и производство вирусов. Например, в примере 1 показано, что векторные конструкции AAV, содержащие конструкции CS01 и CS04, обеспечивают в 5-7 раз больший вирусный выход по сравнению с соответствующей конструкцией CS40, кодируемой полинуклеотидной последовательностью дикого типа, при выделении из того же количества клеточного осадка.

### Определения

Как используется в данном документе, следующие термины имеют значения, приписываемые им, если не указано иное.

Используемые в данном документе термины "Фактор VIII" и "FVIII" используются взаимозаменяя-  
мо и относятся к любому белку с активностью фактора VIII (например, активному FVIII, часто называемому FVIIIa) или предшественнику (например, пре-белку или пре-пре-белку) белка с активностью Фактора VIII, в частности кофакторной активностью Фактора IXa. В типовом варианте реализации полипептид фактора VIII относится к полипептиду, который имеет последовательности с высокой идентичностью последовательности (например, по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99% и более) тяжелых и легких цепей полипептида фактора VIII дикого типа. В некоторых вариантах реализации В-домен полипептида фактора VIII удаляют, усекают или заменяют линкерным полипептидом, чтобы уменьшить размер полинуклеотида, кодирующего полипептид фактора VIII. В типовом варианте реализации изобретения аминокислоты 20-1457 CS04-FL-AA составляют полипептид фактора VIII.

Неограничивающие примеры полипептидов фактора VIII дикого типа включают в себя пре-про-Фактор VIII человека (например, согласно номерам доступа GenBank AAA52485, CAA25619, AAA58466, AAA52484, AAA52420, AAV85964, BAF82636, BAG36452, CAI41660, CAI41666, CAI41672, CAI43241, CAO03404, EAW72645, AAH22513, AAH64380, AAH98389, AAI11968, AAI11970 или AAB61261), соответствующий про-Фактор VIII и их природные варианты; свиной пре-про-Фактор VIII (например, согласно номерам доступа UniProt F1RZ36 или K7GSZ5), соответствующий про-Фактора VIII и их природные варианты; пре-про-Фактор VIII мыши (например, согласно номерам доступа GenBank AAA37385, CAM15581, CAM26492 или EDL29229), соответствующий про-Фактор VIII и их природные варианты; пре-про-Фактор VIII крысы (например, согласно номеру доступа GenBank AAQ21580), соответствующий про-Фактор VIII и их природные варианты; пре-про-Фактор VIII крысы; и другие гомологи Фактора VIII млекопитающих (например, обезьяны, примата, хомяка, морской свинки и т.д.).

Используемый в данном документе термин полипептид фактора VIII включает естественные варианты и искусственные конструкции с кофакторной активностью Фактора IX. Как используется в данном описании, термин фактор VIII охватывает любые природные варианты, альтернативные последовательности, изоформы или мутантные белки, которые сохраняют базальную кофакторную активность фактора IX (например, по меньшей мере 5, 10, 25, 50, 75%, или более соответствующей активности дикого типа). Примеры вариаций аминокислот фактора VIII (относительно FVTII-FL-AA (SEQ ID NO: 19)), обнаруженные в популяции человека, включают, но не ограничиваются ими, S19R, R22T, Y24C, Y25C, L26P/R, E30V, W33G, Y35C/H, G41C, R48C/K, K67E/N, L69P, E72K, D75E/V/Y, P83R, G89D/V, G92A/V, A97P, E98K, V99D, D101G/H/V, V104D, K108T, M110V, A111T/V, H113R/Y, L117F/R, G121S, E129V, G130R, E132D, Y133C, D135G/Y, T137A/I, S138R, E141K, D145H, V147D, Y155H, V159A, N163K, G164D/V, P165S, C172W, S176P, S179P, V181E/M, K185T, D186G/N/Y, S189L, L191F, G193R, L195P, C198G, S202N/R, F214V, L217H, A219D/T, V220G, D222V, E223K, G224W, T252I, V253F, N254I, G255V, L261P, P262L, G263S, G266F, C267Y, W274C, H275L, G278R, G280D, E284K, V285G, E291G/K, T294I, F295L, V297A, N299I, R301C/H/L, A303E/P, I307S, S308L, F312S, T314A/L, A315V, G323E, L326P, L327P/V, C329F, I331V, M339T, E340K, V345A/L, C348R/S/Y, Y365C, R391C/H/P, S392L/P, A394S, W401G, I405F/S, E409G, W412G/R, K427I, L431F/S, R437P/W, I438F, G439D/S/V, Y442C, K444R, Y450D/N, T454I,

F455C, G466E, P470L/R/T, G474E/R/V, E475K, G477V, D478N, T479R, F484C, A488G, R490G, Y492C/H, Y492H, I494T, P496R, G498R, R503H, G513S/V, I522Y, K529E, W532G, P540T, T541S, D544N, R546W, R550C/G/H, S553P, S554C/G, V556D, R560T, D561G/H/Y, I567T, P569R, S577F, V578A, D579A/H, N583S, Q584H/K/R, I585R/T, M586V, D588G/Y, L594Q, S596P, N601D/K, R602G, S603I/R, W604C, Y605H/S, N609I, R612C, N631K/S, M633I, S635N, N637D/I/S, Y639C, L644V, L650F, V653A/M, L659P, A663V, Q664P, F677L, M681I, V682F, Y683C/N, T686R, F698L, M699T/V, M701I, G705V, G710W, N713I, R717L/W, G720D/S, M721I/L, A723T, L725Q, V727F, E739K, Y742C, R795G, P947R, V1012L, E1057K, H1066Y, D1260E, K1289Q, Q1336K, N1460K, L1481P, A1610S, I1698T, Y1699C/F, E1701K, Q1705H, R1708C/H, T1714S, R1715G, A1720V, E1723K, D1727V, Y1728C, R1740G, K1751Q, F1762L, R1768H, G1769R, L1771P, L1775F/V, L1777P, G1779E/R, P1780L, I1782R, D1788H, M1791T, A1798P, S1799H, R1800C/G/H, P1801A, Y1802C, S1803Y, F1804S, L1808F, M1842I, P1844S, T1845P, E1848G, A1853T/V, S1858C, K1864E, D1865N/Y, H1867P/R, G1869D/V, G1872E, P1873R, L1875P, V1876L, C1877R/Y, L1882P, R1888I, E1894G, I1901F, E1904D/K, S1907C/R, W1908L, Y1909C, A1939T/V, N1941D/S, G1942A, M1945V, L1951F, R1960L/Q, L1963P, S1965I, M1966I/V, G1967D, S1968R, N1971T, H1973L, G1979V, H1980P/Y, F1982I, R1985Q, L1994P, Y1998C, G2000A, T2004R, M2007I, G2013R, W2015C, R2016P/W, E2018G, G2022D, G2028R, S2030N, V2035A, Y2036C, N2038S, 2040Y, G2045E/V, I2051S, I2056N, A2058P, W2065R, P2067L, A2070V, S2082N, S2088F, D2093G/Y, H2101D, T2105N, Q2106E/P/R, G2107S, R2109C, I2117F/S, Q2119R, F2120C/L, Y2124C, R2135P, S2138Y, T2141N, M2143V, F2145C, N2148S, N2157D, P2162L, R2169C/H, P2172L/Q/R, T2173A/I, H2174D, R2178C/H/L, R2182C/H/P, M2183R/V, L2185S/W, S2192I, C2193G, P2196R, G2198V, E2200D, I2204T, I2209N, A2211P, A2220P, P2224L, R2228G/L/P/Q, L2229F, V2242M, W2248C/S, V2251A/E, M2257V, T2264A, Q2265R, F2279C/I, I2281T, D2286G, W2290L, G2304V, D2307A, P2319L/S, R2323C/G/H/L, R2326G/L/P/Q, Q2330P, W2332R, I2336F, R2339T, G2344C/D/S и C2345S/Y. Белки фактора VIII также содержат полипептиды, содержащие посттрансляционные модификации.

Как правило, полинуклеотиды, кодирующие фактор VIII, кодируют неактивный одноцепочный полипептид (например, пре-про-белок), который подвергается посттрансляционной обработке с образованием активного белка фактора VIII (например, FVIIIa). Например, в соответствии с фиг. 1, предварительно пре-про-белок фактора VIII человека сначала расщепляется для высвобождения кодируемого сигнального пептида (не показан), образуя первый одноцепочный пре-белок (показанный как "FVIII дикого типа человека"). Пре-белок затем расщепляется между доменами B и A3 с образованием первого полипептида, который содержит тяжелую цепь фактора VIII (например, домены A1 и A2) и B-домен, и второй полипептид, который содержит легкую цепь фактора VIII (например, содержит домены A3, C1 и C3). Первый полипептид далее расщепляется для удаления B-домена, а также для отделения доменов A1 и A2, которые остаются связанными с легкой цепью фактора VIII в зрелом протеине фактора VIIIa. Для обзора процесса созревания фактора VIII см. Graw et al., Nat Rev Genet., 6 (6): 488-501 (2005), содержание которого включено в данное описание посредством ссылки во всей его полноте для всех целей.

Однако в некоторых вариантах реализации изобретения полипептид фактора VIII представляет собой одноцепочный полипептид фактора VIII. Одноцепочные полипептиды фактора VIII сконструированы с удалением природных сайтов расщепления и, необязательно, удалением, укорочением или заменой B-домена фактора VIII. Как таковые, они не созревают при расщеплении (кроме отщепления необязательного сигнального и/или лидерного пептида) и активны как одна цепь. Неограничивающие примеры одноцепочных полипептидов фактора VIII описаны в Zollner et al. (Thromb Res, 134(1):125-31 (2014)) и Donath et al. (Biochem J., 312 (1): 49-55 (1995)), описание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте для всех целей.

Используемый в данном документе термин «тяжелая цепь фактора VIII» или просто «тяжелая цепь» относится к объединению доменов A1 и A2 полипептида фактора VIII. В примерном варианте реализации изобретения аминокислоты 20-759 CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2) составляют тяжелую цепь фактора VIII.

Используемый в данном документе термин "легкая цепь фактора VIII" или просто "легкая цепь" относится к объединению доменов A3, C1 и C2 полипептида фактора VIII. В примерном варианте реализации изобретения аминокислоты 774-1457 CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2) составляют легкую цепь фактора VIII. В некоторых вариантах реализации изобретения легкая цепь фактора VIII не содержит кислый пептид a3, который высвобождается во время созревания *in vivo*.

Как правило, тяжелые и легкие цепи фактора VIII экспрессируются в виде одной полипептидной цепи, например, вместе с необязательным B-доменом или замещающим B-домен линкером. Однако в некоторых вариантах реализации изобретения тяжелая цепь фактора VIII и легкая цепь фактора VIII экспрессируются как отдельные полипептидные цепи (например, ко-экспрессированные) и восстанавливаются с образованием белка фактора VIII (например, *in vivo* или *in vitro*).

Используемые в данном документе термины "B-домен замещающий линкер" и "линкер фактора VIII" используются взаимозаменяющими и относятся к укороченным версиям B-домена фактора VIII дикого типа (например, аминокислоты 760-1667 FVIII-FL-AA (SEQ ID NO: 19)) или пептиды, сконструированные для замены B-домена полипептида фактора VIII. Как используется в данном документе, линкер фак-

тора VIII расположен между С-концом тяжелой цепи фактора VIII и N-концом легкой цепи фактора VIII в варианте полипептида фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации. Неограничивающие примеры В-домен замещающих линкеров описаны в патентах США № 4868112, 5112950, 5171844, 5543502, 5595886, 5610278, 5789203, 5972885, 6048720, 6060447, 6114148, 6228620, 6316226, 6346513, 6458563, 6924365, 7041635 и 7943374; Публикациях патентных заявок США № 2013/024960, 2015/0071883 и 2015/0158930; и в публикациях РСТ WO 2014/064277 и WO 2014/127215, описание которых включено в данное описание посредством ссылки во всей их полноте для всех целей.

Если не указано иное, нумерация аминокислот фактора VIII относится к соответствующей аминокислоте в полноразмерной последовательности человеческого фактора VIII дикого типа (FVIII-FL-AA), представленной в виде SEQ ID NO: 19 на фиг. 18. Таким образом, когда речь идет о замещении аминокислоты в варианте белка VIII фактора, описанном в данном документе, указанное количество аминокислот относится к аналогичной (например, структурно или функционально эквивалентной) и/или гомологичной (например, эволюционно консервативной в первичной аминокислотной последовательности) полноразмерной аминокислотной последовательности фактора VIII дикого типа. Например, аминокислотная замена T2105N относится к замещению T-N в положении 2105 полноразмерной последовательности фактора VIII дикого типа человека (FVIII-FL-AA, SEQ ID NO: 19) и замещению T на N в положении 1211 варианта белка фактора VIII, кодируемого CS04 (CS04-FL-AA, SEQ ID NO: 2).

Как описано в данном документе, система нумерации аминокислот фактора VIII зависит от того, входит ли в состав сигнальный пептид фактора VIII (например, аминокислоты 1-19 полноразмерной последовательности фактора VIII дикого типа человека). Когда сигнальный пептид входит в состав, нумерация обозначается как "включительно с сигнальным пептидом" или "SPI". Когда сигнальный пептид не входит в состав, нумерация обозначается как "без сигнального пептида" или "SPE". Например, F328S в SPI нумерации обозначает ту же аминокислоту, что и F309S в нумерации SPE. Если не указано иное, вся нумерация аминокислот относится к соответствующей аминокислоте в полноразмерной последовательности фактора VIII дикого типа человека (FVIII-FL-AA), представленной в виде SEQ ID NO: 19 на фиг. 18.

Как описано в данном документе, полинуклеотиды с измененными кодонами обеспечивают повышенную экспрессию трансгенного фактора VIII *in vivo* (например, при введении в качестве части вектора генной терапии) по сравнению с уровнем экспрессии фактора VIII, обеспечиваемым природной кодируемой конструкцией фактора VIII (например, полинуклеотид, кодирующий ту же самую конструкцию фактора VIII человека с использованием кодонов дикого типа). Используемый в данном документе термин "повышенная экспрессия" относится к повышенному уровню активности трансгенного фактора VIII в крови животного, которому вводили полинуклеотид с измененными кодонами, кодирующий фактор VIII, по сравнению с уровнем активности в крови животного трансгенного фактора VIII вводимого в виде природно закодированной конструкции фактора VIII. Уровни активности можно измерять с использованием любой активности фактора VIII, известной в данной области. Типовый анализ для определения активности фактора VIII представляет собой анализ Technochrome FVIII (Technoclone, Вена, Австрия).

В некоторых вариантах реализации изобретения повышенная экспрессия относится к по меньшей мере на 25% большей трансгенной активности фактора VIII в крови животного, которому вводили полинуклеотид фактора VIII с измененными кодонами, по сравнению с уровнем трансгенной активности фактора VIII в крови животного, которому вводили природно кодированный полинуклеотид фактора VIII. В некоторых вариантах реализации изобретения увеличенная экспрессия относится к по меньшей мере, на 50% большей, по меньшей мере на 75% большей, по меньшей мере на 100% большей, по меньшей мере в 3 раза большей, по меньшей мере в 4 раза большей, по меньшей мере в 5 раз большей, по меньшей мере 6 большей, по меньшей мере в 7 раз большей, по меньшей мере в 8 раз большей, по меньшей мере в 9 раз большей, по меньшей мере в 10 раз большей, по меньшей мере в 15 раз большей, по меньшей мере в 20 раз большей, по меньшей мере в 25 раз большей, по меньшей мере в 30 раз большей, по меньшей мере в 40 раз большей, по меньшей мере в 50 раз большей, по меньшей мере в 60 раз большей, по меньшей мере в 70 раз большей, по меньшей мере в 80 раз большей, по меньшей мере в 90 раз большей, по меньшей мере в 100 раз большей, по меньшей мере в 125 раз большей, по меньшей мере в 150 раз большей, по меньшей мере в 175 раз большей, по меньшей мере в 200 раз большей, по меньшей мере в 225 раз большей или, по меньшей мере, в 250 раз более высокой активности трансгенного фактора VIII в крови животного, которым вводили полинуклеотид фактора VIII с измененными кодонами, по сравнению с уровнем активности трансгенного фактора VIII в крови животного, которым вводили природно кодируемый полинуклеотид фактора VIII.

Как описано в данном документе, полинуклеотиды с измененными кодонами обеспечивают увеличенное векторное продуцирование по сравнению с уровнем векторного продуцирования, обеспечиваемым природно кодируемой конструкцией фактора VIII (например, полинуклеотидом, кодирующим ту же самую конструкцию фактора VIII человека с использованием кодонов дикого типа). Используемый в данном документе термин "повышенное продуцирование вируса" относится к увеличению выхода вектора в культуре клеток (например, титр на литр культуры), инокулированным полинуклеотидом с измененными кодонами, кодирующим фактор VIII, по сравнению с выходом вектора в культуре клеток, иноку-

лированным природно кодируемой конструкцией фактора VIII. Данные о выходе вектора могут быть получены с использованием любого анализа титра вектора, известного в данной области. Типовый анализ для определения выхода вектора (например, вектора AAV) представляет собой qPCR с использованием инвертированных терминальных повторов AAV2 (Aurthammer, Human Gene Therapy Methods: Part B 23:18-28 (2012)).

В некоторых вариантах реализации изобретения увеличение производства вируса относится к по меньшей мере на 25% большему выходу вектора с измененными кодонами, по сравнению с выходом природно кодируемой конструкции фактора VIII в культуре того же типа. В некоторых вариантах реализации изобретения увеличенное векторное производство относится к по меньшей мере, на 50% большему, по меньшей мере на 75% большему, по меньшей мере на 100% большему, по меньшей мере в 3 раза большему, по меньшей мере в 4 раза большему, по меньшей мере в 5 раз большему, по меньшей мере в 6 раз большему, по меньшей мере в 7 раз большему, по меньшей мере в 8 раз большему, по меньшей мере в 9 раз большему, по меньшей мере в 10 раз большему, по меньшей мере в 15 раз большему или, по меньшей мере, в 20 раз большему выходу вектора по сравнению с выходом природно кодируемой конструкции фактора VIII в культуре одного и того же типа.

Используемый в данном документе термин "гемофилия" относится к группе болезненных состояний, широко характеризующихся сниженной свертываемостью крови или коагуляции. Гемофилия может относиться к гемофилии типа А, типа В или типа С или к совокупности всех трех типов заболеваний. Гемофилия типа А (гемофилия А) вызвана снижением или потерей активности фактора VIII (FVIII) и является наиболее известным из подтипов гемофилии. Гемофилия типа В (гемофилия В) является результатом потери или уменьшения функции фактора свертывания IX (FIX). Гемофилия типа С (гемофилия С) является следствием потери или снижения активности фактора свертывания XI (FXI). Гемофилия А и В являются X-связанными заболеваниями, тогда как гемофилия С является аутосомной. Обычные способы лечения гемофилии включают как профилактическое введение, так и введение по необходимости факторов свертывания крови, таких как FVIII, FIX, включая Bebulin®-VH и FXI, а также инфузии FEIBA-VH, десмопрессина и плазмы.

Используемый в данном документе термин "генная терапия FVIII" включает в себя любой терапевтический подход к предоставлению пациенту нуклеиновой кислоты, кодирующую фактор VIII, для облегчения, уменьшения или предотвращения повторения одного или нескольких симптомов (например, клинических факторов), связанных с гемофилией. Термин включает проведение процедуры, соблюдение режима, введение любого соединения, лекарственного средства, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу фактора VIII, включая любую модифицированную форму фактора VIII (например, вариант фактора VIII) для поддержания или улучшения здоровья человека, больного гемофилией. Специалист в данной области поймет, что либо курс терапии FVIII, либо дозу терапевтического агента FVIII можно изменить, например, на основании результатов, полученных в соответствии с данным изобретением.

Используемый в данном документе термин "обходная терапия" включает в себя любой терапевтический подход, предусматривающий предоставление гемостатических агентов, не относящихся к фактору VIII, соединений или факторов коагуляции пациенту для облегчения, уменьшения или предотвращения повторения одного или нескольких симптомов (например, клинических факторов) связанных с гемофилией. Соединения, не относящиеся к фактору VIII и факторы коагуляции включают, но не ограничиваются ими, обходную активность фактора VIII (FEIBA), рекомбинантный активированный фактор VII (FVIIa), протромбиновые комплексные концентраты и активированные комплексные концентраты протромбина. Эти соединения, не относящиеся к фактору VIII и факторы коагуляции могут быть получены рекомбинантно или из плазмы. Специалист в данной области поймет, что либо курс обходной терапии, либо доза обходной терапии могут быть изменены, например, на основании результатов, полученных в соответствии с данным изобретением.

Используемый в данном документе термин "комбинированная терапия", включает введение нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу фактора VIII и традиционных терапевтических агентов для лечения гемофилии А, включает любой терапевтический подход, обеспечивающий как нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу фактора VIII, так и молекулу фактора VIII и/или гемостатический агент, не относящийся к фактору VIII (например, обходной терапевтический агент) пациенту для облегчения, уменьшения или предотвращения повторения одного или нескольких симптомов (например, клинических факторов), связанных с гемофилией. Термин включает проведение процедуры или соблюдение режима, введение любого соединения, лекарственного средства, включая нуклеиновую кислоту, кодирующую молекулу фактора VIII, включая любую модифицированную форму фактора VIII, которая полезна для поддержания или улучшения здоровья человека, больного гемофилией и включая любой из агентов, которые описаны в данном документе.

Термины "терапевтически эффективное количество или доза" или "терапевтически достаточное количество или доза" или "эффективное или достаточное количество, или доза" относятся к дозе, которая дает терапевтические эффекты, для достижения которых она вводится. Например, терапевтически эффективное количество лекарственного средства, полезного для лечения гемофилии, может быть количе-

ством, которое способно предотвращать или облегчать один или несколько симптомов, связанных с гемофилией. Точная доза будет зависеть от цели лечения и будет определена специалистом в данной области с использованием известных методов (см., например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); и Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

Используемый в данном документе термин «ген» относится к сегменту молекулы ДНК, которая кодирует полипептидную цепь (например, кодирующая область). В некоторых вариантах реализации изобретения ген расположен в областях, непосредственно предшествующих, следующих за и/или перекрывающихся с кодирующей областью, которая участвует в получении полипептидной цепи (например, регуляторные элементы, такие как промотор, энхансер, последовательность полиаденилирования, 5'-нетранслируемая область, 3'-нетранслируемая область или инtron).

Используемый в данном документе термин "регуляторные элементы" относится к нуклеотидным последовательностям, таким как промоторы, энхансеры, терминаторы, последовательности полиаденилирования, интроны и т. д., которые обеспечивают экспрессию кодирующей последовательности в клетке.

Используемый в данном документе термин "промоторный элемент" относится к нуклеотидной последовательности, которая помогает контролировать экспрессию кодирующей последовательности. Как правило, промоторные элементы расположены на 5'-конце начального сайта трансляции гена. Однако в некоторых вариантах реализации изобретения промоторный элемент может быть расположен внутри последовательности интрана или 3'-конца кодирующей последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения промотор, полезный для вектора генной терапии, получен из гена нативного белка-мишени (например, промотор фактора VIII). В некоторых вариантах реализации изобретения промотор, полезный для вектора генной терапии, специфичен для экспрессии в конкретной клетке или ткани целевого организма (например, промотор, специфичный для печени). В других вариантах реализации изобретения один из множества хорошо охарактеризованных промоторных элементов используется в векторе генной терапии, описанном в данном документе. Неограничивающие примеры хорошо охарактеризованных промоторных элементов включают ранний промотор CMV, промотор  $\beta$ -актина и промотор метил-CpG-связывающего белка 2 (MeCP2). В некоторых вариантах реализации изобретения промотор представляет собой конститутивный промотор, который обеспечивает по существу постоянную экспрессию белка-мишени. В других вариантах реализации изобретения промотор представляет собой индуцируемый промотор, который стимулирует экспрессию белка-мишени в ответ на конкретный стимул (например, воздействие конкретного лечения или агента). Для обзора получения промоторов для AAV-опосредованной генной терапии см. Gray et al. (*Human Gene Therapy* 22: 1143-53 (2011)), чье содержание явно включено в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей.

