

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 044115

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.24

(21) Номер заявки
201691111

(22) Дата подачи заявки
2015.01.09

(51) Int. Cl. A61K 38/36 (2006.01)

(54) ХИМЕРНЫЕ БЕЛКИ ФАКТОРА VIII И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 61/926,226; 61/988,104

(32) 2014.01.10; 2014.05.02

(33) US

(43) 2017.01.30

(86) PCT/US2015/010738

(87) WO 2015/106052 2015.07.16

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
БИОВЕРАТИВ ТЕРАПЬЮТИКС
ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Чхабра Экта Сет, Лю Туньяо (US)

(74) Представитель:
Строкова О.В. (RU)

(56) US-A1-20110183907

US-A1-20120289468

WO-A1-2013122617

US-A1-20090192076

SCHELLENBERGER et al. "A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner," Nature Biotechnology, 15 November 2009 (15.11.2009), Vol. 27, No. 12, Pgs. 1186-1192. entire document

(57) В настоящем изобретении предложен химерный белок, содержащий первый полипептид, который содержит белок FVIII и первую константную область ИГ или ее часть, и второй полипептид, который содержит белок ФВ, содержащий домен D' и домен D3 ФВ, последовательность XTEN, имеющую длину менее 288 аминокислотных остатков, и вторую константную область ИГ или ее часть, причем первый полипептид и второй полипептид соединены друг с другом. Изобретение включает нуклеотиды, векторы, клетки-хозяева, способы использования химерных белков.

044115

B1

044115

B1

Ссылка на перечень последовательностей, поданный в электронном виде

Полное содержание списка последовательностей, поданного в электронном виде в текстовом файле формата ASCII (название: 2159_441PC02_SequenceListing_ST25.txt; размер: 823500 байт; дата создания: 9 Января, 2015, включено в настоящий документ посредством ссылки.

Уровень техники

Гемофилия А - это нарушение свертываемости крови, вызываемое дефектами гена, кодирующего фактор свертывания крови VIII (FVIII), и поражающее 1-2 из 10000 новорожденных мальчиков. Graw et al., Nat. Rev. Genet. 6(6): 488-501 (2005). Пациентов с гемофилией А можно лечить путем инфузий очищенного или рекомбинантного FVIII. Все коммерчески доступные продукты FVIII, однако, как известно, имеют период полураспада около 8-12 ч, что требует частого внутривенного введения пациентам. См. Weiner M.A. и Cairo, M.S., Pediatric Hematology Secrets, Lee, M.T., 12. Disorders of Coagulation, Elsevier Health Sciences, 2001; Lillicrap, D. Thromb. Res. 122 Suppl 4:S2-8 (2008). Кроме того, был испробован ряд подходов, с целью продлить период полувыведения FVIII. Например, разрабатываемые подходы к продлению периода полувыведения факторов свертывания крови включают пегилирование, гликопегилирование и конъюгации с альбумином. См. Dumont et al., Blood. 119(13): 3024-3030 (опубликовано онлайн 13 января 2012 года). Тем не менее, по данным литературы, разрабатываемые в настоящее время препараты FVIII длительного действия, независимо от использованного метода белковой инженерии, имеют ограниченные периоды полувыведения - всего лишь до около 1,5-2 ч в доклинических исследованиях на животных моделях. См. там же. Согласно результатам получены и у людей; например, сообщалось, что использование rFVIII-Fc увеличивает период полувыведения максимум в около 1,7 раза по сравнению с таковым препарата ADVATE® у пациентов с гемофилией А. См. там же. Таким образом, несмотря на незначительные улучшения, увеличение периода полувыведения может указывать на наличие других ограничивающих факторов T_{1/2}. См. Liu, T. et al., 2007 ISTH meeting, abstract #P-M-035; Henrik, A. et al., 2011 ISTH meeting, abstract #P=MO-181; Liu, T. et al., 2011 ISTH meeting abstract #P-WE-131.

Период полувыведения плазменного фактора фон Виллебранда (ФВ) составляет около 16 часов (варьируя от 13 до 18 ч). Goudemand J, et al., J Thromb Haemost 2005;3:2219-27. На период полувыведения ФВ может влиять ряд факторов: профиль гликозилирования, ADAMTS-13 (дезинтегрин и металлопротеаза с тромбоспондиновым мотивом-13) и различные мутации в гене ФВ.