Используемый в данном документе термин "вектор" относится к любому носителю, используемому для переноса нуклеиновой кислоты (например, кодирующей конструкцию генной терапии фактора VIII) в клетку-хозяина. В некоторых вариантах реализации изобретения вектор содержит репликон, который функционирует для репликации носителя вместе с нуклеиновой кислотой-мишенью. Неограничивающие примеры векторов, полезных для генной терапии включают плазмиды, фаги, космиды, искусственные хромосомы и вирусы, которые функционируют как автономные единицы репликации *in vivo*. В некоторых вариантах реализации изобретения вектор представляет собой вирусный носитель для введения нуклеиновой кислоты-мишени (например, полинуклеотид с измененными кодонами, кодирующий вариант фактора VIII). Многие модифицированные эукариотические вирусы, полезные для генной терапии, известны в данной области. Например, аденоассоциированные вирусы (AAV) особенно хорошо подходят для использования в генной терапии человека, потому что люди являются естественным хозяином этого вируса, природные вирусы, как известно, не способствуют каким-либо заболеваниям и эти вирусы вызывают незначительный иммунный ответ.

Используемый в данном документе термин "островок CpG" относится к области внутри полинуклеотида, имеющей статистически повышенную плотность CpG-динуклеотидов. Как используется в данном документе, область полинуклеотида (например, полинуклеотида с измененными кодонами, кодирующего белок фактора VIII) представляет собой остров CpG, если среди 200 оснований: (i) область имеет содержание GC более 50%, и (ii) отношение наблюдаемых CpG-динуклеотидов к ожидаемым CpG-динуклеотидам составляет по меньшей мере 0.6, как определено соотношением:

$$\frac{N[CpG] * N[\text{длина участка}]}{N[C] * N[G]} \geq 0.6.$$

Дополнительную информацию о методах идентификации островков CpG см. в Gardiner-Garden M. et al., *J Mol Biol.*, 196 (2): 261-82 (1987), чье содержание прямо включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме, для всех целей.

Используемый в данном документе термин "нуклеиновая кислота" относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме и их комплементарным

молекулам. Этот термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов или модифицированные остатки или связи, которые являются синтетическими, встречающимися в природе и не встречающимися в природе, которые имеют сходные связывающие свойства, как референтная нуклеиновая кислота, и которые метаболизируются способом, подобным референтным нуклеотидам. Примеры таких аналогов включают, но не ограничиваются ими, фосфоротиоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хираль-метилфосфонаты, 2-О-метил-рибонуклеотиды и пептид-нуклеиновые кислоты (ПНК).

Термин "аминокислота" относится к природным и неприродным аминокислотам, включая аминокислотные аналоги и аминокислотные миметики, которые функционируют аналогично природным аминокислотам. Естественно встречающиеся аминокислоты включают те, которые кодируются генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые позднее модифицированы, например, гидроксипролин, укарбоксиглутамат и О-фосфосерин. Естественно встречающиеся аминокислоты могут включать, например, D- и L-аминокислоты. Используемые в данном документе аминокислоты могут также включать неприродные аминокислоты. Аминокислотные аналоги относятся к соединениям, которые имеют ту же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота, то есть любой углерод, связанный с водородом, карбоксильная группа, аминогруппа и группа R, например, гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид или метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные скелеты, но сохраняют ту же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота. Аминокислотные миметики относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, которая отличается от общей химической структуры аминокислоты, но их функция аналогична природной аминокислоте. Аминокислоты могут быть обозначены их общеизвестными трехбуквенными обозначениями, либо однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Нуклеотиды также могут упоминаться их общепринятыми однобуквенными обозначениями.

Что касается аминокислотных последовательностей, специалисту в данной области техники будет понятно, что индивидуальные замены, делеции или вставки в нуклеиновой кислоте или пептидной последовательности, которые изменяют, добавляют или удаляют одну аминокислоту или небольшой процент аминокислот в кодируемой последовательности является "консервативно модифицированным вариантом", где изменение приводит к замещению аминокислоты химически подобной аминокислотой. Таблицы консервативных замещений, представляющие функционально сходные аминокислоты, хорошо известны в данной области. Такие консервативно модифицированные варианты являются дополнением и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели в данном описании.

Консервативные аминокислотные замещения, обеспечивающие функционально сходные аминокислоты, хорошо известны в данной области. В зависимости от функциональности конкретной аминокислоты, например, для катализических, структурных или стерически важных аминокислот, различные группы аминокислот могут рассматриваться как консервативные замены друг для друга. В табл. 1 представлены группы аминокислот, которые считаются консервативными заменами на основе заряда и полярности аминокислоты, гидрофобности аминокислоты, поверхностным воздействием/структурным характеристикам аминокислоты и влиянию аминокислоты на вторичную структуру.

Таблица 1. Группы консервативных аминокислотных замен на основе функциональности остатка в белке

Важная Особенность	Консервативные Группы
Заряд/Полярность	1. H, R и K
	2. D и E 3. C, T, S, G, N, Q и Y 4. A, P, M, L, I, V, F и W
Гидрофобность	1. D, E, N, Q, R и K 2. C, S, T, P, G, H и Y 3. A, M, I, L, V, F и W
Структурное/Поверхностное Расположение	1. D, E, N, Q, H, R и K 2. C, S, T, P, A, G, W и Y 3. M, I, L, V и F
Влияние на Вторичную Структуру	1. A, E, Q, H, K, M, L и R 2. C, T, I, V, F, Y и W 3. S, G, P, D и N
Эволюционное Сохранение	1. D и E 2. H, K и R 3. N и Q 4. S и T 5. L, I и V 6. F, Y и W 7. A и G 8. M и C

Термины "идентичная" или процентная "идентичность" в контексте двух или более нуклеиновых кислот или пептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (например, около 60% идентичности, предпочтительно 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или больше идентичности в определенной области при сравнении и выравнивании для максимального соответствия участка сравнения или выделенной области) при измерении, например, с использованием алгоритмов сравнения последовательностей BLAST или BLAST 2.0 с параметрами по умолчанию, описанными ниже, или путем ручного выравнивания и визуального осмотра.

Как известно в данной области, множество различных программ могут быть использованы для определения идентичности или сходства последовательности белка (или нуклеиновой кислоты, как описано ниже) при сравнении с известной последовательностью. Идентичность последовательности и/или сходство определяются с использованием стандартных методов, известных в данной области, включая, но не ограничиваясь им, алгоритм идентичности локальной последовательности Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482 (1981), by the sequence identity alignment algorithm of Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 (1970), by the search for similarity method of Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2444 (1988), посредством компьютерных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном пакете Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI), программы для последовательностей Best Fit описанной Devereux et al., *Nucl. Acid Res.*, 12: 387-395 (1984), предпочтительно с использованием настроек по умолчанию или путем проверки. Предпочтительно, процентная идентичность вычисляется с помощью FastDB на основе следующих параметров: штраф несоответствия 1; штраф пропуска 1; штраф размера пропуска 0,33; и штраф вставки 30, "Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, pp. 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc, все из которых включены посредством ссылки.

Примером полезного алгоритма является PILEUP. PILEUP создает множество выравнивание последовательностей из группы связанных последовательностей с использованием прогрессивных парных выравниваний. Он также может отображать дерево, показывающее отношения кластеризации, используемые для создания выравнивания. PILEUP использует упрощение прогрессивного метода выравнивания Feng & Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35: 351-360 (1987); метод аналогичен методу, описанному Higgins & Sharp CABIOS 5: 151-153 (1989), оба включены посредством ссылки. Полезные параметры PILEUP включают значение пропуска по умолчанию 3.00, значение длины пропуска по умолчанию 0.10 и взвешенные конечные пропуски.

Другим примером полезного алгоритма является алгоритм BLAST, описанный в: Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215, 403-410, (1990); Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402 (1997); и Karlin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5787 (1993), оба включены посредством ссылки. Особенностью полезной программой BLAST является программа WU-BLAST-2, полученная от Altschul et al., *Methods in Enzymology*, 266:460-480 (1996); <http://blast.wustl.edu/blast/ README.html>. WU-BLAST-2 использует несколько параметров поиска, большинство из которых имеют значения по умолчанию. Регулируемые параметры задаются со следующими значениями: интервал перекрытия=1, доля перекрытия=0,125, порог слова (T)=11. Параметры HSP S и HSP S2 являются динамическими значениями и определяются самой программой в зависимости от состава конкретной последовательности и состава конкретной базы данных, с которой осуществляется поиск последовательности интереса; однако значения могут быть скорректированы для повышения чувствительности.

Дополнительным полезным алгоритмом является gapped BLAST, как сообщается в Altschul et al., *Nucl. Acids Res.*, 25: 3389-3402, включена посредством ссылки. Gapped BLAST использует баллы замещения BLOSUM-62; пороговый параметр T установлен в 9; two-hit метод для запуска расширений без пропусков; оценка длины к пропусков равна 10+k; Xu установлен на 16, а Xg установлен на 40 для этапа поиска базы данных и на 67 для выходного этапа алгоритмов. Выравнивания с разрывами запускаются с помощью оценки, соответствующей ~ 22 бит.

Значения процентной идентичности аминокислотной последовательности определяются количеством совпадающих идентичных остатков, деленными на общее количество остатков "более длинной" последовательности в выровненной области. "Более длинная" последовательность - та, которая имеет больше значимых остатков в выровненной области (пробелы, введенные WU-Blast-2, чтобы максимизировать оценку выравнивания, игнорируются). Аналогичным образом, "процентная идентичность последовательности нуклеиновой кислоты" (%) по отношению к кодирующей последовательности идентифицированных полипептидов определяется как процентное содержание нуклеотидных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны остаткам нуклеотидов в кодирующей последовательности белка клеточного цикла. Предпочтительный метод использует модуль BLASTN для WU-BLAST-2, заданный по умолчанию, с интервалом перекрытия и долей перекрытия, установленным в 1 и 0,125 соответственно.

Выравнивание может включать введение пробелов в последовательностях, которые должны быть выровнены. Кроме того, для последовательностей, которые содержат либо больше или меньше амино-

кислот, чем белок, кодируемый последовательностью, изображенной на фиг. 2 (SEQ ID NO: 1), понятно, что в одном варианте реализации изобретения процент идентичности последовательности будет определяться на основе количества идентичных аминокислот или нуклеотидов по отношению к общему количеству аминокислот или нуклеотидов. Таким образом, например, идентичность последовательностей, которые короче, чем изображенная на фиг. 2 (SEQ ID NO: 1), как обсуждается ниже, будет определяться с использованием количества нуклеотидов в более короткой последовательности в одном варианте реализации изобретения. В подсчетах процентной идентичности относительный вес не присваивается различным проявлениям вариации последовательности, таким как вставки, удаления, замены и т.д.

В одном варианте реализации изобретения только тождества оцениваются положительно (+1), и всем формам изменения последовательности, включая промежутки, присваивается значение "0", что устраняет необходимость в взвешенной шкале или параметрах, как описано ниже для расчетов подобия последовательности. Идентичность последовательности может быть рассчитана, например, путем деления количества совпадающих идентичных остатков на общее количество остатков "более короткой" последовательности в выровненной области и умножения на 100. "Более длинная" последовательность - это та, которая имеет больше остатков в выровненной области.

Термин "аллельные варианты" относится к полиморфным формам гена в определенном генетическом локусе, а также кДНК, полученным из мРНК транскриптов генов, и полипептидов, кодируемых ими. Термин "предпочтительный кодон млекопитающих" относится к подмножеству кодонов из множества кодонов, кодирующих аминокислоту, которые наиболее часто используются в белках, экспрессируемых в клетках млекопитающих, как показано в следующем списке: Gly (GGC, GGG); Glu (GAG); Asp (GAC); Val (GTG, GTC); Ala (GCC, GCT); Ser (AGC, TCC); Lys (AAG); Asn (AAC); Met (ATG); Ile (ATC); Thr (ACC); Trp (TGG); Cys (TGC); Tyr (TAT, TAC); Leu (CTG); Phe (TTC); Arg (CGC, AGG, AGA); Gln (CAG); His (CAC) и Pro (CCC).

Используемый в данном документе термин "измененный кодон" относится к полинуклеотидной последовательности, кодирующй полипептид (например, вариант белка варианта VIII), где по меньшей мере один кодон природного полинуклеотида, кодирующего полипептид, был изменен для улучшения свойства полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения улучшенное свойство способствует увеличению транскрипции мРНК, кодирующй полипептид, повышенной стабильности мРНК (например, увеличению периода полувыведения мРНК), увеличению трансляции полипептида и/или улучшению упаковки полинуклеотида внутри вектора. Неограничивающие примеры изменений, которые могут быть использованы для получения улучшенных свойств, включают в себя изменение использования и/или распределения кодонов для определенных аминокислот, регулирование глобального и/или локального содержания GC, удаление последовательностей, с высоким содержанием AT, удаление повторяющихся элементов последовательности, корректировку глобального и/или локального содержания динуклеотида CpG, удаление критических регулирующих элементов (например, ТАТА-бокс и ССААТ-бокс), удаление сайтов сплайсинга инtron/экзон, улучшение регуляторных последовательностей (например, введение консенсусной последовательности Козака) и удаление элементов последовательности, способных образовывать вторичную структуру (например, шпильки) в транскрибируемой мРНК.

Как обсуждалось в данном документе, существуют различные номенклатуры для обозначения компонентов, описанных в данном документе. "CS-номер" (например, "CS04", "CS01", "CS23" и т.д.) относятся к полинуклеотидам с измененными кодонами, кодирующими полипептиды FVTII и/или кодируемые полипептиды, включая варианты. Например, CS01-FL относится к полинуклеотидной полноразмерной (Full Length) последовательности CS01 с измененными кодонами, или аминокислотной последовательности (иногда называемой в данном документе как "CS01-FL-AA" для аминокислотной последовательности (Amino Acid sequence) и "CS01-FL-NA" для последовательности нуклеиновой кислоты (Nucleic Acid sequence)), кодируемой полинуклеотидной последовательностью CS01. Аналогично, "CS01-LC" относится либо к последовательности нуклеиновой кислотой с измененными кодонами ("CS01-LC-NA"), кодирующей легкую цепь полипептида FVIII, или аминокислотной последовательности (также иногда упоминаемой в данном документе как "CS01-LC-AA") легкой цепи FVIII, кодируемой полинуклеотидной последовательностью CS01. Аналогично, CS01-HC, CS01-HC-AA и CS01-HC-NA одинаковы для тяжелой цепи FVIII. Как будет понятно специалистам в данной области, для конструкций, таких как CS01, CS04, CS23 и т. д., которые модифицированы только лишь за счет измененных кодонов (например, они не содержат дополнительных аминокислотных замен по сравнению с Refacto) аминокислотные последовательности будут идентичными, поскольку аминокислотные последовательности не изменяются при оптимизации кодонов. Таким образом, конструкции последовательности описания включают, но не ограничиваются именем, CS01-FL-NA, CS01-FL-AA, CS01-LC-NA, CS01-LC-AA, CS01-HC-AA, CS01-HC-NA, CS04-FL-NA, CS04-FL-AA, CS04-LC-NA, CS04-LC-AA, CS04-HC-AA, CS04-HC-NA, CS23-FL-NA, CS23-FL-AA, CS23-LC-NA, CS23-LC-AA, CS23-HC-AA и CS23-HC-NA.

Варианты Фактора VIII с Измененными Кодонами В некоторых вариантах реализации изобретения данное описание предлагает полинуклеотиды с измененными кодонами, кодирующие варианты фактора VIII. Эти полинуклеотиды с измененными кодонами обеспечивают значительно улучшенную экспресс-

сию фактора VIII при введении в конструкции генной терапии на основе AAV. Полинуклеотиды с измененными кодонами также демонстрируют улучшенную упаковку AAV-вирононов по сравнению с конструкциями с традиционной оптимизацией кодонов. Как показано в примере 2 и табл. 4, заявители достигают этих преимуществ благодаря открытию трех полинуклеотидов с измененными кодонами (CS01-FL-NA, CS04-FL-NA и CS23-FL-NA), кодирующими полипептид фактора VIII с тяжелой и легкой цепями фактора VIII человека и коротким 14-аминокислотным замещающим В-домен линкером (линкер SQ), содержащий фуриновый сайт расщепления для облегчения созревания активного белка FVIIIa *in vivo*.

В одном варианте реализации изобретения полинуклеотид с измененными кодонами, представленный в данном документе, имеет нуклеотидные последовательности с высокой идентичностью, по меньшей мере, с последовательностями CS01, CS04 или CS23 (SEQ ID NO 13, 1 и 20 соответственно), кодирующими тяжелую цепь фактора VIII и легкие цепи фактора VIII. Как известно в данной области, В-домен фактора VIII является непригодным для активности *in vivo*. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотиды с измененными кодонами, представленные в данном документе, полностью не содержат В-домен фактора VIII. В некоторых вариантах реализации изобретения нативный В-домен фактора VIII заменен на короткий аминокислотный линкер, содержащий фуриновый сайт расщепления, например, линкер SQ, состоящий из аминокислот 760-773 CS01, CS04 или CS23 (SEQ ID NO 2, 2 и 21 соответственно). Линкер "SQ" также относится к последовательности BDLO04 (-AA для аминокислотной последовательности и -NA для нуклеотидной последовательности).

В одном варианте реализации изобретения тяжелая и легкая цепи фактора VIII, кодируемые полинуклеотидом с измененными кодонами, представляют собой тяжелую и легкую цепи фактора VIII человека, соответственно. В других вариантах реализации изобретения тяжелая и легкая цепи фактора VIII, кодируемые полинуклеотидом с измененными кодонами представляют собой последовательности тяжелой и легкой цепей другого млекопитающего (например, фактора VIII свиньи). В других вариантах реализации изобретения тяжелая и легкая цепи фактора VIII представляют собой химерные тяжелую и легкую цепи (например, комбинацию первой человеческой последовательности и второй последовательности млекопитающего). В других вариантах реализации изобретения тяжелая и легкая цепи фактора VIII представляют собой гуманизированную версию тяжелой и легкой цепей другого млекопитающего, например, последовательности тяжелой и легкой цепей другого млекопитающего, в котором остатки последовательности человека замещены в выбранных положениях, чтобы уменьшить иммуногенность получаемого пептида при введении человеку.

Содержание GC в генах человека варьирует в широких пределах: от менее 25 до более 90%. Однако, как правило, человеческие гены с более высоким содержанием GC экспрессируются на более высоких уровнях. Например, в Kudla et al. (PLoS Biol., 4 (6): 80 (2006)) показано, что увеличение содержания GC гена увеличивает экспрессию кодируемого полипептида, в первую очередь за счет усиления транскрипции и достижения более высокого уровня устойчивости транскрипта мРНК. Как правило, желаемое содержание GC в конструкции гена с оптимизацией кодонов равно или превышает 60%. Однако родные геномы AAV имеют содержание GC около 56%.

Соответственно в некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотиды с измененными кодонами, представленные в данном документе, имеют содержание CG, которое более соответствует содержанию GC в нативных AAV-вирононах (например, около 56% GC), которое ниже, чем предпочтительное содержание CG полинуклеотидов, которые обычно проходят оптимизацию кодонов для экспрессии в клетках млекопитающих (например, 60% GC или выше). Как указано в примере 1, CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1), которая имеет содержание GC около 56%, имеет улучшенную упаковку вирононов по сравнению с аналогичными последовательностями с измененными кодонами с более высоким содержанием GC.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет менее 60%. В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет менее 59%. В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет менее 58%. В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет менее 57%. В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет не более 56%.

В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет от 54 до 59%. В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет от 55 до 59%. В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет от 56 до 59%. В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет от 54 до 58%. В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с из-

мененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет от 55 до 58%. В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет от 56 до 58%. В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет от 54 до 57%. В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет от 55 до 57%. В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет от 56 до 57%. В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет от 54 до 56%. В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет от 55 до 56%.

В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет  $56\pm0.5\%$ . В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет  $56\pm0.4\%$ . В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет  $56\pm0.3\%$ . В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет  $56\pm0.2\%$ . В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет  $56\pm0.1\%$ . В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет 56%.

#### **Линкер, замещающий В-домен Фактора VIII**

В некоторых вариантах реализации изобретения связь между тяжелой цепью FVIII и легкой цепью (например, В-доменом в Факторе VIII дикого типа) дополнительно изменяется. Из-за ограничений по размеру упаковочной емкости AAV, варианты с удаленным, усеченным и/или замещенным на линкер В-доменом должны улучшить эффективность конструкции генной терапии FVIII. Наиболее традиционно используемый замещающий В-домен линкер относится к SQ FVIII, который сохраняет только 14 аминокислот домена В в качестве линкерной последовательности. Другой вариант VIII свиньи ("OBI-1", описанный в патенте США № 6,458,563) хорошо экспрессируется в клетках СНО и имеет более длинный линкер из 24 аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения конструкции фактора VIII, кодируемые полинуклеотидами с измененными кодонами, описанные в данном документе, содержат в себе линкерную последовательность типа SQ В-домена. В других вариантах реализации конструкции фактора VIII, кодируемые полинуклеотидами с измененными кодонами, описанные в данном документе, содержат в себе линкерную последовательность типа OBI-1 В-домена.

В некоторых вариантах реализации изобретения кодируемые полипептиды фактора VIII, описанные в данном документе, содержат В-доменный линкер типа SQ (SFSQNPPVLKRHQR; BDL-SQ-AA; SEQ ID NO: 30), включая аминокислоты 760-762/1657-1667 В-домена фактора VIII дикого типа человека (FVIII-FL-AA, SEQ ID NO: 19) (Sandberg et al., Thromb. Haemost. 85:93 (2001)). В некоторых вариантах реализации изобретения В-доменный линкер SQ-типа имеет одну аминокислотную замену относительно соответствующей последовательности дикого типа. В некоторых вариантах реализации изобретения В-доменный линкер SQ-типа имеет две аминокислотные замены относительно соответствующей последовательности дикого типа.

В некоторых вариантах реализации изобретения кодируемые полипептиды фактора VIII, описанные в данном документе, содержат в себе линкер В-домена типа Greengene, включая аминокислоты 760/1582-1667 В-домена фактора VIII дикого типа человека (FVIII-FL-AA, SEQ ID NO: 19) (Oh et al., Biotechnol. Prog., 17:1999 (2001)). В некоторых вариантах реализации изобретения В-доменный линкер Greengene-типа имеет одну аминокислотную замену относительно соответствующей последовательности дикого типа. В некоторых вариантах реализации изобретения В-доменный линкер Greengene-типа имеет две аминокислотные замены относительно соответствующей последовательности дикого типа.

В некоторых вариантах реализации изобретения кодируемые полипептиды фактора VIII, описанные в данном документе, содержат расширенный линкер В-домена SQ-типа, включая аминокислоты 760-769/1657-1667 Фактора VIII дикого типа человека (FVIII-FL-AA, SEQ ID NO: 19) (Thim et al., Haemophilia, 16: 349 (2010)). В некоторых вариантах реализации изобретения удлиненный В-доменный линкер SQ-типа имеет одну аминокислотную замену относительно соответствующей последовательности дикого типа. В некоторых вариантах реализации изобретения удлиненный В-доменный линкер SQ-типа имеет две аминокислотные замены относительно соответствующей последовательности дикого типа.

В некоторых вариантах реализации изобретения кодируемые полипептиды фактора VIII, описанные в данном документе, содержат В-доменный линкер типа OBI-1 свиньи, включая аминокислоты SFA-QNSRPPSASAPKPPVLRRHQR (SEQ ID NO: 31) из В-домена свиного фактора VIII дикого типа (Toschi et

al., *Curr. Opin. Mol. Ther.* 12:517 (2010)). В некоторых вариантах реализации изобретения В-доменный линкер типа OBI-1 свиньи имеет одну аминокислотную замену относительно соответствующей последовательности дикого типа. В некоторых вариантах реализации изобретения В-доменный линкер типа OBI-1 свиньи имеет две аминокислотные замены относительно соответствующей последовательности дикого типа.

В некоторых вариантах реализации изобретения кодируемые полипептиды фактора VIII, описанные в данном документе, содержат В-доменный линкер типа OBI-1 человека, включая аминокислоты 760-772/1655-1667 В-домена фактора VIII дикого типа человека (FVIII-FL-AA, SEQ ID NO: 19). В некоторых вариантах реализации изобретения В-доменный линкер типа OBI-1 человека имеет одну аминокислотную замену относительно соответствующей последовательности дикого типа. В некоторых вариантах реализации изобретения В-доменный линкер типа OBI-1 человека имеет две аминокислотные замены относительно соответствующей последовательности дикого типа.

В некоторых вариантах реализации изобретения кодируемые полипептиды фактора VIII, описанные в данном документе, содержат В-доменный линкер типа O8, включая аминокислоты SFSQNSRHQAYRYRRG (SEQ ID NO: 32) из В-домена фактора VIII дикого типа свиньи (Toschi et al., *Curr. Opin. Mol. Ther.* 12:517 (2010)). В некоторых вариантах реализации изобретения В-доменный линкер типа OBI-1 свиньи имеет одну аминокислотную замену относительно соответствующей последовательности дикого типа. В некоторых вариантах реализации изобретения В-доменный линкер типа OBI-1 свиньи имеет две аминокислотные замены относительно соответствующей последовательности дикого типа.

Удаление В-домена из конструкций фактора VIII, по-видимому, не влияет на активность активированного фермента (например, FVIIIa), по-видимому, потому, что В-домен удаляется во время активации. Однако В-домен фактора VIII содержит несколько остатков, которые посттрансляционно модифицированы, например, путем N- или O-опосредованного гликозилирования. Анализ *in silico* (предсказание сайтов N-гликозилирования в белках человека, R. Gupta, E. Jung and S. Brünak, в подготовке (2004)) В-домена фактора VIII дикого типа, предсказывает, что по меньшей мере четыре из этих сайтов гликозилируются *in vivo*. Считается, что эти модификации внутри В-домена вносят вклад в посттрансляционное регулирование и/или период полураспада фактора VIII *in vivo*.

Хотя В-домен фактора VIII отсутствует в зрелом белке фактора Villa, гликозилирование в В-домене молекулы предшественника фактора VIII может увеличить период полувыведения белка до активации. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер кодируемой конструкции фактора VIII, описанный в данном документе, содержит одну или несколько гликозилируемых последовательностей, чтобы обеспечить гликозилирование *in vivo*. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере одну консенсусную гликозилируемую последовательность (например, консенсусную последовательность с N- или O-опосредованным гликозилированием). В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере две консенсусные гликозилируемые последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере три консенсусные гликозилируемые последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере четыре консенсусные гликозилируемые последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере пять консенсусных гликозилируемых последовательностей. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере 6, 7, 8, 9, 10 или более консенсусных гликозилируемых последовательностей.

В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере одну последовательность для N-опосредованного гликозилирования NXS/T, где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от P, S или T. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере две последовательности для N-опосредованного гликозилирования NXS/T, где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от P, S или T. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере три последовательности для N-опосредованного гликозилирования NXS/T, где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от P, S или T. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере четыре последовательности для N-опосредованного гликозилирования NXS/T, где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от P, S или T. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере пять последовательностей для N-опосредованного гликозилирования NXS/T, где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от P, S или T. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере 6, 7, 8, 9, 10 или более последовательностей для N-опосредованного гликозилирования NXS/T, где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от P, S или T.

Полинуклеотиды с Измененными Кодонами, Кодирующие Вариант Фактора VIII с Расщепляемым Линкером

#### CS04 полинуклеотиды с измененными кодонами

В одном варианте реализации изобретения полинуклеотиды с измененными кодонами, представ-

ленные в данном документе, содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант полипептида фактора VIII, с линкером, который расщепляется *in vivo*. Полипептид фактора VIII содержит легкую цепь фактора VIII, тяжелую цепь фактора VIII и полипептидный линкер, соединяющий C-конец тяжелой цепи с N-концом легкой цепи. Тяжелая цепь полипептида фактора VIII кодируется первой нуклеотидной последовательностью, имеющей высокую идентичность последовательности с CS04-HC-NA (SEQ ID NO: 3), которая представляет собой часть CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1), кодирующей тяжелую цепь фактора VIII. Легкая цепь полипептида фактора VIII кодируется второй нуклеотидной последовательностью с высокой идентичностью последовательности с CS04-LC-NA (SEQ ID NO: 4), которая представляет собой часть CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1) кодирующей легкую цепь фактора VIII. Полипептидный линкер содержит фуриновый сайт расщепления, который позволяет созревать *in vivo* (например, после экспрессии *in vivo* или введения полипептида-предшественника).

В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 95% идентичности последовательности с CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NO 3 и 4) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 96% идентичности последовательности с CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NO 3 и 4) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 97% идентичности последовательности с CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NO 3 и 4) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 98% идентичности последовательности с CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NO 3 и 4) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 99% идентичности последовательности с CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NO 3 и 4) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 99.5% идентичности последовательности с CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NO 3 и 4) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 99.9% идентичности последовательности с CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NO 3 и 4) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности идентичны CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NOS 3 и 4) соответственно.

В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер конструкции фактора VIII кодируется третьей нуклеотидной последовательностью, имеющей высокую идентичность последовательности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6), которая кодирует 14-аминокислотный линкер, соответствующий аминокислотам 760-773 CS04 -FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 95% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 96% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность идентична BDLO04 (SEQ ID NO: 6).

В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид с измененными кодонами имеет нуклеотидную последовательность с высокой идентичностью последовательности с CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 95% идентичности с CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 96% идентичности с CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность идентична CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1).

В некоторых вариантах реализации изобретения вариант фактора VIII, кодируемый полинуклеотидом с измененными кодонами, имеет аминокислотную последовательность с высокой идентичностью с CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В

некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность идентична CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2).

#### CS01 полинуклеотиды с измененными кодонами

В одном варианте реализации изобретения полинуклеотиды с измененными кодонами, представленные в данном документе, содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант полипептида фактора VIII, с линкером, который расщепляется *in vivo*. Полипептид фактора VIII содержит легкую цепь фактора VIII, тяжелую цепь фактора VIII и полипептидный линкер, соединяющий С-конец тяжелой цепи с N-концом легкой цепи. Тяжелая цепь полипептида фактора VIII кодируется первой нуклеотидной последовательностью, имеющей высокую идентичность последовательности с CS01-HC-NA (SEQ ID NO: 24), которая представляет собой часть CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13), кодирующую тяжелую цепь фактора VIII. Легкая цепь полипептида фактора VIII кодируется второй нуклеотидной последовательностью с высокой идентичностью последовательности с CS01-LC-NA (SEQ ID NO: 25), которая представляет собой часть CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13) кодирующей легкую цепь фактора VIII. Полипептидный линкер содержит фуриновый сайт расщепления, который позволяет созревать *in vivo* (например, после экспрессии *in vivo* или введения полипептида-предшественника).

В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 95% идентичности последовательности с CS01-HC-NA и CS01-LC-NA (SEQ ID NO 24 и 25) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 96% идентичности последовательности с CS01-HC-NA и CS01-LC-NA (SEQ ID NO 24 и 25) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 97% идентичности последовательности с CS01-HC-NA и CS01-LC-NA (SEQ ID NO 24 и 25) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 98% идентичности последовательности с CS01-HC-NA и CS01-LC-NA (SEQ ID NO 24 и 25) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 99% идентичности последовательности с CS01-HC-NA и CS01-LC-NA (SEQ ID NO 24 и 25) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 99.5% идентичности последовательности с CS01-HC-NA и CS01-LC-NA (SEQ ID NO 24 и 25) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 99.9% идентичности последовательности с CS01-HC-NA и CS01-LC-NA (SEQ ID NO 24 и 25) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности идентичны CS01-HC-NA и CS01-LC-NA (SEQ ID NO: 24 и 25) соответственно.

В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер конструкции фактора VIII кодируется третьей нуклеотидной последовательностью, имеющей высокую идентичность последовательности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6), которая кодирует 14-аминокислотный линкер, соответствующий аминокислотам 760-773 CS01-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 95% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 96% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность идентична BDLO04 (SEQ ID NO: 6).

В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид с измененными кодонами имеет нуклеотидную последовательность с высокой идентичностью последовательности с CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 95% идентичности с CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 96% идентичности с CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность идентична CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13).

В некоторых вариантах реализации изобретения вариант фактора VIII, кодируемый полинуклеотидом с измененными кодонами, имеет аминокислотную последовательность с высокой идентичностью с CS01-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS01-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS01-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS01-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS01-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS01-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность идентична CS01-FL-AA (SEQ ID NO: 2).

#### CS23 полинуклеотиды с измененными кодонами

В одном варианте реализации изобретения полинуклеотиды с измененными кодонами, представленные в данном документе, содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант полипептида фактора VIII, с линкером, который расщепляется *in vivo*. Полипептид фактора VIII содержит легкую цепь фактора VIII, тяжелую цепь фактора VIII и полипептидный линкер, соединяющий С-конец тяжелой цепи с N-концом легкой цепи. Тяжелая цепь полипептида фактора VIII кодируется первой нуклеотидной последовательностью, имеющей высокую идентичность последовательности с CS23-HC-NA (SEQ ID NO: 22), которая представляет собой часть CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20), кодирующую тяжелую цепь фактора VIII. Легкая цепь полипептида фактора VIII кодируется второй нуклеотидной последовательностью с высокой идентичностью последовательности с CS23-LC-NA (SEQ ID NO: 23), которая представляет собой часть CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20) кодирующей легкую цепь фактора VIII. Полипептидный линкер содержит фуриновый сайт расщепления, который позволяет созревать *in vivo* (например, после экспрессии *in vivo* или введения полипептида-предшественника).

В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 95% идентичности последовательности с CS23-HC-NA и CS23-LC-NA (SEQ ID NO 22 и 23) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 96% идентичности последовательности с CS23-HC-NA и CS23-LC-NA (SEQ ID NO 22 и 23) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 97% идентичности последовательности с CS23-HC-NA и CS23-LC-NA (SEQ ID NO 22 и 23) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 98% идентичности последовательности с CS23-HC-NA и CS23-LC-NA (SEQ ID NO 22 и 23) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 99% идентичности последовательности с CS23-HC-NA и CS23-LC-NA (SEQ ID NO 22 и 23) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 99.5% идентичности последовательности с CS23-HC-NA и CS23-LC-NA (SEQ ID NO 22 и 23) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 99.9% идентичности последовательности с CS23-HC-NA и CS23-LC-NA (SEQ ID NO 22 и 23) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности идентичны CS23-HC-NA и CS23-LC-NA (SEQ ID NO: 22 и 23) соответственно.

В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер конструкции фактора VIII кодируется третьей нуклеотидной последовательностью, имеющей высокую идентичность последовательности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6), которая кодирует 14-аминокислотный линкер, соответствующий аминокислотам 760-773 CS23-FL-AA (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 95% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 96% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность идентична BDLO04 (SEQ ID NO: 6).

В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид с измененными кодонами имеет нуклеотидную последовательность с высокой идентичностью последовательности с CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 95% идентичности с CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 96% идентичности с CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с

CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность идентична CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20).

В некоторых вариантах реализации изобретения вариант фактора VIII, кодируемый полинуклеотидом с измененными кодонами, имеет аминокислотную последовательность с высокой идентичностью с CS23-FL-AA (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS23-FL-AA (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS23-FL-AA (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS23-FL-AA (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS23-FL-AA (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS23-FL-AA (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность идентична CS23-FL-AA (SEQ ID NO: 21).

#### **Полинуклеотиды с измененными кодонами, кодирующие одноцепочечный белок Фактора VIII**

Конструкции фактора VIII, в которых фуриновый сайт расщепления, расположенный на С-конце В-домена удален, сохраняют активность в виде одноцепочечного полипептида, несмотря на то, что нормальное созревание молекулы фактора VIII не может происходить (Leyte et al. (1991)). Аналогично, конструкция Фактора VIII с отсутствующим В-доменом с аттенуированным фуриновым сайтом (содержащим аминокислотную замену R1664H) более биологически активна, чем соответствующая конструкция фактора VIII с фуриновым сайтом расщепления дикого типа (Siner et al. (2013)). Соответственно, в некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотиды с измененными кодонами, представленные в данном документе, содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую одноцепочечный вариант полипептида фактора VIII. Одноцепочечный полипептид фактора VIII содержит легкую цепь фактора VIII, тяжелую цепь фактора VIII и полипептидный линкер, соединяющий С-конец тяжелой цепи с N-концом легкой цепи. Полипептидный линкер не содержит фуриновый сайт расщепления.

CS04 одноцепочечные полинуклеотиды с измененными кодонами в одном варианте реализации изобретения полинуклеотиды с измененными кодонами, представленные в данном документе, содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую одноцепочечный вариант полипептида фактора VIII. Полипептид фактора VIII содержит легкую цепь фактора VIII, тяжелую цепь фактора VIII и, неизбежно, полипептидный линкер, соединяющий С-конец тяжелой цепи с N-концом легкой цепи. Тяжелая цепь полипептида фактора VIII кодируется первой нуклеотидной последовательностью, имеющей высокую идентичность последовательности с CS04-HC-NA (SEQ ID NO: 3), которая представляет собой часть CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1), кодирующей тяжелую цепь фактора VIII. Легкая цепь полипептида фактора VIII кодируется второй нуклеотидной последовательностью с высокой идентичностью последовательности с CS04-LC-NA (SEQ ID NO: 4), которая представляет собой часть CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1) кодирующей легкую цепь фактора VIII. Неизбежный полипептидный линкер не содержит фуриновый сайт расщепления.

В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 95% идентичности последовательности с CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NO 3 и 4) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 96% идентичности последовательности с CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NO 3 и 4) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 97% идентичности последовательности с CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NO 3 и 4) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 98% идентичности последовательности с CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NO 3 и 4) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 99% идентичности последовательности с CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NO 3 и 4) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 99.5% идентичности последовательности с CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NO 3 и 4) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 99.9% идентичности последовательности с CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NO 3 и 4) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности идентичны CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NOS 3 и 4) соответственно.









миды, фазмиды, искусственные хромосомы и тому подобное.

Неограничивающие примеры вирусных векторов включают ретровирус, например вирус мышиной лейкемии Молони (MMLV), вирус мышиной саркомы Харви, вирус мышиной опухоли молочной железы и вирус саркомы Роуса; аденоавирусы, аденоассоциированные вирусы; вирусы типа SV40; полиомавирусы; вирусы Эпштейна-Барра; вирусы папилломы; вирусы герпеса; вирусы осповакцины; и вирусы полиомиелита.

В некоторых вариантах реализации изобретения описанные в данном документе полинуклеотиды с измененными кодонами интегрированы в векторы генной терапии. В некоторых вариантах реализации изобретения вектор генной терапии является ретровирусом и, в частности, ретровирусом с дефективной репликацией. Протоколы для производства ретровирусов с дефицитной репликацией известны в данной области техники. Для обзора см. Kriegler, M., Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, W.H. Freeman Co., New York (1990) and Mulyu, E. J., Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J. (1991).

В одном варианте реализации изобретения вектор генной терапии представляет собой вектор генной терапии, основанный на аденоассоциированном вирусе (AAV). AAV-системы были описаны ранее и, как правило, хорошо известны в данной области (Kelleher and Vos, *Biotechniques*, 17 (6):1110-17 (1994); Cotten et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 89 (13): 6094-98 (1992); Curiel, *Nat Immun*, 13(2-3):141-64 (1994); Muzyczka, *Curr Top Microbiol Immunol*, 158:97-129 (1992); и Asokan A, et al., *Mol. Ther.*, 20(4): 699-708 (2012), которые включены в данное описание посредством ссылки во всей полноте для всех целей). Подробная информация о генерации и использовании векторов гAAV описана, например, в патентах США № 5139941 и 4797368, каждый из которых включен в данное описание посредством ссылки во всей их полноте для всех целей. В конкретном варианте реализации изобретения вектор AAV представляет собой вектор AAV-8.

В некоторых вариантах реализации изобретения описанные в данном документе полинуклеотиды с измененными кодонами, интегрированы в ретровирусный вектор экспрессии. Эти системы были описаны ранее и, как правило, хорошо известны в данной области (Mann et al., *Cell*, 33:153-159, 1983; Nicolas and Rubinstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988; Temin, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati (ed.), New York: Plenum Press, pp. 149-188, 1986). В конкретном варианте реализации изобретения ретровирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор (см., Например, Naldini et al., *Science*, 272 (5259): 263-267, 1996; Zufferey et al. *Nat Biotechnol*, 15(9):871-875, 1997; Blomer et al., *J Virol.*, 71 (9): 6641-6649, 1997; патенты США № 6013516 и 5994136).

Широкое разнообразие векторов может быть использовано для экспрессии полипептида фактора VIII из полипептида с измененными кодонами в культуре клеток, включая эукариотические и прокариотические экспрессионные векторы. В некоторых вариантах реализации изобретения предполагается, что плазмидный вектор используется для экспрессии полипептида фактора VIII в культуре клеток. В общем, плазмидные векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, которые получены от видов, совместимых с клеткой-хозяином, используются в связи с этими хозяевами. Вектор может содержать сайт репликации, а также маркирующие последовательности, которые способны обеспечивать фенотипический отбор в трансформированных клетках. Плазмида будет содержать полинуклеотид с измененными кодонами, кодирующий полипептид фактора VIII, функционально связанный с одной или несколькими контрольными последовательностями, например промотором.

Неограничивающие примеры векторов для прокариотической экспрессии включают плазмиды, такие как pRSET, pET, pBAD и т.д., где промоторы, используемые в прокариотических экспрессионных векторах, содержат lac, trc, trp, recA, araBAD и т.д. Примеры векторов для эукариотической экспрессии включают: (i) для экспрессии в дрожжах векторы, такие как pAO, pPIC, pYES, pMET, с использованием промоторов, таких как AOX1, GAP, GAL1, AUG1 и т.д.; (ii) для экспрессии в клетках насекомых векторы, такие как pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC и т. д., с использованием промоторов, таких как PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh и т.д. и (iii) для экспрессии в клетках млекопитающих векторы, такие как pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, pBPV и т. д., и векторы, полученные из вирусных систем, таких как вирус осповакцины, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса, ретровирусы и т.д., с использованием промоторов таких как CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV и β-актин.

### Примеры

Пример 1. Конструирование экспрессионной последовательности с измененными кодонами варианта Фактора VIII

Необходимо было преодолеть два препятствия, чтобы создать кодирующую последовательность фактора VIII, которая эффективна для генной терапии гемофилии А. Во-первых, из-за ограничений размера генома обычных векторов доставки генной терапии (например, AAV-вирионов) полипептид, кодирующий фактор VIII, должен быть значительно укорочен. Во-вторых, кодирующую последовательность необходимо было изменить, чтобы: (i) стабилизировать взаимодействия при упаковке внутри вектора доставки, (ii) стабилизировать промежуточную мРНК и (iii) улучшить стабильность транскрипции/трансляции мРНК.

Для достижения первой цели Заявители начали с конструкции варианта фактора VIII с удаленным В-доменом, называемой в данном документе "FVIII-BDD-SQ". В этой конструкции В-домен заменяется последовательностью из 14 аминокислот, называемой последовательностью "SQ". Рекомбинантный FVIII-BDD-SQ продается под торговым названием REFACTO® и, как было показано, эффективен для лечения гемофилии А. Однако нативная кодирующая последовательность для FVIII-BDD-SQ, которая содержит нуклеотидную последовательность дикого типа человека для тяжелой и легкой цепей фактора VIII, неэффективно экспрессируется в векторах генной терапии.

Чтобы усилить слабую экспрессию нативного FVIII-BDD-SQ, алгоритм оптимизации кодонов, описанный в Faith et al. (PLoS ONE, 6:e17596 (2011)), модифицированный, как описано в Ward et al. (Blood, 117:798 (2011)) и в McIntosh et al. (Blood, 121, 3335-3344 (2013)) применяли к последовательности FVIII-BDD-SQ для создания первой промежуточной кодирующей последовательности CS04a. Однако Заявители признали, что последовательность CS04a, созданная с использованием модифицированного алгоритма, может быть улучшена путем дальнейшей модификации последовательности. Соответственно Заявители повторно вводили CpG-динуклеотиды, повторно вводили кодон CGC для аргинина, меняли распределения лейцинового и серинового кодона, повторно вводили высококонсервативные пары кодонов и удаляли скрытый блок TATA, блок ССААТ и элементы сайта сплайсинга, избегая при этом CpG-островков и локального преобладания AT и GC-богатых участков.

Во-первых, модифицированный алгоритм систематически заменяет кодоны, содержащие CpG-динуклеотиды (например, аргининовые кодоны) на не-CpG динуклеотидные кодоны, и исключает/избегает CpG-динуклеотидов, формируемых соседними кодонами. Это строгое избегание CpG-динуклеотидов обычно делается для предотвращения индуцированного TLR иммунитета после внутримышечной инъекции ДНК-вакцин. Однако это ограничивает возможности оптимизации кодонов. Например, модифицированный алгоритм исключает использование полного набора кодонов CGX аргинина. Это особенно разрушительно в кодировании генов для экспрессии в клетках человека, поскольку CGC является наиболее часто используемым аргининовым кодоном в высоко экспрессируемых генах человека. Кроме того, предотвращение создания CpGs соседними кодонами дополнительно ограничивает возможности оптимизации (например, ограничивает количество пар кодонов, которые могут использоваться вместе).

Поскольку не ожидается, что индуцированный TLR иммунитет будет проблемой, связанной с печеночной генной терапией на основе AAV, кодоны, содержащие CpG, и соседние кодоны, формирующие CpG, были повторно введены в промежуточную кодирующую последовательность CS04a, предпочтительно в последовательности, кодирующей легкую цепь фактора VIII (например, на 3'-конце кодирующей последовательности FVIII-BDD-SQ). Это позволило применять более частое использование предпочтительных кодонов человека, особенно для аргинина. Однако была предпринята осторожность, чтобы избежать создания островков CpG, которые являются областями кодирующей последовательности, имеющими высокую частоту CpG-сайтов. Это противоречит учениям Krinner et al. (Nucleic Acids Res., 42 (6): 3551-64 (2014)), где предполагается, что домены CpG ниже сайтов начала транскрипции способствуют высоким уровням экспрессии генов.

Во-вторых, модифицированный алгоритм применяет исключительно кодоны, такие как CTG для лейцина, GTG для валина и CAG для глутамина. Однако это нарушает принципы сбалансированного использования кодонов, например, как предложено в Haas et al. (Current Biology, 6(3):315-24 (1996)). Для учета чрезмерного использования предпочтительных кодонов с помощью модифицированного алгоритма, альтернативные кодоны лейцина были повторно введены, если это позволялось другими правилами, применяемыми к изменению кодона (например, частота CpG и содержание GC).