В плазме 95-98% FVIII циркулирует в тесном нековалентном комплексе с полноразмерным ФВ. Образование этого комплекса важно для поддержания надлежащих плазменных уровней FVIII in vivo. Lenting et al., Blood. 92(11): 3983-96 (1998); Lenting et al., J. Thromb. Haemost. 5(7): 1353-60 (2007). Полноразмерный FVIII дикого типа в основном представлен в виде гетеродимера, состоящего из тяжелой цепи (молекулярная масса - 200 кДа) и легкой цепи (молекулярная масса - 73 кДа). При активации FVIII путем протеолиза в позициях 372 и 740 тяжелой цепи и позиции 1689 легкой цепи ФВ, связанный с FVIII, отщепляется от активированного FVIII. Активированный FVIII вместе с активированным фактором IX, кальцием и фосфолипидом ("теназный комплекс") индуцирует активацию фактора X, образуя тромбин в больших количествах. Тромбин, в свою очередь, расщепляет фибриноген с образованием растворимых мономеров, которые затем спонтанно полимеризуются, образуя растворимый фибриновый полимер. Тромбин также активирует фактор XIII, который совместно с кальцием перекрестно сшивает и стабилизирует растворимый фибриновый полимер, образуя перекрестно-связанный (нерастворимый) фибрин. Активированный FVIII быстро выводится из кровообращения путем протеолиза.

В связи с необходимостью частого введения и неудобствами, обусловленными схемой введения, все еще существует потребность в разработке препаратов FVIII, требующих менее частого введения, т.е. препарата FVIII, период полувыведения которого превышает вышеупомянутое 1,5-2-разовое ограничение.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении предложен химерный белок, включающий (i) первый полипептид, состоящий из белка фактора VIII ("FVIII"), слитого с первой константной областью иммуноглобулина ("ИГ") или ее частью, и (ii) второй полипептид, состоящий из белка фактора фон Виллебранда ("ФВ"), который включает домен D' и домен D3 ФВ, слитого со второй константной областью ИГ или ее частью посредством расположенной между ними последовательности XTEN, отличающийся тем, что последовательность XTEN содержит менее 288 аминокислотных остатков, и отличающийся тем, что первый полипептид связан или соединен со вторым полипептидом. Определенные варианты реализации изобретения включают химерный белок согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что последовательность XTEN во втором полипептиде состоит из аминокислотной последовательности длиной от 12 до 287 аминокислот.

Также раскрыт химерный белок согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что химерный белок демонстрирует более продолжительный период полувыведения по сравнению с соответствующим слитым белком, содержащим первый полипептид и второй полипептид, в котором второй полипептид в составе слитого белка включает последовательность XTEN, содержащую по меньшей мере 288 аминокислот. Некоторые варианты реализации изобретения включают последовательность XTEN AE288, содержащую по меньшей мере 288 аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения AE288 представляет собой последовательность SEQ ID NO: 8.

Также раскрыт химерный белок согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что последовательность XTEN второго полипептида содержит около 36, около 42, около 72 или около 144 аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность XTEN второго полипептида выбрана из AE42, AE72, AE144, AG42, AG72 или AG144.

Некоторые варианты реализации изобретения включают химерный белок согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что последовательность XTEN второго полипептида выбрана из

SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11,

SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 57; SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 58; SEQ ID

NO: 59; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 60; SEQ ID NO: 61; SEQ ID NO: 62; или SEQ ID NO:

63.

В определенных вариантах реализации изобретения первый полипептид дополнительно содержит вторую последовательность XTEN, которая связывает белок FVIII с первой константной областью ИГ или ее частью. Также раскрыт химерный белок согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что первый полипептид содержит третью последовательность XTEN, встроенную в один или более сайтов встраивания в пределах белка FVIII. В некоторых вариантах реализации изобретения первый полипептид дополнительно содержит вторую последовательность XTEN, встроенную в один или более сайтов встраивания в пределах белка FVIII. В определенных вариантах реализации изобретения первый полипептид содержит третью последовательность XTEN, которая связывает белок FVIII с первой константной областью ИГ или ее частью.

Также раскрыт химерный белок согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что вторая последовательность XTEN, третья последовательность XTEN или вторая и третья последовательности XTEN, каждая независимо от других, выбраны из AE42, AE72, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288 и AG144. В некоторых вариантах реализации изобретения вторая последовательность XTEN, третья последовательность XTEN или вторая и третья последовательности XTEN, каждая независимо от других, выбраны из

SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID

NO: 11, SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 54; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 18;

SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 57; SEQ ID NO: 58; SEQ ID

NO: 59; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 60; SEQ ID NO: 61; SEQ ID NO: 62; или SEQ ID NO:

63.

В определенных вариантах реализации изобретения вторая последовательность XTEN, третья последовательность XTEN или и вторая, и третья последовательности XTEN, каждая независимо от других, представляют собой AE288 или AG288. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность XTEN во втором полипептиде слита со второй константной областью ИГ или ее частью посредством линкера. В определенных вариантах реализации изобретения линкер представляет собой расщепляемый линкер.