В-третьих, модифицированный алгоритм заменяет пары кодонов независимо от того, насколько они консервативны, когда выполняются определенные условия (например, наличие CG-динуклеотидов). Для учета полезных свойств, которые могли быть сохранены путем эволюции, наиболее консервативные пары кодонов, которые были заменены алгоритмом и наиболее консервативные предпочтительные пары кодонов, например, как описано в Tats et al. (BMC Genomics 9:463 (2008)), были проанализированы и скорректированы там, где это позволялось другими правилами, применяемыми к изменению кодонов (например, частота CpG и содержание GC).

В-четвертых, сериновые кодоны, используемые в промежуточной кодирующей последовательности, также были повторно модифицированы. В частности, сериновые кодоны AGC, TCC и TCT были введены в модифицированную кодирующую последовательность с более высокой частотой, чтобы лучше соответствовать природному распределению кодонов человека (Haas et al., *supra*).

В-пятых, элементы TATA-бокса, ССААТ-бокса и сайты сплайсинга инtron/экзон были выявлены и удалены из модифицированной кодирующей последовательности. При модификации кодирующей последовательности была предпринята осторожность, чтобы избежать локального избыточного увеличения встречаемости AT- или GC-насыщенных участков.

Наконец, помимо оптимизации использования кодонов в кодирующей последовательности структурные требования для AAV-вириона были рассмотрены при дальнейшей модификации промежуточной кодирующей последовательности CS04a. AAV-векторы (например, часть нукleinовой кислоты AAV-

вириона) упаковываются в виде одноцепочечных молекул ДНК в их капсиды (для обзора см. Daya and Berns, Clin. Microbiol Rev., 21(4): 583-93 (2008)). Следовательно, содержание GC в векторе, вероятно, будет влиять на упаковку генома и, следовательно, на выход вектора во время продукции. Как и многие алгоритмы, модифицированный алгоритм, используемый в данном документе, создает оптимизированную последовательность генов с содержанием GC не менее 60% (см. Fath et al., PLoS One, 6 (3): e17596 (2011) (erratum in: PLoS One, (6) 3 (2011))). Однако капсидный белок AAV8 кодируется нуклеотидной последовательностью, имеющей более низкое содержание GC около 56%. Таким образом, чтобы лучше имитировать природную кодирующую последовательность белка капсидного AAV8, содержание GC в промежуточной кодирующей последовательности CS04a было снижено до 56%.

Полученная CS04 кодирующая последовательность, изображенная на фиг. 2, имеет общее содержание GC равное 56%.

Содержание CpG-динуклеотида в последовательности является умеренным. Однако CpG-динуклеотиды преимущественно присутствуют в нижерасположенной части кодирующей последовательности, например, части, кодирующей легкую цепь фактора VIII. Последовательность CS04 имеет идентичность нуклеотидной последовательности 79,77% с соответствующими кодирующими последовательностями фактора VIII дикого типа (номер доступа Genbank M14113).

Для сравнения были подготовлены несколько других конструкций ReFacto с оптимизированными кодонами. CS01 был сконструирован путем применения алгоритма оптимизации кодонов Fath et al., модифицированного согласно Ward et al., как это сделано для CS04. Однако, в отличие от CS04, конструкция CS01 не содержит никаких островков CpG. Конструкция CS08 ReFacto была подвергнута оптимизации кодонов, как описано в Radcliff P.M. et al., Gene Therapy, 15: 289-97 (2008), чье содержание полностью включено в данное описание посредством ссылки в полном объеме для всех целей. Конструкцию ReFacto с оптимизированными кодонами, основанную на кодонах CS10, была получена от Eurofins Genomics (Эберсберг, Германия). Конструкция CS11 ReFacto с оптимизированными кодонами, была получена от Integrated DNA Technologies, Inc. (Коралвилль, США). Конструкция CH25 ReFacto с оптимизированными кодонами, была получена от ThermoFischer Scientific's GeneArt services (Регенсбург, Германия). Конструкция CS40 ReFacto состоит из кодирующей последовательности фактора VIII дикого типа. Алгоритм, используемый для построения CS23, основан на JCAT tool ([www.jcat.de](http://www.jcat.de)), онлайн инструмент для оптимизации кодонов (Grote et al. , 2005; Nucl. Acids Res. W526-31). Последовательность была дополнительно модифицирована, чтобы больше соответствовать использованию кодонов надсемейства альбумина (Mirsafian et al., 2014: Sc. Word Journal 2014, ID 639682). Идентификаторы последовательностей, общие для каждой из кодирующих последовательностей ReFacto, показаны в табл. 2 ниже.

Таблица 2. Процентная матрица идентичности для конструкций фактора VIII с измененными кодонами

	cs01	cs04	cs08	cs10	cs11	cs40	ch25	cs23
cs01	100%							
cs04	93.0%	100%						
cs08	80.7%	82.2%	100%					
cs10	79.1%	79.4%	78.4%	100%				
cs11	78.3%	78.3%	78.1%	77.5%	100%			
cs40	79.6%	79.8%	76.7%	77.6%	75.4%	100%		
ch25	81.3%	85.1%	85.0%	79.9%	79.4%	75.8%	100%	
cs23	84.3%	89.2%	85.1%	80.3%	79.9	76.5%	93.2%	100%

Плазмиды каждой конструкции были сконструированы путем клонирования различных синтетических фрагментов ДНК в одну и ту же векторную основную плазмиду (pCh-BB01). Синтез ДНК фрагментов BDD-FVIII Refacto-типа с flankирующими сайтами рестрикции ферментов AscI и NotI были выполнены с помощью ThermoFischer Scientific (Регенсбург, Германия). Основа вектора содержит два flankирующих инвертированных концевых повторов AAV2 (ITR), которые содержат последовательность промотора/энхансера, полученную из мышного транстиретина печени, сайты рестрикции фермента AscI и NotI для вставки соответствующего BDD-FVIII типа Refacto и синтетический полиA-сайт. После лигирования подготовленной векторной основы и вставок с помощью сайтов AscI и NotI полученные плазмиды амплифицировали в миллиграммном масштабе. Последовательности конструкций BDD-FVIII типа Refacto были подтверждены прямым секвенированием (Microsynth, Balgach, Switzerland). Клонирование приводило к созданию семи различных плазмидных конструкций с именем pCS40, pCS01, pCS04, pCS08, pCS10, pCS11, pCh25 и pCS23 (фиг. 19). Конструкции имеют одинаковую векторную основу и кодируют один и тот же белок FVIII с отсутствующим В-доменом (Refacto-тип BDD-FVIII), но отличаются по своей кодирующей последовательности FVIII.

Векторы AAV8 были получены с помощью трех способов трансфекции плазмидами, как описано в Grieger JC, et al. (Virus Vectors Using Suspension HEK293 Cells and Continuous Harvest of Vector From the

Culture Media for GMP FIX and FLT1 Clinical Vector, Mol Ther., Oct 6. (2015) doi: 10.1038/mt.2015.187. [Ерив перед печатью]), чье содержание полностью включено в данное описание посредством ссылки в полном объеме для всех целей. Суспензированные клетки HEK293 использовали для трансфекции плазмидами с использованием соответствующей векторной плазмиды FVIII, хелперной плазмиды pXX6-80 (несущей аденоовирусные хелперные гены) и упаковочной плазмиды pGSK2/8 (вносящей гены геп2 и сар8). Чтобы изолировать конструкции AAV8, клеточный осадок из одного литра культуры обрабатывали с использованием градиентов йодиксанола, как описано в Grieger et al. (2015, Supra). Процедура привела к получению векторных препаратов, называемых vCS01, vCS04, vCS08, vCS10, vCS11 и vCH25. Векторы были количественно оценены с помощью qPCR, используя универсальную процедуру qPCR, с использованием инвертированных концевых повторов AAV2 (Aurnhammer, Human Gene Therapy Methods: Part B 23:18-28 (2012)). Контрольная векторная плазмиды, несущая инвертированные концевые повторы AAV2, использовалась для получения стандартной кривой. Результирующая конструкция VCS04 представлена как SEQ ID NO: 8 на фиг. 7A-7C.

Целостность векторных геномов анализировали с помощью электрофореза AAV в агарозном геле. Электрофорез проводили, как описано в Fagone et al., Human Gene Therapy Methods 23:1-7 (2012). Вкратце, препараты AAV-вектора инкубировали при температуре 75°C в течение 10 мин в присутствии 0,5% SDS и затем охлаждали до комнатной температуры. Приблизительно 1.5E10 векторных геномов (vg) загружали на дорожку 1% 1×TAE агарозного геля и подвергали электрофорезу в течение 60 мин при напряженности электрического поля 7 В/см длины геля. Затем гель окрашивали с помощью раствора 2× GelRed (Biotium Cat # 41003) и визуализировали с помощью ChemiDocTMMP (Biorad). Результаты, изображенные на фиг. 20, показывают, что вирусные векторы vCS01, vCS04 и vCS40 имеют геном одинакового размера, обозначенный отдельной полосой в диапазоне 5 кб (фиг. 20, дорожки 2-4). Несмотря на размер вектора около 5,2 кб, геном проявляется в виде однородной полоски, подтверждающей правильную упаковку генома несколько завышенного размера (относительно AAV генома дикого типа 4,7 т.п.н.). Все остальные векторы vCS демонстрируют тот же геномный размер (данные не показаны).

Чтобы подтвердить ожидаемый паттерн капсидных белков, SDS PAGE с последующим окрашиванием серебром проводили с векторами vCS01, vCS04 и vCS40 (фиг. 21). Как показано на фигуре, дальнейшая процедура очистки привела к получению высокоочищенного препарата, демонстрирующего ожидаемый паттерн белков VP1, VP2 и VP3 (фиг. 21, дорожки 2-4). Тот же паттерн был получен для всех других вирусных препаратов (не показаны). Процедура SDS-PAGE препаратов AAV проводилась в соответствии со стандартными протоколами. Каждая дорожка содержала 1E10 vg соответствующей вирусной конструкции и разделялась на 4-12% геле Bis-Tris (NuPAGE® Novex, Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя. Окрашивание серебром выполнялось с помощью набора SilverQuest™ (Novex, Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя.

Удивительно, но AAV-векторы vCS01 и vCS04 имели более плотную упаковку вирионов, измеряемую более высокими выходами при производстве вируса AAV по сравнению с кодирующей конструкцией дикого типа VCS40 и другими конструкциями с оптимизированными кодонами. Как показано в табл. 3, векторы vCS01 и vCS04 реплицируются значительно лучше, чем VCS40, что обеспечивает увеличение выхода AAV в 5-7 раз.

Таблица 3. Выход на 1 л клеточной культуры, полученной с помощью векторных конструкций AAV vCS01, vCS04 и vCD40 при очищении от клеточного осадка

Конструкция	Векторная концентрация [vg/мл] x10E12	Выход [vg/л] x10E12	Кратность увеличения относительно wt
vCS40	2.0	11.0	-
vCS01	9.2	51.4	4.7
vCS04 – Образец 1	17.6	79.2	7.2
vCS04 – Образец 2	15.9	58.8	5.4

Пример 2. Экспрессия *in vivo* вариантов экспрессирующих последовательностей фактора VIII с измененными кодонами

Для проверки биологической активности вариантов последовательностей фактора VIII с измененными кодонами, конструкции FVIII типа ReFacto, описанные в примере 1, вводили мышам, не имеющим фактора VIII. Вкратце, анализы проводили с использованием нокаутных по C57B1/6 FVIII мышей (на) (6-8 животных на группу) путем инъекции в хвостовую вену 4E12 векторных геномов (vg) на килограмм массы тела мыши. Кровь отбирали через 14 дней после инъекции путем ретроорбитальной пункции, плазму готовили и замораживали, используя стандартные процедуры. Уровни экспрессии измеряли на 14-й день из-за минимального влияния ингибирующих антител в это время, которое наблюдаются у некоторых животных этой мышевой модели в более поздние сроки. Активность FVIII в мышевой плазме

определяли с использованием анализа Technochrome FVIII с незначительными модификациями, как это было предложено производителем (Technoclone, Вена, Австрия). Для анализа образцы плазмы соответствующим образом разбавляли и смешивали с аналитическими реагентами, содержащими тромбин, активированный фактор IX (FIXa), фосфолипиды, фактор X и кальций. После активации FVIII тромбином образуется комплекс с FIXa, фосфолипидами и кальцием. Этот комплекс активирует FX, приводя к образованию активного FX (FXa), который, в свою очередь, отщепляет пара-нитроанилид (pNA) от хромогенного субстрата. Кинетику образования pNA измеряют при 405 нм. Скорость прямо пропорциональна концентрации FVIII в образце. Концентрации FVIII считаются с контрольной кривой, и результаты приведены в виде IU FVIII/миллилитр.

Результаты, представленные в табл. 4 ниже, демонстрируют, что последовательности с измененными кодонами, разработанные с использованием коммерческих алгоритмов (CS10, CS11 и CH25), обеспечили лишь небольшое увеличение BDD-фактора VIII (в 3-4 раза) по сравнению с конструкцией BDD-фактора VIII дикого типа (CS40). Аналогично, конструкция BDD-фактора VIII с измененными кодонами, полученная, как описано в Radcliffe et al. (CS08) обеспечила лишь 3-4-кратное увеличение экспрессии BDD-FVIII. Этот результат согласуется с результатами, полученными в Radcliffe et al. Удивительно, что конструкции CS01, CS04 и CS23 обеспечивали значительно более высокую экспрессию BDD-FVIII в исследованиях активности *in vivo* (соответственно в 18, 74 и 30 раз).

Таблица 4. Экспрессия FVIII в плазме нокаутных по FVIII мышей, индуцированная различными векторными конструкциями AAV

Конструкция	Кодоновый Алгоритм	Средний Уровень Экспрессии FVIII на 14 день [IU/мл]	Стандартное отклонение	Количество мышей	Кратность увеличения относительно wt
vcs40	Человек, дикий тип	0.03	0.03	12	-
vcs01	Способ Заявителей	0.55	0.28	22	18.3
vcs04	Способ Заявителей	2.21	1.20	55	73.7
vcs08	Radcliffe et al.	0.11	0.01	6	3.6
vcs10	Eurofins	0.09	0.01	7	3.0
vcs11	IDT	0.08	0.02	8	2.7
vch25	GeneArt	0.13	0.12	18	4.3
vcs23	Способ Заявителей	0.91	0.32	5	30.3

Понятно, что примеры и варианты реализации изобретения, описанные в данном документе, предназначены только для иллюстративных целей и что различные модификации или изменения в свете этого будут предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в объем применения данной заявки и объем прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, патенты и патентные заявки, приведенные в данном документе, включены посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 1, причем полинуклеотид кодирует полипептид фактора VIII.

2. Полинуклеотид по п.1, отличающийся тем, что нуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 1.

3. Полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фактора VIII, указанный полипептид фактора VIII, содержащий легкую цепь, тяжелую цепь и полипептидный линкер, соединяющий С-конец тяжелой цепи с N-концом легкой цепи,

причем тяжелая цепь полипептида фактора VIII кодируется первой нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 99% идентичность с SEQ ID NO: 3;

причем легкая цепь полипептида фактора FVIII кодируется второй нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 4; а также

где полипептидный линкер содержит фуриновый сайт расщепления.

4. Полинуклеотид по п.3, отличающийся тем, что полипептидный линкер кодируется третьей нук-

леотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 6.

5. Полинуклеотид по п.3 или 4, отличающийся тем, что первая нуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 3 и вторая нуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 4.

6. Полинуклеотид по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что полинуклеотид кодирует полипептид фактора VIII, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

7. Полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фактора VIII, причем полипептид фактора VIII содержит легкую цепь, тяжелую цепь и полипептидный линкер, соединяющий С-конец тяжелой цепи с N-концом легкой цепи, причем тяжелая цепь полипептида фактора VIII кодируется первой нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 3.

8. Полинуклеотид по п.7, в котором тяжелая цепь полипептида фактора VIII кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 3.

9. Полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фактора VIII, причем полипептид фактора VIII содержит легкую цепь, тяжелую цепь и полипептидный линкер, соединяющий С-конец тяжелой цепи с N-концом легкой цепи, причем легкая цепь полипептида фактора VIII кодируется первой нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 4.

10. Полинуклеотид по п.9, в котором легкая цепь полипептида фактора VIII кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 4.

11. Полинуклеотид по любому из пп.7-10, отличающийся тем, что полинуклеотид кодирует полипептид фактора VIII, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

12. Полинуклеотид по любому из пп.1-11, отличающийся тем, что кодируемый полипептид фактора VIII содержит гликозилируемый полипептид, расположенный между двумя следующими друг за другом аминокислотами

13. Полинуклеотид по любому из пп.1-12, дополнительно содержащий промоторный элемент, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим полипептид фактора VIII.

14. Полинуклеотид по п.13, отличающийся тем, что промоторный элемент представляет собой специфическую для печени промоторную последовательность перед нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид фактора VIII.

15. Полинуклеотид по п.14, дополнительно содержащий последовательность интрана, расположенную между специфической для печени промоторной последовательностью и нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид фактора VIII.

16. Вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий полинуклеотид по любому из пп.1-15, для лечения гемофилии А.

17. Частица аденоассоциированного вируса (AAV), содержащая полинуклеотид по любому из пп.1-15, для лечения гемофилии А.

18. Клетка-хозяин, инфицированная частицей аденоассоциированного вируса (AAV), содержащей полинуклеотид по любому из пп.1-15.

19. Способ получения частицы аденоассоциированного вируса (AAV), включающий введение полинуклеотида по любому из пп.1-15 в клетку-хозяин млекопитающего, причем полинуклеотид является способным к репликации в указанной клетке-хозяине млекопитающего.

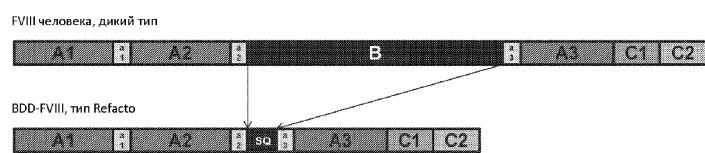
20. Способ лечения гемофилии А, включающий введение пациенту частицы аденоассоциированного вируса (AAV) по п.17.

21. Способ трансдукции клетки-хозяина, включающий контактирование клетки-хозяина с частицей аденоассоциированного вируса (AAV) по п.17.

22. Применение частицы аденоассоциированного вируса (AAV) по п.17 для лечения гемофилии А.

23. Применение частицы аденоассоциированного вируса (AAV) по п.17 для трансдукции клетки-хозяина.

24. Применение частицы аденоассоциированного вируса (AAV) по п.17 для получения лекарственного средства для лечения гемофилии А.



Фиг. 1

CS04-FL-NA

(Продолжение)

Фиг. 2А

Фиг. 2В

036944

CS04-FL-AA

MQIELSTCFFLCLRRFCFSATRRYLGAVELSWYDYMQSDSLGLPFDVAD'FPFRVPVKSPIINTSVWYK  
DQFVPEFTDHLNIAKPFPPWMLGLPQTIAQVEYDVTWITLKRNMASHPSLVAHGVWSVYNSRGALEYG  
DQTSQREKEDWPFVPGGSHTYVWQVLTKEGNMPSDLCILTYSLSHVLDVLNLSGLIGALVCRE  
GSLAKEKTOPLHKLFLFPEVDEGKSWSHSETKNSLQMCRCAASARAWPMTHTVNGYVNRSLPGLIGC  
HRKSVYMWVHIGMTPEVHSIISLEFLPTVNRHRQASLIEP1STFLTAQTLMLQDGLFQFLPHISSH  
QHDGMEVYVKSZCPEEFLPMLKNNNEAEDYDDLTDGMDVWRSFLDCNSPSFQICRVSWKHGPWTW  
VHLYIAAEECZWCYAPLAPDRCDSYKSLVNNPGRQKRYXKVRUMAYTDETFKTRAEQHESL  
GFLYLYEVGUTLIIIFNQNSRQSPYVNPHTGIDVPRYSLRKLPGVHKLHDFPFLIPFEEIYKFWTVT  
VEDGPTKSDPFLRCLTRYSSPYNMRD2ASGLSLGIPLLCYKE3VUQRGNQIMSDKRNV1LPSVFDENK  
SYWLNTENQFPLRNFGAVQLEDEPFGQASNIMHSINGVTFSLQDLSVCLHEVAYVNTYLSIGADTFLS  
FVFSGTYFQICMVKWYEDTLLPFPSFTVGMSENGLW1LGCNHSFRNMGTMALLVHKSCCRNTGD  
YIYEVSYEDISASKNNAAIEPFRPSQNFPEVPLKREGEIRTPFLTQSDGEEDYDUDTISVEMKEDDF  
1YDEDDGNSQPSRPLSQQKRNTHYFIAVERLWDXGMSSTPVHLRNRAQSGSWPQFKKUVQEFTTDSGPO  
PLYGEMLNHEGLLGLPVIARAEVNMIVTFRNQASRSPYFSYSSLISYEEDEQSGAEPFRKNTVPHN  
FTIIVKQVHOMMAPTEKDFFDCKAWANF3DVLDELCWV;GSLIGLPLVCHTNTLPNQARQVTVCEPFL  
FTIIFDETKWSYNTENMRNCRAPCNPQIMDPEFLKENTYFHAINGYIMDTLPGLVMQAQDQRIRWYLLS  
MGSNENIHSIHFSGHUVTFRKKEEYMAHNLNLYPGVFTEVMLPSKAG1WRECLIGEHLHACMSTL  
FVNSNCKTQCPMLGMSAHR1DFPQTASGQYQWPAKLRHSGSINAWSTKEFFPSV1KWDLLAPMA  
1IGKPTQARQFQFSLSSYQSP1IYMISL6GKQXQTYRGNSSTGMLWFGNVDSGKIHNNFPI  
YIRLHPTHYS1STLRLMELQCDLNSCSPMLGMSKAI1SDAQTITASSYPTNMFRATWSPSKARLHLQG  
RSNAWPRQVNNPKEWLQDFQKTMVKTGVTYQGVKS1LTSM5YKEFPLSSQDGDQHWTLFNGVKW  
FVQGQNSDFTVNNLSLPPBLTRYLHQFSWQHJQALMEVIGCQADQLY (SEQ ID: NC:2)

Фиг. 3

CSO4-HC-NA

Фиг. 4

CS04 - LC - NA

Фиг. 5

6

Фиг. 7А

Фиг. 7В

Фиг. 7С

CS04Δ(760-1667) - CS04-SCI-NA

(Продолжение)