Некоторые варианты реализации изобретения включают химерный белок согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что линкер поддается расщеплению протеазой, выбранной из фактора XIa, фактора XIIa, калликреина, фактора VIIa, фактора IXa, фактора Xa, фактора IIa (тромбина), эластазы 2, гранзима В, протеазы вируса табачной гравировки (TEV), энтерокиназы, протеазы 3С, сортазы А, матриксной металлопротеазы-12 (MMP-12), MMP-13, MMP-17 и MMP-20. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер поддается расщеплению фактором IIa (тромбином).

Также раскрыт химерный белок согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что линкер содержит один или более сайтов расщепления, содержащих аминокислотную последовательность, выбранную из

RRRR (SEQ ID NO: 102), RKRRKR (SEQ ID NO: 103), RRRRS (SEQ ID NO: 104), TQSFNDFTR (SEQ ID NO: 1), SVSQTSKLTR (SEQ ID NO: 3), DFLAEGGGVR (SEQ ID NO: 4), TTKIKPR (SEQ ID NO: 5), LVPRG (SEQ ID NO: 6), ALRPR (SEQ ID NO: 7), KLTRAET (SEQ ID NO: 121), DFTRVVG (SEQ ID NO: 122), TMTRIVGG (SEQ ID NO: 123), SPFRSTGG (SEQ ID NO: 124), LQVRIVGG (SEQ ID NO: 125), PLGRIVGG (SEQ ID NO: 126), IEGRTVGG (SEQ ID NO: 127), LTPRSLLV (SEQ ID NO: 128), LGPVSGVP (SEQ ID NO: 129), VAGDSLEE (SEQ ID NO: 130), GPAGLGGA (SEQ ID NO: 131), GPAGLRGA (SEQ ID NO: 132), APLGLRLR (SEQ ID NO: 133), PALPLVAQ (SEQ ID NO: 134), ENLYFQG (SEQ ID NO: 135), DDDKIVGG (SEQ ID NO: 136), LEVLFGQP (SEQ ID NO: 137), LPKTGSES (SEQ ID NO: 138), DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSF (SEQ ID NO: 88) и IEPRSF (SEQ ID NO: 194).

В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит последовательность TLDPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEEK (SEQ ID NO: 146). В некоторых вариантах реализации изобретения сайты расщепления содержат аминокислотную последовательность LVPRG (SEQ ID NO: 6). В других вариантах реализации изобретения сайт расщепления содержит аминокислотную последовательность IEPRSF (SEQ ID NO: 194). В еще одних вариантах реализации изобретения сайт расщепления содержит аминокислотную последовательность IEPRSF (SEQ ID NO: 194), причем сайт расщепления не представляет собой полноразмерную область α2 белка FVIII. В некоторых вариантах реализации изобретения сайт расщепления содержит фрагмент области α2 белка FVIII, содержащий по меньшей мере последовательность IEPR (SEQ ID NO: 200). В других вариантах реализации изобретения сайт расщепления содержит фрагмент области α2 белка FVIII, содержащий по меньшей мере последовательность IEPR (SEQ ID NO: 200), причем сайт расщепления не представляет собой полноразмерную область α2. В определенных вариантах реализации изобретения сайт расщепления поддается расщеплению в тесте на гидролиз тромбином, как предложено в настоящем документе или известно в данной области техники.

Некоторые варианты реализации изобретения включают химерный белок согласно описанию в настоящем документе, в котором первая константная область ИГ или ее часть содержит первый фрагмент Fc и/или вторая константная область ИГ или ее часть содержит второй фрагмент Fc. В некоторых вариантах реализации изобретения первая константная область ИГ или ее часть и вторая константная область ИГ или ее часть продлевают период полувыведения химерного белка. В некоторых вариантах реализации изобретения первый полипептид и второй полипептид слиты посредством линкера. В определенных вариантах реализации изобретения первый полипептид и второй полипептид слиты посредством процессируемого линкера. В некоторых вариантах реализации изобретения первая константная область ИГ или ее часть соединена со второй константной областью ИГ или ее частью. В определенных вариантах реализации изобретения первая константная область ИГ или ее часть соединена со второй константной областью ИГ или ее частью ковалентной связью. В некоторых вариантах реализации изобретения ковалентная связь представляет собой дисульфидную связь.