Фиг. 8А

ACCAAGGATGAGTTGACTGCAAGGCTGCGCTACTCTCTGATGTCGACCTGGAGAACGATGTCGACTG  
GGCTCTGATTCGGGACCATCTTCGTCGTCGACCACTGAAACCTGCTGAGACCTGCGCTTCAGTCAGTGCCTG  
CAGAGTCTTGGCCCTTCCTGACCATCTGATGAAAGGAAAGCTGCTGACTTCACIGAGAACATGAGGCGC  
AATGCGAGGGCCCATGCAACATTCAGATGGAGGACCCACCTTCAGAAGAGAACTTCCGCTTCATGCCATC  
TCTATGGCTACATCTGGAGACCCCTGCGCTCTGATGGGGAGGACCTGAGGAGCTAGGTGTTCTGGCT  
TCTATGGCTGCACTGAGAACATTCAGTCATCCACTCTGGCGAGCTTCTGACTCTGCGCAAGAAGAG  
GAGTACAAGAATGGCCCTGTAACACCTCTAACCTGGGGCTTGGAGACTGTGGAGATGCTGGCTCCAAAGCT  
GGCATCTGGAGGAGCTGGAGTGGCTCATGGGGACCATCTGGCTGAGACCTGCTTCTGGCTGCA  
ACGAAAGATGGCTGAGGACCCCTGGATGCTCTGGCGACATCAAGGGACTTCACATGCTGCTGG  
CACTATGGCCACTGGCCCCAACCTGGCAAGGCTCCTACTCTGTTATCCATCAATGCCATGGAGCACCAGA  
GAGCCCTGAGCTGGATGAAAGTGGACTCTGGGCCCCATGATCATTCAGGATCAATGAGGACCC  
GGCCAGAATGCTGGAGCTTCAACCTGGACTCTGGCTGAGCTGAGGAGCTGGCTGGAGCAGGGGG  
ACCTACAGAGGAACTCCACTGGAAACACTCATGTCGTTTGGCAACTCTGAGCTCTGCCATCAAGAAC  
AACATCTTCACACCCCCAACTCATGGCCAGTACATGCGGCTGAGCTGGCCRCGACCCACCCACTAACAG  
CTGGAGGGCTGGAGCTGGCTGAGCTGAGCTTCCTGGCACTGGGCTGGAGCTGGAGCACCCTT  
TCTGATGGCCCAAGTACTGCTTCAGCTTACCTACCAACATGTTGGCAACTTGGAGGCCAAGAACGG  
CTGGACCTTCCAGGGAGGAGGAGCAATGCTGGAGGCCCCAGGTCAACAAACGAAAGCTGCTCCAGTGGAC  
TTCCAGAGAACATGAGGAGCTACGGGTTGGAGCTAACGGGAGCTGGAGCTGGAGCTGAGGAGCT  
AAGGAGCTTCTGAGCTGGAGCTGGAGGCCCCAGGTCAACGGGAGCTGGAGCTGGAGCTGGAGCT  
GTGTCAGGGGACCAACCCAGGACAGCTGCACTGGGCTGAGCTGGAGCTGGAGCTGGAGCTGGAGCT  
CTGAGGAGTTCACCCCCAGGAGCTGGGTTGGAGCTGGAGCTGGAGCTGGAGCTGGAGCTGGAGCT  
GAGCTGACTG (SEQ ID NO:9)

Фиг. 8В

CS04A(760-1667) = CS04-SCI-AB

MQIELSTCFLLRLRUCFSATRYYLGAWEVSDYMQSDLGEVPUVDRFPVPKSFPFNTSVVYKK  
TLFVEFTDHLFIATKPRPPWMLGLPFTAQAEVYDFTVVTILKNNMASHFVSLHAGVSVYWKASSEGAED  
DQTSREKEDDVFVPGHSYTVWQVLKNGPMSDFCLTYSYLHSLVLDLNSGLGILALLVCREG  
SLAKEATQTLHFKLFLFALLFEGKSWSHETKNSLMDQDARASAWRKHMTVNGVYNRSLPGLLICH  
RKSVYWHVIGMTTPVHSIFLGEFTLFRVNRHRCASLISJPTFLTQTLIMLDLGGFLFCIHSQQ  
HDCMEAVYKDVSCPEEPDQFVNEAEDVYDLDLTDSEMDVURFEDDNTSFICJRSVANKPHKTW  
HYIAEEEDWDYAPLVLAPD3RSYKSOYLNQNCPIQRGKYKVKRPMAYTDETFKTRAECHGSSIL  
PLLYGEGDPTLIIIFKNGCASPRYNIYPHCTIDVPRLYSRRLPKGVXHLDPPFLPGEIIPFKXWTV  
EDGTYTCKDPRBLTRYSSZFSVNMERDLASGLLIGPLLYCIESVQDRQNGQIMSDRDNVILTSVFDENRS  
WLYTENLQRFLPMPAGVLCODEFEPFQASNIMHSINGYFQDLSLQSVCLHEVAYWVHLISIAGDFTLSY  
FFSGYTFKHMVYEDTLLTFFPSGETVFMSENPLGWLIGCHNSDFFNRGMATLLVKSSEDRTGTY  
YEDSYEISLAYSLLSKNNAAIEPRETITLTLQSDQEEDIDT1SVEMKEDFDIYDEDEMDQSPRSFQJ  
KTRHYTFIAVERLWDYGMSSPHVLNRNQASCGSVPFQKFKVVFQPEFTDQSFTQPYRGELNEHLLGLG  
PYIKA8EVDNIMVTFRNCASPRYSFYSSLISYEECDRCQGAEPRKNFVCPNEWTKTYPFWKVKHNMATPK  
DEFUICKAWAYFSUVDLEKDVHNSGLLGPVWCHTNLNPAHGRQTVQFALFIFTIDETKWSYTFEN  
MERNCRAPCNIQMDPFTKFNRFYHAINCYMDT1LPLVQMAQDORIRWYLLNSGNGNENTHSIHFHS  
VFTVRKREYKMLAQNLYPGVFTEVMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVSYNQKQTPGLMA  
SGH1RDFQITASQCYQWQAKPLARLHYSGNSINAATSTKEPFSWIKVULAPM1M1E1G1TQAGQAKFSS  
LYIQSITFIMSYLQDKWQXTRYGRNSTGMVFTFGVNDGSGTKHNF1NPFLIARLYRLHPTHYSIRSL  
RME1LMGCDLNSCSMLPQGMESKAISDAQITASSYFTNMFTWPSPKARLHLQGKSNARWPQVNNPKEW  
LQVDFPQTMKVTGTTVQVKHLSLTSYMFVKEFLSSQDGHQWLTFLFQNGKVKVFGQNSQDSFTPVVNS  
LEPLPFLYTRIHLHOSWQHCKLARMLVGEVLCGACDQLY (SEQ ID NC\_10)

Фиг. 9

CS04Δ(772-1667) - CS04-SC2-NA

ATGCGAATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTCTGTGCCGTGAGGTTCTGCTTCTGCCACAGG  
AGATACTACTGGGGCTGTGGACCTTCTTGGACTACATGCACTCTGACCTGGGGACTGCTT  
GTGGATGCCAGCTTCTTCCACAGACTGGCCAAATCTTCCCAATTCACAAACCTCTGTGCTTACAG  
AAAGACCTTCTTGGAGTTCACTGACCACTCTTCAACATTGCAAAACCCAGGGCACCTGGATG  
GGACTCTGGACCCACATTCAAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTCACTCACCCCTCAAGAACATG  
GCCCTCCACCTGTGGACCTCTGATCTGTGGGGTCACTGTGGAAAGCCCTGTGAGGGGCTGAG  
TATGATGCCAGACAGCTCCAGGGAGAGGGAGATGGGGACTGGGGCTCTGGGGGAGCCACACC  
TATGTCGGACCTCTCAAGGAATGGCCCCATGGCCCTGACCCACTCTGCCCTGACACTAC  
TACCTTCTCATGTGGACCTGGTCAAGGACCTCAACTCTGACTGTATGGGGCCCTGTGTTGTG  
AGGGAGGGCTCTGGCCAAAGAGAAAGACCCAGACCCCTGCAAGAAGTCTTCTCTGGTTGTGTC  
TTTGTGAGGCGAACAGACTGCACTCTGAAACAAAGAACATCTGGTATGCAAGGAGATGCTG  
TCTGCCAACGGGCTGGCCAAAGATGACACACTGTGATAGCTGTGGTCAAGGACCTGCGCTGAC  
ATTGGCTGCCACAGGAATCTGTACTGGCATGTGATGGCATGGGACACCCCTGAGGTGAC  
TCCATTTCTGGAGGGCCACCTTCTGGTCAAGGAAACACAGACAGCCAGGGCTGGAGATCAG  
CCCATCACCTCTCATGGCAGAGGCTGTGATGGACCTCTGGACACTCTCTGTGTTCTGCC  
ATGACCTCCACCAAGCATGTGGCATGGGGCTATGCTGAGGTGGACAGCTGCGCTTGAGGAGCA  
CAGCTCAGGATGAGAACAAATGAGGAGGGTGGAGGACTATGATGATGACCTGACTGTGAGATG  
GATGGTGTGCGCTTGTGATGATGACAAACAGCCCATCTTCACTCATGATCAGGTGTGCGGAAAGAAA  
CACCCCAAGACCTGGTGCACATACATTGTGTGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCAACTGTG  
CTGGCCCCCTGTGACAGGAGTCAAGAGGCAACTCTGACAAATGGCCCAAGAGGATCTGG  
AAGTACAAGAAAAGTCAGGTTATGCCCTACACTGTGAAACCTTCAAGACCAAGGGGAGGCAATT  
CATGAGTCGGCATCTGGGCCACTCTGTATGGGGAGTGGGGACCCCTGCTCATCATCTC  
AAGAACAGGCCCTCAGGCCCTACACATCTACCCCATGGCATACTGTGATGTCAGGGCCCTGTAC  
ASCCCCAGCTGCCAACAGGGGCTAACACCTCAAGACTCTCCATTCTGGTGGGGAGACTCT  
AAGTACAAGTGGACTGTCACTGTGGAGGATGGACCAACCAATTGTACCCCCAGGTGCTCACC  
TACTACTCAGGTTGTGACATGGAGGGACTGGGCTCTGGCTTGTGTTCTGATGGCCACTGTCTC  
TGCTACAAGAACACTGTGGACAGAGGGGAAACAACTGTGACAGGAACTGTGATTGT  
TCTCTGCTTCTTGTGAGAACAGGAGCTGACTACTGTGAGGAACTTCATGCAAGAACATTC  
CTCTGGGGTGCAGGGAGGACCTGAGTTCCAGGCCAGCAACATCATGCACTCCATCAATGG  
TATGTTGTTGACAGCCCTCAGCTTCTGTCTGGCTCATGGGTGCTACTGTGACACTCTTCT  
ATTGGGGCCCAAGACTGACTCTCTTCTGTCTTCTGGTCAACACCTTCACAAACAAAGATGTG  
TATGAGGACACCTCTGGGACTCTCTCTGGGGAGACTGTGTTCTGACGGGACTGAGAACCT  
GGCTGTGGATTCTGGGATGCCACAAACTCTGACTTCCGCAACAGGGGATGCTGCGCTGTCAA  
GTCTCTCTGGTACAAGAACACTGGGACTACTGTGGGACACTGAGGACACTATGAGGACATCTG  
CTGCTCAGCAAGAACAACTGGCATTGGCAGGGAGCTTGAGGCAAGATTCAGGACACCCAGCA  
AGGGAGATCAGGAGGACCCCTCTGGTCACTGAGGAGGAGTGTACTATGATGACACATTCT  
GTGGAGATGAGAACAGGAGACTTGTACATCTGACGAGGAGCAGGAAACAGAGGCCAAGGAGCTC

(Продолжение)

Фиг. 10А

CGAAGAAGACCCAGGCACTACTTCATTGCTGCTGGAGCCCTGTCGGACTATGCCCAGTCGCTCC  
AGCCCCCATGCTTCAGGAACAGGCCCACTGGCTCTGCGCACAGTTCAGAAAGTGTCTTC  
CAGAGTTCAGTGGACCTTCAAGGCGCTGGACCTTCAAGGCGCTGACAGGGGAGCTGAATGAGCTTC  
CTTCGGCCCATACATCAGGCGTGGAGGACAAACATCATGGTGCACCTTCGCAACAGGCC  
TCCAGGCCCTACAGCTTCAAGCTCCCTCATAGCTATGAGGAGGACCAAGGGCAGGGGCTGAG  
CCACCAAGAACTTGGAAACCAACTGAAACCAAGGACTACTTCGAAAGTCCAGCACCATG  
GGCCCAACCAAGGATGAGTTGACTCGAACGGCTGGGCCACTCTCTGCTGATGAGGACTGGAGAAG  
GATGTGCACTCTGGCTGATGGCCACTCCTGGCTCTGCCACACCAACACCCCTGAACCTCTGCCCAT  
GGAAGGCAAGTGTAGTGGAGGAGTTGCCCCCTTCACCATTTGATGAACCAAGAGCTGG  
TACTTCACTGAGAACATGGAGCGAACCTGGGCCCCCATGCAACATCAGATGGAGGACCCAC  
TTCAGAACAGAACATGGCCCTTCATGCCATCAATGGCTACATCGACACCCCTGGCTGGGTTGTC  
ATGGCCAGGACCAAGGGATCAGGGTGGTACCTGCTTCTATGGCTCAATGAAACATTCACTCC  
ATCCACTTCTGGCATGTTCTACTGTGCGAACAGGCACTGAAACAGTGGCTCTGATCACAC  
CTCTACCCCTGGGCTTGTAGACTGTGGAGATCTGGCTCCAAAGCTGGCATCTGGAGGTGGAG  
TGGCCTATGGGAGGACCTGCTCATGTCGATGAGCACCTGTTCTGCTCATGCAACAACTGC  
CAGACCCCCCTGGGAATGGCTCTGGCCACATCAGGGACTTCAGATCACTGCTCTGGCAGTAT  
GGCCAGTGGCCCCCAAGCTGGCAGCTCACAATCTGGATCCATACCTGGCTGGAGGACCAAG  
GAGCCATCAGGCTGGAGTCAAAAGTGGACCTGCTGGCCCCCATGATCATCGCATCAAGGAC  
GGGGCAGGAGAAGTCTCAGGCTCTACATCAGGCACTCATGATCATCTCACCCCTGGATGGC  
AGAAATGGCAGACCTACAGGCAACTCCACTGGAAACACTCTGGCTCTTGGCAATGTTGGAC  
AGCTCTGGCATCAGACACAGATCTTCACCCCCCAATCATGCCAGATACATCAGGCTGGACCC  
ACCACTACAGCATCCCGAGGCGCTGAGGAGTGTGAGGCTGTGAGGCTGTGAGCTGACTCTGAGC  
ATGGCCCTGGCATGGAGAGCAAGGCCATTTCAGATGCCAGATCACTGCCCTCAGCTACTTCAC  
ACATGTTGGCCACCTGGAGGCCAAAGCAGGCCAGGCTGCAACTCCCTGGAGGAGGACCAATGGCTGG  
AGGCCAGGCTCAACACCAACGGAGTGGCTGCAAGGCTGGACTTCCAGAGACCATGAGGTC  
GGGGTGGACCCAGGGGGTCAAGGGCTGCTCACCGAGCATGATGAGGAGTTCCTGATCAC  
TCCAGCCAGGATGGCCACCACTGGACCCCTCTTCTCCAGAATGGCAAGGTCAAGGTGTTCCAGGG  
AACCAGGAGCTTCACCCCTGTGAGGAGGACCATGAGGCTGGACCCCTCTGACCAAGATACTGGAG  
ATTCAACCCAGGAGCTGGCTCCACAGATGGCTGACCTGGAGGATGGAGTGGGGATGAGGCTGG  
GACCTGATCTGA (SEQ ID NO:11)

Фиг. 10В

CS04Δ(772-1667) - CS04-SC2-AA

MQJELSTCFFLCLLRFCFSATKRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPYDARFPKPVKSFFNTSVVYKK  
 TLFVETDHLFNIAKERPFWMGLLGPTIQAEEVYDTVVITLKNNAHSPVSLHAVGVSYWKASEGAETYD  
 DQTSQREKEDEDKVFPPGSHTYVWJVLKENGMASDPLCLITYSYLSHVDLVKULNSGLIGALLVCREG  
 SLAKERQTDLHKFILLFAVFDEGKSAHSETKNSLMQPRDAASARAMPKHTVNQGVNRSPLGLIGCH  
 RKSVYHIVIGMTTPEVHSIFILEGHTFLVRNHRQASLEISPIFELTAQTLIMDLQFLLFCHISSHQ  
 HDGNEAYVKVUDSCPEEPQLRMKNNNEAEDYDUDDLTDSMDVVRFDDENSPSF1Q1RSVAKKHPKTKV  
 HYTAEEEDWDYAP1VLFAPUDRSYKSYQQLNNGFQRIGRKYKVKFMAYTDETFKTRFAIQHESGILG  
 PLILYGEVGDPLGPIYTRKNGQASRPNYIYPHGIIITVRPLYSRRLPKGVCHLKDFFLLEGE1FKYKWTVT  
 EDGPTKSDFPCLTRYSSFVNMRERULASGLI1GPILICYKESVQQRGNQ1MSUKNRVL1LFSVFLNRS  
 WYLNTENIQRFLPNPACVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSLQLSVCLHEVAYWYIILS1GATDFLSV  
 FFSGYTFKHKMVEYDTLILFFFSGETVEMSMENFGLWILGCCHNSDFRNRCMTALLKVVSCEKNTGDY  
 YEDSYEDIISAYLISKNNA1EPRSFQSNSRHESTREITRTT1QS0QFEDYDUDTISVEMKKEDFDIYD  
 EDENQSFESFQKKTRHYFIAVERLWYGMSSPHVILRNKAQSGSPQFKKVVQEFTDGSFTQPLY  
 RGEELNHLGLLGPYTRAEEVENDIMTFRNQASRPNYFSSS1SYEDDQRQGAEPRKNFVKPNEKTKY  
 FWKVOHMAPTKDEFICKAWAYFSUDLEKDVHSGLIGPLLVCHNTLNPAHGRQVTVQEFALEFTI  
 FDETKSWYFTENMERNCRAPCN1QMEDPTFKENYRPHAIINGYIMDTPGLVMAQDQRIRWYLLSMSGS  
 NENITHS1HFSGHVTYKVALYLYPGVFEITVEMLPKAG1WREVECLIGEHLHAGMSTLFLV  
 YSNKCGT1PLQMASGHI1RDPQ1TASQYQWAPKHLHSGS1NAWSTKEPPSW1KVDLAPM1I1HG  
 IKTQGARQKFSSLY1SQF1IMYSLDGKWKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI1FNPPT1IARYIR  
 LHP1HRS1RFLMELMCGDLSNCMPLGMESKA1SDA1SAYST1TMFEATWPSKARLHLQGRSN  
 AWREQVNNPKEWLQVDFQKTMKV1GVT1QGVKSLLTSMYK1F1L1SSQDGHQW1FFPQNGKVKVFQ  
 GNQDSFTPVNVSLDPPPLTRYL1RHPQS1WQ1ALRMEV1LGCEAQDLY (SEQ ID NO:12)

Фиг. 11

CS01-FL-NA

ATSCAGATTGAGCTGTCCACCTGCTTCTGTGCTGAGATTCTGCTTCTGCCACCAGG  
 AGATACTACCTGGGGCTGTGAACTTCTTGGACTACATGCCACTCTGACCTGGAGAGCTGCC  
 GTGCGATGCCAGCTCCCAACCCAGACTGCCCAAGCTTCCCACTCTGACCTACAG  
 AAGACACTCTTGTGAAATTCACTGACCCACTGTCACACTGCAAAACCCAGACCCCTGGATG  
 GGACTCTGGGACCCACCATCAGGCTGAGGTGATGACACTGTGCTCATCACCCTGAAAGCATG  
 GCATCCCACCCGTGTCATGCTGCTGGAGCTCTCATCTGGAAAGCCCTGAAAGGGCTGAG  
 TATGATGACAGACATCCCAGAGAGAGAAAGGGATGACAGGTTCCCTGGGGATCTCACCC  
 TATGATGTCAGGAGCTCTCAAGGAGCATGGACCCATGGCAGTGCACCCACTCTGCGCTGACATACTCC  
 TACCTTCTCATGTCAGGACTCAAGGACTCTGCGACTGATTGGGACTCTGCTGCTGTC  
 AGGGAAAGGATCCCTGGCCAAGGAGAAAACCCAGACACTGCAACAAGTTCATCTCCTGTTGCTGTC  
 TTGATGAGGGCAAGTCTGGCACTCTGAAACAAAGACTCCCTGATGCAAGACAGGGATGCTGCC  
 TCTGCCAGGGCATGGCCAGATGCACTGTGA1GGCATGGCAGACTGACTCTGCCCTGGACTC  
 ATTGGCTGCCAGGAAACTCTGTCATGTGATGGCAGTGGGACAACCCCTGAAAGTGCAC  
 TCCATTTCCTGGAGGACACCCCTCTGTCAGGAAACCCAGACAAGCTCTGCGAGATCT  
 CCCATCACCTCCTCACTGCAAGACACTGCTGATGGACCTTGGCAGACTTCTGCTGTTCTGCCAC  
 ATCTCTCACCACGGCATGATGCACTGGCAAGCCTATGTCAGGACTCATGCCCTGAGGAACCCA  
 CA3CTCAGGATGAGACATGAGGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTCTGAGATG  
 GATGTGGTCAGATTGATGATGACAACCTCTCATCTGATGAGACCTGACTCTGAGATGAGATG  
 CACCTGGGACACATGGCTGCACTACATTGCTGCTGAGGAAGGGACTGGGACTATGCAACACTGGTC  
 CTGGCCCTGATGACAGGGCTACAAGTCTGAGTACCTCTGACACAATGGCCCAAAAGAATTGGAAGA  
 AAGTACAAGAAAGTCAGATTGATGCACTGGCTCAACTGATGAAACCTTCAAGGAAAGAGAACCCATTG  
 CATGACTCTGGCATCTGGGACCAACTCTGAGTATGGGAGATGGGACTACCTGCTGGAGAGATCTTC  
 AAGAACCGAGCTCCAGGCCATACACATGACCTGGGACACCCCTCTGCTGGAGAGATCTTC  
 AGCAGGAGACTGCCAAAGGGTGAAACACCTCAAGGACTCTCCCATTCTGCTGGAGAGATCTTC  
 AAGTACAAGACTGGACTGTCACTGTGGAGGATGGGACCAACAAAGTCGACCCCAAGGTGCTCAGCAGA  
 TACTACTCTGGATGAGACATGGAGAGAGACCTGGCAGTGGGACTGATGGGACACTGCTCATC  
 TGCTACAAGGAGTCGTGGACAGAGGGCAACAGATCATGTCATGACAAGAGAAAATGTGATTCTG  
 TTCTCTGCTTGTGAGAACAGATCATGGTACCTGACTGAGAACATTCAAGAGATTCTGCCAAC  
 CCTCTGCGGTGCAACTCTGAAAGACCCCTGAGGTTCCAGCGAACACAATCATGCACTCCATCAATGGC  
 TATGTTGTTGACTCTCTCAGCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
 ATGGGGCACAACCTGACTCTTCTGCTCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
 TATGAGGACACCCCTGACACTCTCCATTCTCTGGGAAACTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT  
 GGACTGTGGATTCTGGGATGCCACAACCTGACTCTGAGAACACGGGAATGACTGCACTGCTCAA  
 GTCTCCCTGACTGACAAGAACACTGGGGACTACTGAGGACTCTTATGAGGACATCTCTGCC  
 CTGCTCAGCAAGACACTGGCAGTGGACCCAGAAGCTCTCAGAATCCACCTGCTGCTGAGAGA  
 CACCAAGAGAGATCACCGGACAACCCCTCAGTCGACCCAGGAGAGATGACTATGAGACACC  
 ATTCTGTGGAGATGAGGAAGGAGACTTTGACATCTATGATGAGGAGCAGAGAACCCAGTCTCAAGA  
 TCATTCAGAAGAACAGACAAGACACTACTCATGCTGCTGCTGAAAGACTGTGGGACTATGCC  
 ATGCTCTCTCCCCATGTCCTCAGGAACGGSCACAGTCTGGCTCTGTCGOCACAGTTCAAGRAAGTG  
 GTCTTCCAGGAGTTCACTGATGCTCATTCACCCAGCCCTGACAGAGGGAACTGAAATGACCA

(Продолжение)

Фиг. 12А

CTGGGACTCTGGGACATACATCAGGGCTGAGGTGGAAGAACATCATGGTACATTGAAAC  
 CAGGCTCCAGGCCCTACAGCTTCACTCTTCCCTCATCAGCTATGAGGAAGAACAGAGAACAGG  
 GCTGACCCAGAAAGAATTGGAAACCCCATGAAACCAAGACTACTCTGAAAGACTCAGCAC  
 CACATGGCACCACCAAGATGACTCTGCAAGGCTGGCAACTCTCTGATGTGGACCTG  
 GAGAAAGATGTCGACTCTGGCTGAUTGGCCACTCCGGTGGCACCCCTGACCC  
 GCACATGGAGGCAAGTGAAGTGTGAGGAGTTGGCTCTTCAACCATCTTGAATGAAACCAAG  
 TCAGTGTACTCACTGAAACATGGAGAAACTCAGAGCACCATGCAACATTCAGATGGAGAC  
 CCCACCTTCAAGGAGACTAGUUTCTGGCCTCATGGTACATCATGGACACCTGGCTGG  
 CTGTCACTGGCACAGGACCAAGAACATCAGATGTTCTGCTTCTATGGGATCCTGAGAACATT  
 CACTCATGGTCACTGGCTACTGAGACTCTGAGACTCTGGAGATGGCCCTCAAGCTGCACTGGAGG  
 TACAACCTCTACCCCTGGGGCTTTGGAGACTGGAGATGGCCCTCAAGCTGCACTGGAGG  
 GTGGATGGCTCATGGGAGACCTGCACTGTCGAGTCAACCCCTGTTCTGGTCTACAGAAC  
 AACATGGCAGACCCCTGGAAATGGCACTGGGACACATCAGGAGACTCTCAGAGATCAGTGGC  
 CAGTATGGCACTGGCACCCAAACIGGGCAGGCTCAACTCTGGCTCATCATGCACTGG  
 ACCAACAGGACATCTTGGATCAAGGCTGGCACAGGACTGATCATCTGGCACTAAC  
 ACACAGGGGCAAGACAGAAATTCTCTCTGTACATCTCACAGTTCATCATGTAACCTCTG  
 GATGGCAAGAACTGGCACATCACAGGCAACTCACTGCAACCCCTCATGTTCTTGGCAAT  
 GTGCAAGCTGCACTGCAACACATCTGCAACCCCTCATGTTGGAGATCACATCAGGCTG  
 CACCCACCCACTCAATCAGATCAACCCCTCAAGATGGAACATGATGGGATGTGACCTGAACTCC  
 TGCTCATGCCCCCTGGGAATGGCACAGGCAACGGGATTTCTGATGCCCCGATCATGCACTCTC  
 TTGCACTTCTGGCAACAAAGGCAACGGGCTCAAGTCTCTGCACTCTGCAATGATGTAAGGAGTTCTG  
 ATCTCTCTGGGCTGACAACCCAGGGGCTCAAGTCTCTGCACTCTGCAATGATGTAAGGAGTTCTG  
 CAGGCAACCCAGACTCTTCAACACCTGTTGAACACTCACIGGACACCCCCCTCTGACAAGATAC  
 CTGAGAATTCACCCAGCTTGGTCCACAGATTTGGCTTGAAGATGGAGCTTGGGATGTGAG  
 GCACAAGACCTGACTGA (SEQ ID NO:13)

Фиг. 12В

## CS08-FL-NA

ATGCAGATCGAACTGAGCACTTGTCTTCTCTGTCTCTGGCTTTGGCTTCTCCGCCAACAGG  
 AGATACTATCTGGTGGCTGGAGCTCAGCTGGACTCATGAGACGACTTGGGTAACTGGCT  
 GTGGACGCCAGGGTTCCACCCCGCTGCCAACAGATTCCGGTCAACACCCAGTGTGTACAAG  
 AAAACCCCTCTGGAAATCAGGACCCACTGTCACACCCCAACCCGGCCCTCTGGATG  
 GGGCTGCTGGCCGACGATCCAGGCTGAGGCTATGACACGGTGTGATTACCTCTGAGACATG  
 GCTAGCCACCGCTGAGCTGAGGCTGAGGCTATGACACGGTGTGATTACCTCTGAGACATG  
 TACGATGACCAAGACTCTGAGGCTGAGGAGAACAGAACAAAGTGTCCCCGGGGTCTCCACCC  
 TATGCTGGCAGGCTCTGAGGGAATGCTCTATGGCTCTGGCTCCGGACCCATTGTGCTCACCTACTCT  
 TACCTAAGGCAATGTTGATCTGTCAGGACCTGTAAGGCTGAGGCTGATGGGGCTGTCGTGTG  
 CGGGAGGCTCACTGGCAAGGAAAGACCCAAACTCTGACAAGTCTCATCTGTGTGTC  
 TTGAGGAGGGAAAGTCTGGCACTCCGAGGACCAAGAACAGCTGAGGACCCGGACGGCAGCC  
 TCGGCCCCGGCTGGCTGGCCAAGAGTGGCTGACACGGCTGTAACAGGAGGCTTACCGGCTG  
 ATCGGCTGCAACGGCAAACTGGCTACTGGCATGTTGATGGCAATGGGCAACACGCCGAGGTCCAC  
 AGTATCTTCTGGAGGGCACACTTCTGGTCCGGAAATCAGGCCAGGGCTGGAGATCAGC  
 CCCATAACCTTCTGAGGGGAGACCTACTCTGGTCTGAGGATCTGGTCACTGGGAGGCTGG  
 ATTTGCTCCACAGGACATGGGATGGAAACCATGATGAAACTGGACTCTGGCCGGAGAAC  
 CAGCUTAGGATGAAGAACATGAGGAGCCGAGACTACGGAGATGACCTTACGGATTCAAGAATG  
 GACGTTAGTACGGTTGACGAGACAACTCTCCATCTTCACTACAGATTCGCTCCGTGCCAACAG  
 CACCTTAAGACTTGGGTGACTCATCTGGGGGAGGAGGAGGACTGGGATATGCTCCCCGG  
 CTGGGCCCCGGACGGCAGCTACAAGGAGGACTCTGAATACGGGCCCCAGGGCATGGCCGG  
 AAGTACAAGAAAATGCGGGTCACTGGCTTACCGGAGGACCTCTAAGAACCCGGAGGCTATCCAG  
 CATGAGAGCGCATCTGGGGCCCTCTGTAACGGGAAGTTGGAGACACACTGCTGATCATCTC  
 AAGAACGGGAGCAGGCCCTACACACTTACACACTTACGGCATGTTACCGGATGTCGGCTGGTGTAC  
 ACCGGACGGCTGGGGCAAGGGCTGAAGGACCTGAGGACTCTGGATCTGGGGGAGAACATCTC  
 AAGTACAACGGACTCTGACGGCTGGAGGATGGGGGAGGACAGGGCATGGCGTGGCTGACCGT  
 TACTACTCAGGTTCTGCAATGAGGGGAGGACTCTGGCTGGGGGAGGACTCTGGCTGAC  
 TCTCTACAGGACTCTGGCAACGGGGGAGATCAGTCACTGAGTGAACAGGAAACCTGATCTCTG  
 TTCTCGTGTGCACTGGCTGGCTGAGGACCCGGTTCTGGGGCTGAGGAGGACTCTGGCTG  
 CGGGCGGGCTGGCTGAGGACCCGGTTCTGGGGCTGAGGAGGACTCTGGCTGAGGAGG  
 TATGTTGATCTCTGCACTGCTGAGGAGGACTCTGGCTGAGGAGGACTCTGGTATATCTCAGC  
 ATTGGGGCAACGGCAGCTCTGAGGCTGTTCTGGGGGAGGACTCTGGCTGAGGAGG  
 TACGGAGGATACCTGTGACCTGTTCCCTTACGGGAGAACCTGTTATGCTTATGGAGAACCC  
 GGGCTGGGATCTTGGCTGAGGACCCGGTTCTGGGGCTGAGGAGGACTCTGGCTG  
 GTGTCAGGTTGAGAACACACGGCGACTTACGGAGGACAGTTACGGAGGACATCTCTGGTAC  
 CTCTTACGAAAGAAATACGGCATGGAGGACTCTGGCTGAGGAGGACTCTGGTGAAGAGG  
 CATCAGGGGGAGATCAGGGAGGACCTGGAGTGGGAGTGGAGGAGGACTTACGACGACAG  
 ATCAGTGTGGAGTGAAGAAGGAGGACTCTGACATCTGGAGAAGGATGAAACCCAGTCCCTCGG  
 TCTCTCCAAAAGAACAGACCGGCACTACTCTACGGCGCTGTGAAACCCCTGGGACTATGGAGATG

(Продолжение)

Фиг. 13А

TCTTCTAGCCCTCACCTTTGAGGAACCGGCCAGCGGCCAGTGGCGCAGCGTGCCCCAGTTCAGAAAGTG  
 GTGTTCCAGGAGTTCACCGACGCCCTCTTCACCCAGCCACTTACCGGGCGAGCTCANTGAAAT  
 CTGGGCTGCCTGGGACCCATACATCAGGGCTGGGAGAACATCATGGTGCATTCCTGGAAAT  
 CAGGGCCACGACCATACACTTCTACACTCATCCTACACTCATCCTACAGGGAGAACGCCAGGG  
 GCTGAACCCCTTAAGAACATTCTGTAAGAACAAAGAACAAAGACCTACTCTGAGAACCTG  
 CACATGGCACCTACCAAGGAGCAGTCTGATTCAGCAAGGCTGCGCTACTCTCGAGCTG  
 GACAAAGATCTGAGCCCTGAATTCTGCGCTCTGCTGTCACAGAACACATCAACCC  
 GCACAGGGCGCAGCTACTCTGAGGAATCTGCCCTGTCCTTACCCATCTGAGAAC  
 TCTCTGTTTACCCAAAATGGAGAGGACTGCCGCCACCTGCAACATCAGAGATGGAGAT  
 CCGACATCAGGAAACTACCCGCTCCATGCAATGGTACACTCATGGACACCCCTGGCTGCC  
 CTCGATGGCCAAAGGCGCTATCCGCTGATTCGCTGCGATGGGCTCAACAGAACATC  
 CATAGTATCCTACCTCTGAGGCACTGTCACGGTGAAGAAAAGGGAGATCAAGATGGAC  
 TACAACCTCTACCCGGCTGTTGGAGACCTGGCCCTCAAGGGCCGCACTCTGGAGA  
 GTGGAATGCTGATGGAGACACTGGGATGTCACGGCTGTTCTGGAGAAC  
 AAGTGCAGACCCCTCTGGCATGGCAGCGGCCACATCCGCACTTCAGATACAGCAGCG  
 CAGTAGGCTGCTCCAAAGCTGGCCCTCATGGTACACTCTGGATCAACGCCCTGGCTGCC  
 ACCAAGAACCTCTCTGGAATCAAAGTAGACCTGCTAGGCCCCATGATCATTACGGCAGAAC  
 ACACAAAGGGCCGACAGAAGTCTGAGCCTATATCTCCAGATTCATCATGATAGCTG  
 GAGGAAAGAAGTACCCGGAGAAGTACCCGGAAACTCGACAGGGACCTGATGGTATTCCTGGTAAC  
 GTGGAGACGCTGGGAATCACACACATCTCAACCCACCATATCGCCCTACATCCGCTG  
 CACCCACTCACTATAGCACTTGGGATGGCAATGGGCTGACGATGGCTGAAACACC  
 TGTAGCATGGGCTGAGGCTGAGCTGAGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGCTGAG  
 TTTACCAACATGTTCTGCTACCTGCTCCCTCAAGGCCACTCCACCTGCAAGGGAGATC  
 GGCCTGGGCCACAGCTCAACATCCAAGGAGTGGCTGCAAGTGGACTTTGAGAAACTATGAA  
 GTCACCGGAGTGGACACAGGGAGTGAAGTCTGCTGAGCATGTAAGGAGTGGCT  
 ATCTCCAGTTGGCAGGATGGCACCTGGCTGTTCTGCAAAAGGTAAGTCAAGTCTC  
 CAAGGAAACCAGGACAGTTACACCCGGTGTGAACCTGGGACCCCCGTTCTCACTAGATAC  
 CTCCGATCCACCCCTCAGAGCTGGGTGACAGATGGCTGGGAGAAC  
 GCCAGGACCTGACTAA (SEQ ID NO:14)

Фиг. 13В

CS10-FL-NA

ATGCAGATTGAGCTCTCACCTGCTCTTCTGCTCTGCTTCTGCCACACGC  
 AGGACTACTTGGGAGCTGGAACTGAGCTGGATTACATGAGCTGAGCTTGGTAACCTCT  
 GTGACGCTCGTTTTCACCTAGGTTCTCAGTCTTCCCTTCAACACCTCAGTGGCTCTACAG  
 AAAACGCTGTTTGTGAGTTCACTGACCCACTCTCAACATTGCAACACCCCTGGATG  
 GGATTGCTGGGACCCACAATACAAGCAGAAGTCTACGACACGGTGGTGAATTACCTGAGAACATG  
 GCGTCACCCCTGTTCACTTCACGCTGTTGGGGCTAGTTATGGAAAGGCTCAGGGTGGGAA  
 TACGATGATCAAACCGCCAGGGAGAAGGAGATGACAAGGTCTTCTGGGGTAGCCATACC  
 TATGTTGGCAGGTGCTGAAGGAGAATGGCCTATGGCTCTGATCCTCTGCTCACATCT  
 TACCTGAGTCAGTCAGCTGGTAAAGACCTGTAAGCGCTGATTGGTGCACTGCTGTTGT  
 AGAGAGGGAGTTGGCAAGGAAACTCAGACTCTCCAAAGTTATCTCTGTTGGTGTG  
 TTGACGAGGGCAAGTCTGGCCTCTGAAACAAAGAACACTCCCTGATGCAAGGAGATGCTGCA  
 TCTGCAAGGGCTGGCCTAAAGGAGATGACACAGTGAACGGCTATGTAATGATCACTGCCAGGACTG  
 ATAGGCTGTCATCGCAAGTCAGTGTATTGGCACGTTATGGGATGGGAACAACCTCAGAAGTGCAC  
 ACCATCTCCCTGGCACCTTCTGGTAACTGCAAGACCCCTGGAGATCAGC  
 CCAATCACCTTCTGACTGGCAACCTGCTGATGGATCTGGACAGTTCTCTGTTGTCAC  
 ATCTCCCTCCACCAACATGACGGGATGGGGCTTATGTAAGTGCATAGCTGTCGGAGAACCA  
 CAACTGAGGATGAAGAACACGAGGAGGAGGACTATGACGAGGATCTGACTGACAGTGAATG  
 GACGGTGTGGTTOGACGATGACAATTCTCTCTATTTATCCGATCCCTGGCCAGAACAGATGCTGCA  
 CACCCAAAGACTGGGTTTACATCCTGCTGAGGAGGATTGGACTACCGCCTTGGT  
 TTGGCCCCAGCGATGCTCATACAAGGAGCAGTACCTTAACATGTCACAAAGGATGGCCGG  
 AAGTACAAGAAGGTTAGATTATGGCTTACCGACGAGCTTTAAAAGTAGGGAGAACATTGAG  
 CATGAAAGTGGCATCTGGCCTCTGCTGATGGCAGGGGGGAGACCCCTGCTGATT  
 TGTGAGGAGTCTGCTGATCAAAGGAAACAAAATAATGAGGAGACAACTGATACGTCATCTG  
 TTGAGCTCTTGTGAGGAGATAGAGCTGGTACCTCACAGAAAATATTAGCGGTTCTGCTA  
 CCCCCAGGGCTGAGGAGATCCCGAGTCAAAAGCTACACATCATGAGCATCACAGGA  
 TAGCTATTCGATACCTGAGCTGCTCTGCTGAGCTGAGGATTTGGTACATCCTGAGT  
 ATCGGGCGCAACGGACTCTCTGAGGCTGTTCTGATACAGTCAACACAAATGGTC  
 TATGAAGATACCCCTGACTCTGTTCCATCTCAGGAGAGACAGTCTTATGAGTATGGAAAATCCT  
 GGACTGTGGATCTGGCTGACAAATTCTGATTTTGGAAAGAGGCTGACACCCCTGCTTAAA  
 GTGAGGCTCATGCAAGAACAGGGTGGTATTACTACGAGAATAGCTGAGGAGCATGCGTAT  
 TTGCTCTCAAGAACACCCCTATGAGGCAACGGTTCTGAGTCAAGGAGATGGAGCT  
 CATGAGGGAGAACAGGAGGAGATTCGACATTACGAGGAGGAGAACATGAGCTCCAAAGG  
 AGCTTTCAGAAGAAAACAGACACTATTCTATTGCGCCGCTGGGAGACTGGGACTACGGCATG

(Продолжение)

Фиг. 14А

TCTAGCTCTCCGCATCTACTAGAAATAGGGCACAAAGCGGATCCGTCGCCCTCAGTTAACAAAGTT  
 GTCCTTCAGGGATTTCATAGATGCGCTCCTTCACCGCCCTTGTATGCCGGGGAAACTCATTAAGAAC  
 CTGGGGCTTCCTGGGGCTCTTATATAGGGCCGAAGTCGGAGGAATATCATTTGTCGTTAGAAC  
 CAGGGCATCTAGACCTTACTCTTCTACTCTCCCTGTATATCTCAAGGGAGGACCAAGGGCAAGGC  
 GCTGAGCTTCGGGAAGAAACTTGTGAAGCCAAATGAAACCAAAACATATTCTTGGAAACCTTCTCAGGC  
 CACATGGTCTCCGAGGAGGAACTTGTGAAGCCAAATGAAACCAAAACATATTCTTGGAAACCTTCTCAGGC  
 GAGAAAGACGTGCACTCAGGCCCTCATTTGGCTCCCTCTGCTCTGTCATACATTAATACCTTCATCTCA  
 GCACACGGGACTTCAGGTAACCCCTCAGGAATTTGGCTCTGTTCTTACCTTGTCAAGACGAA  
 TCTCTGGACTTCTACCCAAACATCTGGAGGAATTCTGGAGGCCCATGCAACATCTGGAGTGGAGAC  
 CCTACCTTCAAAGGACAATCTCCTCTCATGGCTTCAAGGTTCTACATTGTGAAACTCTCCAGGA  
 CTTGTGATGGCAAGGAGTCAAGGAGTCAAGGTTCTGGGCTTCAAGGAGAATT  
 CACAGCATTCATTTCTCGCTTCACTGTTCTACGTTCAAGGAGAAGAGTCAAAAGATGGCTCTG  
 TTAATCTCTCATTCAGGGATTTCTGGGAACATCTGGCTGGAATTTGGCTTCAAGGAGGCCCATTTGGGA  
 GTAGAATGGCTTATCGGGAAACATCTGGCTGGAATTTGGCTTCAAGGAGGCCCATTTGGGA  
 AAGTCGGCAGACTCGGCTGGGCGATCTGGGCAATATGGGCTTCAAGGAGCTTCAAGGAGTGGCTAGCGGG  
 CAGTATGGGCGATGGGCAACCAAAACTTGGCGACTCTCATGGGCTTCAAGGAGCTTCAATCTGGGCA  
 ACCAAGGAACCTCTCTTGGGATTAAGGTGGACCTTGGGCCCATGAAATCTCATGGGATCAAA  
 ACCCAAGGGGCTCTGGCAAGAAATTCTCATCCTACATCTCATCCTCATATAATGCTTCTCAG  
 GTGGAGAATGGCAGGACTTCAAGGAGGAAACAGGCCGGGACCTCTGGTGTCTTCTGGGAC  
 GTGGACAGCGGGCATCAACACAAACATCTCAATCTCCCATTTGGCCGTTATTTAGAGTC  
 CATCCACTACATCTTACAGGACCAACTGGGAGGACTCTCATGGGAGTGGCCAGTGAAGACT  
 TCTGATCTGGGCTTGGGAGTGGACCTAAAGGATTAAGGCGACCAAAATTCAGGCTTCTAC  
 TTACGATATTTGGCCACGGTGGAGGCCAAAGCAAGGCCGGCTGCAATTGGAGGTGGCTCAGTAAT  
 GCTTGGGGCCACAGGCTGAATTAACCTTCAGGAATGGTTCAGAATGAACTTCTCAGAAACATTAAGG  
 GAACCCGGGCTCATCTACAGGGGAGTCAAGTCCTCTTGTACCTCTATGTACGGTCAAGGGAGTTCTG  
 ATTAGCAGCAGTCAGGATGGGCGACCAATGGACACTTCTTCTCCAGAATGGGAAAGTAAAGTATTT  
 CAGGGTAAACGGGACTCTTACACCCPTCTGGCAATAGGCTTGACCCCTGTCACACGACATAC  
 CTGGGATCAACCCCTCAGTCTGGGTCATCAATTGGCCTGCGGAATGGAGGTGTTGGGATGGCA  
 GCTTGGGACCTCTACTGA (SEQ ID NO:15)

Фиг. 14В

CS11-FL-NA

(Продолжение)

Фиг. 15А

AGTTTTCAGAAGAAAACGCACACTACTTTATAGCTGCCGTGGAACGACTCTGGGATTATGGCATG  
TCTCCAGCCTCATGCTCTAGGAATCAGGCCAGAGTGGCTCTGCTGCTCAAAAAGGT  
GTGTTTCCAGAATTCTACCGCAGGCTCATTTACCCAGCAGGCTGTACAGAGGCCAAGTCAACGAC  
CTTGGCTGCTGGGCTCATATTGACCCAGAGTGGAGATAATATCTGATGTCACCTTCTAGAAC  
CAGGCGTCAAGACCCATTCTCTCTAGCTCTGATCAGCTACGAGGAGGACCAAGACAGGGA  
GCTGAACCCAGGAAGAACTTGTGAAACCTAATGAGACCAAGACCTACTCTGGAAGGTCCAGCAC  
CATATGGCCCCAACTTAAAGATGATTCAGTGCACAGGCCCTGGCTTATTCTGAGCAGCTGGATC  
GAAAAGGTATGTCACAGGGGGTGTACGCCAGGCTTCTGGTGTGCCACAAACATACCTCATCT  
GCCACGGGGGGCAGGTACAGTCAAGAGTTGCTACACTCTCTTACAAATTGACAGAGACAAAG  
TCATGGTTATTTCAGAGAAATGGAGAGAAATTGTGCGGACCTTGCACACATTCTAGATGGAGGAC  
CCCACTTAAAGGAAATTCAGATTTCTAGCTATCATGTCATTAATGATACACTCTGCTGGT  
CTGTCATGGGCCAGGATCAGGCATTAAGGTGTTACTCTGCTAGCATGGGATCTAATGAGATA  
CACAGCATTCATTCAGTGCACAGGTTTACTGTTAGAAAGAAGGAGGAGTACAAATGGCCTC  
TACAACCTTACCGGGTGTGTTAGAGACAGTGGAGATGCTGCCAGCAAGGCCAGGATCTGGAGG  
GTGAGTGTCTTATGGGGAGCATCTGCTAGCTGTCAGTGGCCTACCCCTCTTCTGTGTCACGCAAT  
AAGTGGCAGACCCCTTGCAGCATGGCCAGGGCCACATTAGGACATTCTGAGATACTGCCAGTGG  
CAGTACGGCAGTGGCTCCAACTTGCAGACAGTGGCCTACACTACTCCGAACATCATGGCAGG  
ACCAAGGAACCTCTCTGGATTAGGTGACCTCTGCGCCCTGATCATTCACGGCATAAAA  
CAACAGGGAGCAGCAGAACATTTCATCTGTATTAGTGCAGTTATCATCATGTCACAGCTTG  
GATGGAAAGAAGTGGCAGAGTACAGGGGCAATTCTCAGAGAACACTTATGGTTTTGGGAAT  
GTGCAATTCCAGGGGATCAACAAATCATCTTCATCTCTTCTTATTCAGGGCATATTCAGGGCT  
CACCCCTACGCAATTACTCCATCAGGTCCACATTGAGAACTGATGGGGTGCACCTGATAGT  
TGTAGTATGGCCTGGGACTGGAGCTTAAAGGCCATACGGCAGTGCACAGATCAGCTGGCAGCTCTAC  
TTACCAACATGTTGCACTTGGTCCCCCTAAAGCTGGCCTGCACTGTCAGGGACCTCCTAAAT  
GCATGGCAGACCAAGGTGACAACTTCAAAAGACTGGCTCAGGTCACAGTTCAGRAGAACATGAAG  
GTAACAGGAGTGAACACCCAGGGTGTAAAAGCCTCTTACAGGATATGTAAGGAGTTCTG  
ATTTCAGTCTCCAGGAGGGACACCCAGTGGACTCTGTCCTCCAGAACGCCAAAGTGTAGGGTATT  
CAGGGAAACAGGAGTCTTACCCGGTGTAGAATAGCCTGGATGCCACCGTTGCTGACCCGCTAT  
CTGAGAAATTCTACCAACATCTGGGTCATCAGATTGCCCTCGGATGGAAGTGTCTGGCTGTGAA  
GCTCAGGAGTGTATTAG (SEQ ID NO:16)

Фиг. 15В

CS40-FL-NA

ATGCAATAGAGCTCCACCTGCTTCTGCTTGGATTCGCTTGTGCCCCAGA  
AGATACCTGGTGAGCTGATCGGACTATATCGAACAGTCTCGGCTGCT  
GTGGAGCGAACGATTTCTCTAGACTGCAAAATCTTCTTCCATCACRCCTCAGCTGTACRAA  
AAGACTCTTTGAGATTCTGGATCACCTTCAACATCGTAAGCGCACCTGGATG  
GGTCTGCTAGGCTTACCATCCTGGCTGAGGTTATGATACTGGTATTACACTAAGACATG  
GCTTCCATCTGCTACTCTGCTTCTGCTTGTATCTCTGGAAAGCTCTGAGGGAGCTGAA  
TATGATGATCAGACCTCAAGGGGGAGAAGAGATGATAAAGGCTTCTGGGAGCCATCA  
TATGCTGCGAGCTCTGAAAGAGAATGCTTCAATGCGCTCTGACCCTACTGCTTACCTACTA  
TATCTTCTGCTAGTGGCCAGTGGAAAAGACTGTAATTCTAGGCTCTATTGGACGCTACTAGTGT  
AGAGAAGGGGGAGTCTGGCCAGTGGAAAAGACACAGACCTTGCAAAATTATACACTTTGCTG  
TTTGTAGAAGGGAAAAGTGGCACTCGAACAAAGAACGACTCTTGTATCTGAGGAT  
TCGGTCTGGGCTGGCTAAATGACACAGTCAATGGTTATGTAACAGGCTCTGCCCCGGTGTG  
ATTGGATGCCACAGGAATGCTCTATTGGCATGTGATTGGATGGCACCTCTGAACTGCA  
TCAATATTCTGCGAACGGTCAACATTCTTGTGAGGACACCTGCCAGGGCTCTGGAAAATCTCG  
CCAAATACTTCTTACTGCTCAACACTTGTGACGGACTTGGAGCTTCTACTGTTTGTCA  
ATCTCTTCCACCAACATGATGGCATGGAGCTTATGTCAAAGTAGACAGCTGTCAGAGGAACCC  
CAACTACGAAATGAAAATACTGAAAGAGCCGAAGACTATGATGATGACTTACTGATCTGAAATG  
GAPGTTGCTGGTTGATGATGACAACCTCTCTTCTTCTTATCACCTGGCTGAGGAGCTTGG  
CATCTTCAAAACTCTGGGATCATCTGGCTCTGAGGAGCAGTGGGACTATGCTCCCTTACTG  
CTCGCCCCCGATGACAGAAGTTAAAAGCTAATTTGACAAATGGCCCTCAGGGATTTGGTAGG  
AAGTACAAARAAGCTGGGATTTGATGACACAGATGAAACCTTAAAGACTCTGAAGGCTTAC  
CAGPAAATCAGGATCTGGGCTTCTTACTTATGGGAGTTGGGAGACACTGTTGATTTATTT  
AAGAATCAGCAGCACCGACGATCTTAACTCATCTACCTCAGGAAACTACTGATCTGGCTCTTGTAT  
TCAAGGGAGATACCAAAAGGTGTAAGAATCTGGGAGGATTCTCAATTCTGCGAGGAGAAATATTC  
AAATATAATGGCAGACTGACTGTGAGGACGGCCAACTAAATCAGATCTGGCTGCGACCGC  
TATPACTCTGAGTTCTGGTAAATGGAGGAGGATCTAGCTTGGAGACTATTGGCCCTCTCCTCATC  
TGCTACAAAGAACTGCTGAGATCAAGAGGAAACCGAGATAATGTCAGACAAAGAGGAATGTCATCTG  
TTPTCTGTTTGTAGAGAACCGAAGCTGGTACTCTACAGAGAAATATCACAGCTTCTGCCCAT  
CCAGCTGGGAGTGGCAGCTTGGAGGATCTGGAGTCTCAAGGCTCCTACATGCGACAGCATCTG  
TATGTTTGTGATGTTGGCTGAGTTGCTGACTTGTGCTTCTCTGTTGATACATGGCTTCT  
ATTGGAGCAGACAGTGAACCTCTCTCTGCTCTCTGTTGATACATGGCTTCT  
TATGAGAACACACTCACCTCCCTTACCTTCTGAGGAAACTGCTTCTGATGAGGAAACCCA  
GGCTCTGGATCTGGGCTGCCAACACTGAGACTTGGCAACAGGGCATGCCCTTACTGAG  
GTTCTGAGTTGATGACAAAGACACTGCTGATTTATGGAGGAGACTTGTAGATATTCTGAG  
TTGCTGAGTAAACATGCCATTGAAACCAAGAGGCTTCTCCAGAATCCACCGACTCTG  
CATCAACCGGGAAATTACTGCTACTCTTCTGAGTCAAGAGGAAATGAGTACTATGATGATG  
ATATCAGTTGAAATGAGAAGGGAGATTGACATTGATGAGGATGAAATCTAGAGCCCCG  
ACCTTCAAAAGAAACACGACACTTATTTATGCTCAGTGGAGGAGCTTGGGATATTGGATG

(Продолжение)

Фиг. 16А

AGTAGCTCCCACATGTTCAAGAACAGGGCTCAGACTGGCAGTGTCCCTCAGTCAAGAACATT  
GTTTTCAGGAATTACTGAGTGGCTCTTCTTACCTACGGAGAACATAATGACCAT  
TTGGSACTCTGGGGCATATAAGACAGGGAGTGAAGATAATTCATGAGTAACTTCAGAAGT  
CAGGGCTCTGGCCATTCTTCTTACTGAGCTTATTTCTTATGAGGAAGATCAGAGGAAGGA  
GCAAGAACCTAGAAAAAAACTTCTCAAGGCTTAATGAAACCCAAAACCTACTTTTGGAAAGTGCACCAT  
CATATACTGCACCAACTAAAGATGAGTTGACTGCGAACAGGCTGCTTATTTCTGAGTCTGGACTG  
GAAAAGATACTGCTCAGCTGAGCTGATGGACCCCTTCTGCTGCGGACACATAACACTGAAGCTT  
GCTCTAGGGAGAACAGTACAGTACAGGAATTGCTCTGTTTCAACATCTTGTAGAGGCCAA  
AGCTGAGTACTCTACTGAAAAATACTGAAAAGAACATGAGGCTCTCTGCAATATCAGAGGAAAGT  
CCACCTTTAAAGAGAATTATCGCTCTCATGAGGCTCAGGAACTATGGATACACTTGCC  
TTAGTAATGGCTCAGGCTCAAAAGATTGAGTGTATCTGCTCAGCATGGCCACCATGAAAACATC  
CATTCATTTCACTTCAGTGGACATGTTCACTGTACGGAAAAAAAGGGAGTATAAAATGGCACTG  
TACAATCTCTACCCAGTGGTTTGGAGACAGTGGAAATGTACCATCCTAACGGTGGAAATTGGCG  
GGTAAATGGCTTATGGCGGAGCATACATGCTGGATGAGCACATTCTTCTGCTGTCAGC  
AAGTGTAGACTCCCTGGGAATGGCTTCTGGACACATTAGAGATTTCAGATTACAGCTTCA  
CAATATGGACAGTGGCCCCAAAGGCTGGCCAGACTTCATTTCTGGCATACATTCCTGG  
ACCAGGGACCTTTTCTGGATGGCTGGTGTGCTTGGCACCATGATTTCTGGCATAC  
ACCCAGGGTGGCGTCAAGAATTCTCCAGCTCATCTCAGTTATCATGTTATGACTCTT  
GATCGGAAGAAGTGGCAGACTTATCTGGAAATTCTTCACTGGAACTTATGTTCTTGGCAAT  
GTTGGGATCATCTGGGATAAAACACATAATTCTTAACTCCGATCATTTGCTGCAATCCTGGCTT  
CACCCAACTCATATAGCATCTGGCAGACTCTGGCATGGAGTTGGCTGGTGTG  
TGCAGCATGCATTGGGAATGGAGAGTAAAGCAATATCAGATGCAAGAGATTACTGCTTCTAC  
TTACCATTAATCTTCTGGCACCCTGTCCTTCAAAAAGCTGACTTCAACCTCAAGGGAGGACTAAT  
GCCCTGGAGACCTCAGGTGAATAAAGACAGTGGCTCAGGACTGCACTTCAAGAGAACATGAA  
GTCAGCAGGACTAACTACTGGGGACTTAAATCTCTGGCTTCAAGGACTCTTCT  
ATCTCCAGCAGTCAAGATGGCAGTCACTGCACTCTCTTCTGGAAATGGCAAAGTAAAGGTTT  
CAGGGAAATCAAGACTCTTCAACCTCTGGTGAACCTCTGAGACCCACCGTACTGACTCTG  
CTTGGCAATTTCACCCCGGAGTTGGGTCAGGACATGTCCTGGGAGGTTCTGGGCTGG  
GCACAGGACTCTACTG (SEQ ID NO:17)

Фиг. 16В

CH25-FL-NA

(Продолжение)

Фиг. 17А

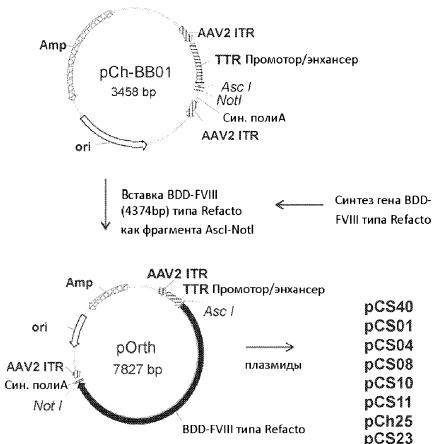
ATCAGCGTGGAGATGAAAAAAAGAAGATTTCGACATCTACGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCCGG  
 TCTTCCAGAAGAAAACCAGGCACTACTTATCAGCCGCGCTGAGCGGGCTGTGGGACTACGGCATG  
 AGCAGCAGCCCCCACGTGCTGCGGAACCGGGCCAGAGCGGAGCGCTGCCCCAGTTCAAGAAAAGTG  
 GTGTTCAAGGAATTACCGACGGCAGCTCACCCAGCCCTGTAACGGGGCGAGCTGAACGACAC  
 CTGGGGCTGCTGGGGCCCTACATCACGGCGAAGTCGAGGACAAACATCATGGTACACCTCCGAAT  
 CAGGCCAGCAGACCCCTACTCCCTACACCCAGCCTGATCAGCTACGAAGAGGACCCAGGGCAGGGC  
 CCTGAACCCCGAAGAAACTTCTGAAGCCCAAGAGACCAAGACCTACTCTGAAAGTGAGCAC  
 CACATGGCCCCAACCAAGGAGCAGACTTCGACTGCAAGGCTGCGCACACCAACACCTGAACCCC  
 GAAAACGACCTGCACTCTGACTGATTCGCCCCCTGCTGCGTGCACACCAACACCTGAACCCC  
 GCCCACGGCGCAGGTGACCGTGCAGGAATTGCGCCCTGTTCAACCATCTCGACAGAGACCAAG  
 TCTGGTACTTCACCGAGAATATGGAACGGAACTTCAGAGCAGGACATCTGCAACATCCAGATGGAAGAT  
 CCTACCTTCAAAGAGAACTTCACCGTICACCGCATCAACCGTACATCAAGGACACCCCTGCCU'GC  
 CTGGTATGGCCAGGACAGAGGATCGGTGATCTGCTGTCATGGCAGCAACGAGAAATATC  
 CACAGCATGCACTTCAGGGCACGTGTCACCGTGAAGGAAGAAAGAGTACAAGATGCCCTG  
 TACAACCTGTAACCCCGTGTGAGACCGTGGAGATGCTGCCAGCAAGGCCGGCATTCGGCG  
 GTGGAGTGTCTGATCGGAGCACCTGCATGGAGACCCCTGTTCTGTTGATACAGAAC  
 AAGTGGCAGACCCCCCTGGCATGGCACCGGGCACATCCGGACTTCAGCATACCGCCTCCGGC  
 CAGTACGCCACTGGCCCCAAGCTGGCCGGCTGCACTACAGGGCAGCATCAACGCTGGTCC  
 ACCAAAGGCCCTTCAAGCTGGATCAAGGCTGACTGCCCCCTATGATCATCCACGGCATTAAG  
 ACCCAGGGGCCAGGAGGTTCAAGCAGGCTGACATGAGCTGAGGACCTGATGGTGTCTGCCAAC  
 GACGGCAAGAAGTGGCAGACCTACGGGGCAACAGCACCCGGACCCCTGATGGTGTCTGCCAAC  
 GTGGACAGCAGGGCATCAAGCACAACTTCAACCCCCCATCATGCCGGTACATCCGGCTG  
 CACCCCAACCACTACAGCATCAACCCCTGCGGATGGAACCTGATGGCTGCGACCTGAACTCC  
 TGCAGCATGCTCTGGCATGAAAGCAAGGCCCATCAAGCAGGCCAGATCACGCCAGCAGCTAC  
 TTICACCAACATCTTCCCACCTGGTCCCCCTCAAGGCCAGGCTGCACCTGCCAGGGCCGTCAAC  
 GCGTGGGGCCTCAGGTGAAACACCCAAAAGAATGGCTGAGGACTTCAAGAAAACCATGAAG  
 GTGACCCGGCTGACCAACCAAGGGTGAAGAAGGCTGACAGGATGTAAGTGAAGAGTTCTG  
 ATCAGCAGCAGCAGGACGGCCACACTGAGCTGTTTCAGAACGCCAGGTGAAGATGTTTC  
 CAGGGCAACCCAGGACTCTTCACCCCCGGGGTGAACVCCCTGGAGACCCCCCCTGCTGACCCGCTAC  
 CTGGGAGATCCACCCCCAGTCTGGGTGCACCAAGATGCCCTGAGGATGGAAGTGTGGGATGTGAG  
 GCCCAGGATCTGACTGA (SEQ ID NO:18)

Фиг. 17В

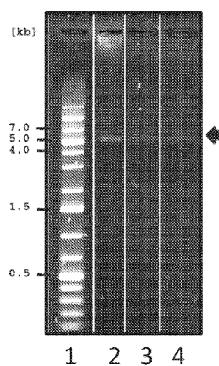
FVIII-FL-AA

mqielsticff lcllrfcfsa trryylgave lswdymqsd1 qelpvdarfp prvpksfpfn  
 tsvyykklf veftdhlni skprppwmgl lgptiqaevy dtvvitlknm ashpvslbav  
 gvsyskaseg aeyddqtsqr ekedzkfpvq qshyyvqvl kenpmasdp lcltysish  
 vdlykdlinsq ligalivcres galaketgt lhfiflifav fdeqkswhse tknslmgdrd  
 aasanawpkm htvngvnrsl pglighcrk svyhwigmg tipevhwsifl eghftlvrnh  
 rqaesleipi tfltaqfiml digqflifc issqhqdmg ayykvdscke epqirmknme  
 esedydddlt dsemduvrfd ddnspsfici rswakkhpkt wwyiaaeee dwdyapivla  
 pddrsyksqy lnnpgqrqkrykykvrifmay tdfetktrae iqpesqilp llyjevgdlt  
 liifknhqasc pnyiyphqit dvrplysrrl pkqvhkldf pilpeifky kwtvtdedp  
 tksdprcltr yyssfvnumer dlasglipq llycikesvdq rgnqimsdkr nvlifsvide  
 nrswylteni qrflipapqvg qldpefqas nimhsingy fdlslqisvcl hevaywyls  
 igactdfls1 ffasygtfkhk myedt1if pfsetvfma menpglwlg chnsdfnrng  
 mtalkvssc dkntgyyed syedisayl skhnnaieprs fsqnsrhbst rkqkfnatni  
 pendieltop wfahrtppmk lgnvsssd1 mlrlrqspth gislsd1qea kyetfsdpps  
 pgaidnsnsl semthfrpq1 lhnsgdmvftp esqlqirlnl klgtaatel kklodfkvsst  
 snnlistips dnlalaqtntt sstlgppsmv hydsqldtl fgkkssplte sggplslsee  
 nndsklesg lnnsgesswq knvssesar lfkqkhrqg alitkdnalf kvsisliktn  
 ktnsnssatn kthidopss1 lenspsvwgn ilesadefkk vplihdrmi mdknatralr  
 nhmsnktss knmemvqkk egiippdaq1 pdmsffkmf1 lpesarwigr thgnslnsg  
 egpspkqlvs lkiqekvegg nfiseknkv vglgeftkdv gikemvfpss rnlftlnldn  
 lhenrhngc kkiqeeiekk etligenvvl pgjibtvjgtk nfmknlflis trqivwegsyd  
 gayapvlqdf rslndstnrt kkhthafssk geeeengleglq nqtkqiveky acttrispmnt  
 sqqnvtqrs kralqktrplq lesetekri vddtctqws knmkhlptst ltqidyneke  
 kgaitqsp1s dcltrhsip qarsplpia kvssfpsipr iytrvlfqd nss1paasy  
 rkkdsgvqves shflqgakkn nslalittle mtqdqrevs lqtsatnvt ykkvntvlp  
 kpdpltsqk veillpkvhiy qkdlfpets ngspghldv egsligteg aikwnearnp  
 gkvpfhrvat essaktpsl ldplawdhy qtpipkewk sgekspexta fkkkdtlls  
 nacesnhaiia ainegnqkpe levttwakgrr tericsnpp vikrhqreit rtflqsdgee  
 idydtisive mkkkedfiy edengspsrf qktrhryfia averiwdym sssphvlnr  
 aqsdsvpqfk kvvfgeftdg sftqplyrge inehlglp yiraevdmi mvtfrnqask  
 pystfylis yeedqrqae prkhnfvkne tktvfwkvqf hmaptkdefd ckawayfsdv  
 dlekdvhsgl igplvchtn llnpahgrv tvgefallft ifdetkswyf tennerncra  
 pcnigmedpt fkenyrfhai ngyimdtlpg lvmqddqrrir wylsmgsne nihsihfsgn  
 vftvrrkkeye kmalylypg vftewm1ps kagiwrvei igejhlgams tlfivysnkc  
 qtp1gmasgh irdfqitqasg qyggwaphila rlhyssina wstkepfswi kvdlapmii  
 hglitqqarq xfaslyisqf liimyldgkk wqtyrgrntg tlmvffgnvd ssgikhni1f  
 ppilaryirl hptysirst lrmelmgcdl nscsmpigme skaisdaqit assyftnma  
 twspskarlh lqgrsnaawrp qvnnpkewlq vdfqtkmktv gvttqgvks1 ltsmyvkef1  
 issqqdghw tlfifqngkvk vifqgnqdsft pvvnsldpp1 ltrylrihpg swvhqialrm  
 evlgceaqdl y (SEQ ID NO:19)

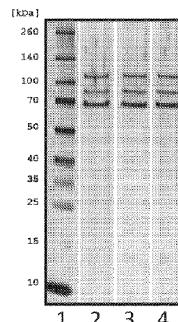
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21

CS23-FL-NA

(Продолжение)

Фиг. 22А

Фиг. 22В

CS23-FL-AA

MQIELSTCFLCLLRCFSATRKYIQLGAVELSWDYMQSDLGELPVDR' FPRVPKSFPNTSVYK  
KTLFVEFTBHLFENIAKPRPPWMLLGPTIQAELYDITVITLKNMASHFVSLHAGVSYWKASEGAEY  
DDEOTSQREKEEDKVPFGGSYTHVWVQVLKENGPMASDPLCLTYSLSHVDLRVLNLSGLIGALLVCRE  
GSLAKEKFTGLHLKFILLFVAFDGEKSWHSEITKNSLMQDRDAASARAPKHMVTHGTYVNGNNSRLPGLIGC  
HRKSVYWHVIGMGTTPVEVHSIFLEGHFTLVNHRQASLETISPITFLTAQTLIMDLQGFLFCHISSH  
QHGDMEAYVVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDELLTDSEMDVVRFDDCNSPSFIQ1RSVANKHPKTW  
VHYIAAEEEEDWYDYLAPVLAAPDPSRKSQYLNHGQPRIGRKYKVRFMAYTDEFTKTREAQHESGIL  
GPLLTYGEVGDTLIIFKNGQASRPNYIYPHGTDVRPLYSRRLPKGVHKLKD' PFGPEIFKWKWTVT  
WEIGPTKSFPCFLTRYSSFVNMERDLASGLIG' LILICYKESVQDQRQNSIMSDKRNVILESVFDENR  
SWYLTENIQRFPLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLQLSLSVCLHEVAYWYIISIGAQDFLS  
VFFSGYTFKHMKVYEDTLTLLFSGETVFMSENPDGLWILGCHNSDFRNRMGTALLKVSSCDKNTGD  
YEDYESDIASYLLSKNNAIPEFRSFSQNPPVLRKHQRREITRTLQSDQEEIDYDDT1SVEMKEDFD  
IYDEDENQNSPFSQFKKTRHYTAVERLWDYQHVFVLRNRAQSGSVPQFKEVVFQFETDGSPTQ  
PLYRGELNEHLLGLGPYTRAEEVDNIMVTFRNQASRPSFYSSLISYEEDQRGAEPRKNFVKPNET  
KTYFWKQVHIMAPTKDEDFCKAWAYSFSDVLEPKVHSGLIGPLVCTNTLNAHFRQVTVQEFALF  
FTIETETKSWWTFENMERNCRACPNCIQMEDPTFKENYRHFHAICNYIMTLPGLVMAQDQRWYRLLS  
MCNSNEINIHSFHSCHVTFVKKKEEYKALNLYN-'GFVTFVEMPLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTL  
FLVYSSNKQCPTLGMASGHIRODFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSKTEPKFSWIKVDDLLAPMI  
THGIKTQGARQKFSYLISQFIIIMYSLDGGKWWYTYRGNSTGTLMVFFFGRNVDSGGIHNIIIFNPPIIAR  
YIRLMLHGYTIRSTRMLMGCMLDNCSMPLGMESKAISDQIAITSSYFTMWFATPSKARLHLQG  
RSNARWPRQVNPKEWLQWDFQTKMVTGVTGTVQKSLSTSMYVKEFLISSSQDGHQMTLRFQNGKVK  
VFQGQNDSTPPTVVSLSDPPLTRYLTHPQSWVQ1JAERMEVLGCEAQDLY (SEQ ID NO:21)

Фиг. 23

CS23-HC-NA

Фиг. 24

CS23-LC-NA

2601-HC-NA

CS01-LC-NA

Фиг. 27

CS01Δ(760-1667) = CS01-9C1-NA

(Продолжение)

Фиг. 28А

ACCAAGGATGAGTTGACTGCAAGGCCTGGGCATACTTCTCTGATGTGGACCTGGAGAAAATGTGCACTCT  
 GGCCTGATTGGCCCACTCTGGTCTGCACACCCACCCCTGAAACCTGCACATGGAGGGCAAGTGACTGTG  
 CAGGAGCTTGCCTCTTCITCACCATGTTGATGAAACCAAGTGATGGFACTTCACATGAGAACATGGAGAGA  
 AACTCCAGAGCACCAGGAAACATTCAAGAATGGGAGGAGCCCACTTCAGGGAGAACATGAGGTTGCAAGGCCATC  
 AATGGCTACATCATGGACACCCCTGGCTGGCATGGACAGGACAGAGAACATGAGTGGTACCTGCTT  
 TCTATGGATCCAAATGAGAACATTCACTCCATCCTCTGGGCATGCTTCATCTGAGAAAAGAACAGAG  
 GATATACAAGATGGCCCTGTAACACCTCTACCTGGGGGTCTTGGAGACTGTTGGAGATGCGGCCCCTCCAAAGCT  
 GCAATCTGGAGGGTGGAAATGCTCATGGGGAGGACCTGCACTGGCATGGTCAACCCCTGTTCTGGTGTAC  
 AGCAACAAGTGCAGACACCCCTGGGAAATGGGCTCTGGCCACATCAGGAGCTTCAGGATCATGCTCTGGC  
 CGATGATGGCCACTGGCCACCCAAACTGGCAGGCTOCACTACTCTGGCTCCATCAATGGTCAACCCAG  
 GAGCCATTCCTGGGATGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG  
 AGACAGAAATTCCTCTGTAACATCTCACAGTCACTCATGATGTTACTCTCTGGATGCGAAGAGTGCGAG  
 ACATACAGAGGAAACTCCACTGGCACCCCTCATGGCTGGTCAAGGAGCTGTGUCATCAAGCAU  
 AACATCTTCAACCCCTCCATCATGGCAGATCACATCAGGCTCACCCACCCACTACTCAATCAGATCAAC  
 CTCAGGATGGAACTGATGGGATGTCACCTGTAACCTGCTCAATGGGGATGGGAGACCAAGGGCATT  
 TCTGATGCCCCAGATCACTCATCCTCTACTTCACCAACATGTTGCCCCCTGGTCAACATCAAAGGGCAGG  
 CTGCAACCTGGGACGGGAAAGAACATGCTGGAGGACCCAGGTCAACAAACCCAAAGGAATGGCTGCAAGTGAC  
 TTCCAGAAGAACATGAAACTGACRGGGTGACRACGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG  
 ARGGAGTTCTGATCTCTCTCACACGGGACGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG  
 GTGTGAGGGCAACCCAGGACTCTTICACACCTGTTGGTGAACACTACTGGACCCCCCCTCCCTGACAAAGATAC  
 CTGACAAATTCAACCCCCAGTCTGGGTCACAGATGGCCCTGAGAACATGGAAACTGCTGGGATGTGAGGGCACA  
 GACCTGTACTGA (SEQ ID NO:26)

Фиг. 28В

CS01Δ(772-1667) - CS01-SC2-NA

ATOCAGATTGAGCTGTCACCTGCTTCTCTGCTGAGATTGCTTCTCTGCCACCAAGG  
 AGATACTACCTGGGGGCTGGAACATTCTGGACTACATGCACTGACCTGGAGAGGCTGCCT  
 GTGGATCCCAGGTTCCACCCAGACTGCCCAACTCTTCCATTCAACACCTCTGGCTCTACAAAC  
 AAGACACTTCTGGGAATTCACTGACCCACTGTTCAACATGCAAAACCCAGACCAACCTGGGATG  
 GGACTCTGGGACCCACATTCAAGGGCTGAGGTATGACACTGTGGTCACTCCCTCAAGAACATG  
 GCATCCACCCCTGTCTCTGCATGCTGGGAGTCTCATCTGGAAAGCTGTAAGGGCTGAG  
 TATGATGACAGACATCCAGAGAGAGAAAGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGATCTCACACC  
 TATGATGTCAGCTCTCAAGGAGAAATGGACCCATGECATCTGACCCACTGTCATGCACTACTCC  
 TACCTTTCTCATGTTGGACCTGGTCAAGGACCTCAACTCTGGACTCTGTTGCCCCACTGCTGGTGTGC  
 AAGGAAGGATCTGGGACCCAGGAGAAACCCAGACACTGCAAGGTTCACTTCCTGATGCAAGACAGGGATGCTG  
 TTTGATGAGGGCAAGTCTGGCACTCTGAACAAAGAACACTCCCTGATGCAAGACAGGGATGCTG  
 TCTGCCAGGGCATGGCCAAGATGCAACTCTGTAATGGCAAGGAGACTCTGCTGGACTC  
 ATGGCTGGCACAGGAATCTGTTACTGTCATGGCATGTTGGCAACCCCTGAACTGTC  
 TCCATTTCTGGGGGACACCTCTGGTCAAGGACCTGGACTCTGCTGAGGAGCTGCTG  
 ATCTCTCCACCCAGCATGATGGCATGGAGGCTATGTCAGGTTGACTCATGCCCTGAGGAACCA  
 CACCTCAAGGATGAAAGAACATGAGGGAGGCTGAGGAGGACTGATGACCTGACTGACTGAGATG  
 GATGTTGTCAGATTGATGACAACTCTCCATCTTCAGTCAAGGTCAGGTTGTCAGGAAAGA  
 CACCCCAAGGACATGGGTCAACTACATTGCTGAGGAGGACTGGGACTATGCCATGGTC  
 CTGGCCCTGATGACAGGGCTACAAGTCTAGTACCTCAACAATGGCCACAAAGAATGGAA  
 AACTACAAGAAACTCAGATCTAGGCTACACTGATGAAACCTTCAAGACAAGAGAACCTCAG  
 CATGAGCTGGGACTCTGGGACACTCTGGTATGGGAAGTGGGAGACACCCCTGCTCATCATCTC  
 AAGAAGACGGCTCCAGGCCATACACATCTACCCCACTGGCATACTGATGTCAGGCCCTGTAC  
 AGCAGGAGACTGCCAAAGGGGTTGAAACACCTCAAGGACTCTCCCATCTGCTGGAGAGATCTC  
 AAGTACAAGTGGACTGTCACTSTGGAGGATGGACCAACAAAGTCTGACCCCTGGGCTCACCAGA  
 TAATGACTCTCTTTGTGAAACATGGAGAGAGACTGGGACTCTGGACTGATTGGACACTGTCATC  
 TGCTACAGGAGTCTGTGGACCCAGAGGACACAGATCATGTCAGGAGAACAGAGAAATGTGATTCTG  
 TTCTCTGTCCTGATGAGAACATGACATGTCACCTGACTGAGAACATTCAGAGATCTG  
 CCTGGGGTCAACTGGAAAGACCCCTGAGGTTCCAGGCAAGAACATCATGCACTCCATCAATGGC  
 TATGTTGACTCTCTCCAGTCTGCTGCTGCTGCTGAGGTTGGCTACTGGTACATCTTCT  
 ATGGGGCACAAACTGACTCTCTCTCTCTGGGATACACTCTCAAGCACAAAGATGGT  
 TATGAGGACACCTGACRCTCTTCTCTCTGGGAAACTCTGTTGATGAGCATGGAGAACCC  
 GGACTGTTGAGATTGGGATGCCACAACCTGACTCTGAGAACAGGGGATGACTGCACTGCTCAA  
 GTCTCTCTGTCAGAACAGAACACTGGGACTACTATGAGGACTCTTATGAGGACATCTGCTG  
 CTGCTCAGAACAGAACATGCCATTGAGGCCAGAACAGGCTCTCTCAGAACACCCAGC  
 AGGGAGATCACAGGACACCCCTCCAGTCGACCCAGGAGAGGATTGACTATGAGAACCC  
 CTGAGATGAGAACAGGAGGACTTGAACATCTATGAGGAGGAGAACAGGACTCTCAAGATTC  
 (Продолжение)

Фиг. 29А

CAAGAAAGAGACAAGAACACTACTTCATTGCTCTGGAAAGACTGTGGGACTATGCGATGCTTCC  
TCTCCCATCTCTCCTGACGACAGGACAGCAGTCGGCTCTGCTCAGACATGCTCAGAACAGTGTCTC  
CAGAGCTTCACTGATGCGCTCATTCACCCGGCCCTCTACAGGGGGACTCAATGAGCACCTGGGA  
CTCTGGGACCATACATCAGGGCTGAGGTGGAGAACACATCATGGTGCACATTGAGAACACAGGGC  
TCAGGCCCTACAGCTTCACTTCTCCATCAGCTGTAGGAGAACACTTCTGGAAAGCTCAGAACAGGGC  
CAACAAAGAACACTTGTGAAACCCATGAGAACACAGACTTCTGGAAAGCTCAGAACAGGGC  
GCACCCACCAAGGGTGAAGTTGCAAGGGCTGGCAACTCTCTGTATGTGGACCTGGAGRAA  
GATGTCGACTCTGGCTCTGATGTCGCCACTCTGCTCTGACACACCCCTGAACCGTCGACAT  
GAGGGCAAGCTGATGTCGAGGATTTGGCTCTTCTACCATTTGTGAGAACACAGTCACTG  
TACTCTCACTGAGAACATGGRGAGAACTGCAAGGGACCATGCAACATTCAGATGGAGAACACCC  
TTCAGGAGAACACTACAGGTTCCATGCCATGTCATCATGTCACCATGAGAACACCC  
ATGGCAACAGGGACAGAACATGAGATGTCCTCTGAGAACACCCCTGGCTCTGGCT  
ATGCCACTCTGGGATGTCCTCACTGTGAGAACACAGGGATAACAGATGCCCTGTACAC  
CTCTACCTCTGGGCTCTGATGAGACTGTGGAGATGTCGCCCTTCAAGRGCGCATCTGGGGGTGGAA  
TGCTCTATGGGGGACACTGGCATGTCGCCATGTCACCTCTGCTCTCATGACCAAACTG  
CAGGGACCCCTGGGAAATGGCTCTGGCACACATCAGGGAEACTTCAGATCACTGCTCTGGCAGTAT  
GGCCAGTGGGGACCAAACTGGGCAAGGGACTCTCTGGCTCTCAATGAGTCATGGTACCAACAG  
GGGCACTCTTCTGGATCAAGGTGGACCTCTGGCACCATGATCATTCAGGGCAACAGAC  
GGGGCAAGAGAACATTCTCTCTGTCACATCTCACAGTTCATCATGTCATCTCTGGATGCG  
AGAGCTGGGACAGACATCACAGGGACACTTCAGCTGGACCCCTGGCTCTTCTGGCATGTC  
AGACTCTGGCATCTACAGCACACATCTAACCACTCTCCATGTCAGGAGAACATCATGCGTACCC  
ACCAACTCTAACATGAGTCACCCCTCAGGGATGGAATCTGATGTCAGGATGTCAGGATGTC  
ATGGGACTCTGGGAAATGGGAGAACGGCCATTCTGTCAGGATGTCAGGATGTCAGGATCTGCT  
AACATGTTCTGGCACCTGTCACCATCAAAGGGCAAGCTGCACTGTCATCTCTTCTAC  
AGACCTGGGAGAACGGGAGAACGGCCATTCTGTCAGGATGTCAGGATGTCAGGATCTGCT  
GGGTGAGAACCCAGGGGCTCAAGTCCTGCTCAGCTTCTGTCACCTCAATGAGTCAGGATGTC  
TCTCTACAGGATGGGCCACACTGGTGGACACTTCTCTGGCATGTCAGAACAGTCAAGTGT  
AACCAGGACTCTTCTACACTGTGGTGAACTCACTGAGACCCCCCTCTGACAAAGATACTTGAGA  
ATTCCCCCGAGTCCTGGTGGCAAGATGGCTGAGAACATGGGATGTCAGGAC  
GACTGACTGA  
(SEQ ID NO: 27)

Фиг. 29В

CS23Δ(760-1667) - CS23-SCI-NA

(Продолжение)

Фиг. 30А

CCAGGAAGACCTCGTGAAGCCAAACGAGACCAAGACCTACTTCTGAAAGGTGCAGCACCCACATGGCCCC  
 ACCAAGGGACGAGTTCGACTGCAAGGCTGGCCCTACTTCTCTGATGTGCAACCTGGAGAAAGGACCTGCAACAGC  
 GGCCTGATCGGCCCCCTGCGTGGTGTGCAACACCCATGAAACCCCGCCACGGCAGGTGACCGTG  
 CAGGAGTTGCGCTGTCTTCACCATCTTCGACGAGACCAAGAGCTGGTACTTCACCGAGAACATGGAGAGG  
 AACTGCAAGGGCCCCCTGCAACATCCAGATGGAGGACCCACCTTCACAGGAGAACATGGAGAGG  
 AACGGTACATCATGACACCCCTGGCTGATGCCAGGAGATCAGGTGGTATCTGCTG  
 AGCATGGCAACAGAGAACATCCACAGCATTCACGGCAGGTGACCTTCACGGTGGAGAACGGAG  
 GACTACAAAGAAGGCGCTGTACAAACCTTACCCCGGGTGTCAAGACCTGCGAGATGCTGCCACAGGCC  
 GGCATCTGGAGGGPGGAGTGCTGTGATGGCGAGCCTGCAACGGUATGAGCACCCCTGTCGTTGAG  
 AGCAACAAAGTCCAGACCCCTGGCATGGCCACATCAGGACTTCAGATCACCCCTGTC  
 CAGTACGGCAGTGGGCCCCAACGTCGGCAGGCTGACTACAGGGCAGCATCAACGGCTGGAGCACCAAG  
 GAGCCCTTCACTGGAATCAAGGGGACCTGCTGGCCCCATGATCATCACGGCATCAAGGCCAGGGGCC  
 AGGCAGAAGTTCACTGAGGCTGTACATCAGGGAGTTCATCATGTACAGGCTGGAGGGCAAGAAGTGGCAG  
 ACUTCAAGGGCAACACCCGGCCATGGCTGATGGTGTCTTCCCAACCTGCAAGCAGGGCATCAAGCAC  
 AACATCTTCACCCCCCTCATCGCCAGGTACATGGCTGCAACCCCAACCCACTACASCATCAGGAGCACC  
 CTGGGATGGAACGTATGGGCGTGCAGACCTGAGCTGAGCATGCCCTGAGGAGATGGAGAGCAAGGCCATC  
 TGTGACGCCAGAPCAGGGCAGCAGTACTTCACCAACATGTTGCCACCTGGAGGCCAGCAAGGCCAGG  
 CTGCACTGCGGCCCCACAGGGCAGGCAACGGCTGGAGGCCAGCTGGAGACACCCAAAGGGAGTGGCTGCAAG  
 TTCCAGAAGGACGGATGAGGTGAGGGTGGCGTGAACCCAGGGCGTGAAGGAGCTGCTGAGGAGATGTACGTG  
 AACGGAGTTCCATGATCAGCAGCAGCAGGACCCAGCAGTTCACCCCCGGTGTGAACAGGCTGGACCCCCCTGCTG  
 GTGAGGATCACCCCCAGAGCTGGTGCACCAAGATGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG  
 GACCTGTACTGA (SEQ ID NO:28)

Фиг. 30В

## CS23Δ(772-1667) – CS23-SC2-NA

ATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTCTGCTCTGAGGTTCTGCTTCTGCCCCAG  
 AGATACATCTGGGCCCTGGAGCTGACTCGGACTCATCGAGTCTGACCTGGCCAGCTGCT  
 GTGGAGGCCAGGTTCCCCCAGAGTGGCCRAAGAGCTTCCCTCAACACCTCAGTGGTGTAAAG  
 ARAGACCTGTTCTGAGGTTACCGACCCACTGGTCAACATGCCAAGGCCAGGCCCTGGATG  
 AGGCTGCTGGCCCCCACGCTCAGGGCAGGGTGTACGACACGGCTGGTGTAAAGAACATG  
 GCCAGCCACCCCGTGTGGCTGACGGCTGGGGTGTAGCTGAGGCTACTGGAGGCCCTGAGGGCAG  
 TATGAGGACGACCCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG  
 TACGGTGGCAGGTGCTGAAGGAGAACGGCCCATGGCCAGGACCCCTGTCGCTGACCTACAGC  
 TACCTGAGGCCACCTGTTGTAAGGGACCTGTAACCTGCTGATCGGCCCTGCTGGTGTG  
 AGGGAGGCTGGCTGCAAGGAGAACCCCTGCAAGTGTACCTGCTGCTGGCTG  
 TTGATGAGGCAAGAGCTGGCAAGTGTGACCTGATCGAGGATGCCAG  
 TCTGCCAGGGCTGGCCCAAGATGACACCCGGTGAAGGCTACTGAAACAGGGCTGGCCGCTG  
 ATCGGTGCAAGGGAGCTGCTGTAACCTGGCACTGATGGGATGGGACCCGGGAGGAGGAG  
 AGCATCTCTGGAGGAGCCACCTCTGGTGAAGGACACAGGGAGGAGGAGGAGGAGGAG  
 CCCATCACCTCTGACCCGGACGGCTGCTGATGGACCTGGCCAGTTGCTGTCG  
 ATCAGAGCACCAGCACGACGGCATGGGGCTACGTGAAGGGAGGAGCCTGGCCGAGGGAG  
 CAGCTGAGGATGAGGACACGGAGGGCCAGGAGCTGATGAGGAGCTGGAGAT  
 GACGTGGTGGGTTGATGATGACACACCCAGCTTACATCCAGATCAGGTGTGGCCCAAGGAG  
 CACCCCAAGACCTGGGTGACTACATCGCCGGAGGGAGGAGCTGGAGTACGCCCTGGTG  
 CTGGGCCCCGAGGAGGAGCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG  
 AAGTACAAGAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG  
 CACGAGTCTGGCATCTGGGCCCTGCTGTACGGCGAGGTGGGAGACCCCTGCTGATCATTC  
 AAGAACCCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG  
 AGCAGGGAGGCTGGCCAGGGCTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG  
 AAGTACAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG  
 TACTACAGCAGCTCTGTAACATGGAGGGAGGAGCTGGCTCTGGCTGATGCCCTGGTGT  
 TGCTACAAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG  
 TTCTCTGTTGATGAGGAGGAGCTGTAACGGAGGATCTGACGGAGGAGGAG  
 CCGCCGGCGTGCAGCTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG  
 TACGTGTTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG  
 ATCGGGCCCCAGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG  
 TACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG  
 GGCCTGTTGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG  
 GTCAGAGGCTGGGAGAAGAACCCGGCGACTACTAGGAGGAGGAGGAG  
 CTGCTGAGCAAGAACACCCCATGAGGCCAGGAGCTTACGGAGAACATCAGGCC  
 TAC

(Продолжение)

Фиг. 31А

AGGGAGATCACCAAGGACCAACCTOCAGAGCCGACCCAGGAGATCCACTATGATGACACCATCAGC  
 GTGGAGATGAAAGAAGGAGACTTCGACATCTRCGACGAGGACCGAGRACCRGAGCCCCAGGAGTTG  
 CAGAAGAAGACCAAGGCACTACTTCATCGCCCGCGTGGAGAGGCTGTGGACTATGGCATGAGCAGC  
 AGCCCCACGTGCTGAGGAAACAGGGCCAGAGGGCAGCTGGCCAGTTCAGAAAGGTGGTGTTC  
 CAGGAGTTACCCGACCGCAGCTTCACCCAGGCTGTACAGAGGGAGCTGAACGAGCACCTGGGC  
 CTGCTGGCCCTACATCAGGGCGAGGTGAGGAAACATCATGGTGACCTTCAGGAACCAAGGCC  
 AGCAAGCCCTACAGCTTACACGACGCTGATCAGGCTACAGAGGGAGCCAGGGCAGGGCCAG  
 CCCAGGAAGAACCTTGTGAAAGCCCAACGAGACAAGAACCTACTTCAGAAAGTGTGACAGCACACATG  
 GCCCCAACAAAGACCGAGTTGACTGCAAGGCTGACTTCTCTGATGTGACCTGGAGAG  
 GACCTGACAGCGGCTGATCGGCCCCCTGCTGGTGTGCAACACCAACACCTGAACCCGCCCCAC  
 GGCAGCAGGTGAGGAGTTGGCCCTGTTCTACCATCTTGACGAGACCAAGAGTGG  
 TACTTCACCGAGAACRTGGAGAGGAACTGAGGGCCCCCTGCAACATCCAGATGGAGGACCCACC  
 TTCAAGGAGAACTACAGGTTCCACGCCATCAACGGCTACATCATGGACACCTGCCCCGGCTGGTG  
 ATGGCCAGGACCCAGGATCAAGTGTGATCTGCTGAGGATGGGCAAGAACATCCACACG  
 ATCCACTTCAGCGGCCCCACTGTTGAGGAGTCTGAGGAGAACAGGAGTCAAGATGGCCCTGTACAAAC  
 CTGTAACCCGGCTGTTGAGGACCGTGGAGATGCTGCCCCAGGCAAGGGCGCATCTGGAGGCTGGAG  
 TGCCTGATCGGGAGGACCTGACGCCGCGCATGAGCACCCCTGTTCTGGTGACAGAACAGTGC  
 CAGACCCCCCTGGCATGCCAACCGGCCCCACATCAGGGAGCTTCCAGATCACCGGCTCTGGCCACTAC  
 GGCAGTGGCCGCCCCAACGTGGCAGGCTGACTACAGGCCACTCATCATGTAAGGCTGGACAGG  
 GAGGCTTCAGCTGGATCAAGGTTGGACCTGCTGGCCCCATGATCATCCACGGCATCAAGACCCAG  
 GCGCCAGGGCAAGGTTAGCAGCAGCTGTCACATCAGGCCACTCATCATGTAAGGCTGGACAGG  
 AAGAAGTGGCAGACCTACAGGAGCACCCCTGGGGCAACAGCACCCGACCCCTGATGGTGTCTGGCAACGTGGAC  
 ACCAGGGCATCAAGCACACATCTTCAACCCCTCATCATCCCAAGGCTACATCAGGCTGCACCC  
 ACCUCACTACAGGATCACGGAGCACCCCTGGGGATGUAACCTGATGGGCTGGGACTGAAACAGCTGAGC  
 ATGCCCTTGGGATGAGAAGGUAACCTCTGACCCCCAGATCACCCGACGAACTTACTTCACC  
 AACATGTTGGCACCTGGAGCCCCAGCAAGGCTGCACTTGAGGGCAAGGAAACGGCTGG  
 AGGCCCCAGGTGAAACACCCCCAAGGAGTGGCTGCAAGGACTTCCAGAAGGACATGAAGGTTGACC  
 GCGTGAACCAACCCAGGGCTGAAGAGCCCTGCTGACCCAGGAGCATGACGTGAAGGAGTTCTGATCAGC  
 AGCAGCCAGGACGGCCACCGAGTGAACCCCTGTTCCAGAACGGCAAGTGAAGGTTGCAAGGGC  
 AACCAAGGACAGCTTCACCCCCGTGCTGAACAGGCTGGACCCCTGCTGACCAAGGTATCTGAGG  
 ATCCACCCCAAGAGTGGTGCACCAAGATGCCCTGAGAAATGGAAGTGCTGGATGCGAGGCCCCAG  
 GACCTGTAATG (SEQ ID NO:29)

Фиг. 31В



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2