Также описан химерный белок, включающий каждую из нижеприведенных формул (a)-(hh):

- (a) FVIII-F1:F2-L2-X-L1-V;
- (b) FVIII-F1:V-L1-X-L2-F2;
- (c) F1-FVIII:F2-L2-X-L1-V;
- (d) F1-FVIII:V-L1-X-L2-F2;
- (e) FVIII-X2-F1:F2-L2-X1-L1-V;
- (f) FVIII-X2-F1:V-L1-X1-L2-F2;
- (g) FVIII(X2)-F1:F2-L2-X1-L1-V;
- (h) FVIII(X2)-F1:V-L1-X1-L2-F2;
- (i) F1-X2-F1:F2-L2-X1-L1-V;
- (j) F1-X2-F1:V-L1-X1-L2-F2;
- (k) V-L1-X-L2-F2-L3-FVIII-L4-F1;
- (l) V-L1-X-L2-F2-L3-F1-L4-FVIII;
- (m) F1-L4-FVIII-L3-F2-L2-X-L1-V;
- (n) FVIII-L4-F1-L3-F2-L2-X-L1-V;
- (o) FVIII-L4-F1-L3-V-L1-X-L2-F2;
- (p) FVIII-L4-F1-L3-F2-L2-X-L1-V;
- (q) F2-L2-X-L1-V-L3-F1-L4-FVIII;
- (r) F2-L2-X-L1-V-L3-FVIII-L4-F1;
- (s) V-L1-X1-L2-F2-L3-FVIII(X2)-L4-F1;
- (t) V-L1-X1-L2-F2-L3-F1-L4-FVIII(X2);
- (u) F1-L4-FVIII(X2)-L3-F2-L2-X1-L1-V;
- (v) F-L4-FVIII(X2)-L3-V-L1-X1-L2-F2;
- (w) FVIII(X2)-L4-F1-L3-V-L1-X1-L2-F2;
- (x) FVIII(X2)-L4-F1-L3-F2-L2-X1-L1-V;
- (y) F2-L2-X1-L1-V-L3-F1-L4-FVIII(X2);
- (z) F2-L2-X1-L1-V-L3-FVIII(X2)-L4-F1;
- (aa) V-L1-X2-L2-F2-L3-FVIII-L4-X2-L5-F1;
- (bb) V-L1-X2-L2-F2-L3-F1-L5-X2-L4-FVIII;
- (cc) F1-L5-X2-L4-FVIII-L3-F2-L2-X2-L1-V;
- (dd) F1-L5-X2-L4-FVIII-L3-V-L1-X2-L2-F2;
- (ee) FVIII-L5-X2-L4-F2-L3-V-L1-X1-L2-F1;
- (ff) FVIII-L5-X2-L4-F2-L3-F1-L2-X1-L1-V;
- (gg) F1-L2-X1-L1-V-L3-F2-L4-X2-L5-FVIII; или
- (hh) F1-L2-X1-L1-V-L3-FVIII-L5-X2-L4-F2;

где V представляет собой белок ФВ, содержащий домен D' и домен D3, X или X1 представляет собой первую последовательность XTEN, содержащую менее 288 аминокислот, X2 представляет собой вторую последовательность XTEN, FVIII содержит белок FVIII, FVIII(X2) включает белок FVIII со второй последовательностью XTEN, встроенной в один или более сайтов встраивания в пределах белка FVIII, F1 представляет собой первую константную область ИГ или ее часть, F2 представляет собой вторую константную область ИГ или ее часть, L1, L2, L3, L4 или L5 представляет собой необязательный линкер, (-) представляет собой пептидную связь и (:) представляет собой ковалентную или нековалентную связь.

Некоторые варианты реализации изобретения включают химерный белок согласно описанию в на-

стоящем документе, отличающийся тем, что X или X1 состоит из аминокислотной последовательности длиной от 12 до 287 аминокислот.

В определенных вариантах реализации изобретения химерный белок согласно описанию в настоящем документе демонстрирует более продолжительный период полувыведения по сравнению с соответствующим химерным белком, включающим в себя приведенную формулу, с тем исключением, что X или X1 представляет собой AE288. В некоторых вариантах реализации изобретения AE288 представляет собой SEQ ID NO: 8.

Некоторые варианты реализации изобретения включают химерный белок согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что X или X1 в формуле содержит около 36, около 42, около 72 или около 144 аминокислот. В определенных вариантах реализации изобретения X или X1 в формуле выбрана из AE42, AE72, AE144, AG42, AG72 или AG144. В некоторых вариантах реализации изобретения X или X1 в формуле выбрана из

SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 57; SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 60; SEQ ID NO: 61; SEQ ID NO: 62; или SEQ ID NO: 63.

В определенных вариантах реализации изобретения X2 содержит аминокислотную последовательность длиной по меньшей мере около 36 аминокислот, по меньшей мере около 42 аминокислот, по меньшей мере около 144 аминокислот, по меньшей мере около 288 аминокислот, по меньшей мере около 576 аминокислот, по меньшей мере около 864 аминокислот. В определенных вариантах реализации изобретения X2 выбрана из AE42, AE72, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288 и AG144. В некоторых вариантах реализации изобретения X2 выбрана из

SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 54; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 57; SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 60; SEQ ID NO: 61; SEQ ID NO: 62; или SEQ ID NO: 63.

В определенных вариантах реализации изобретения X2 представляет собой AE288 или AG288.

Также раскрыт химерный белок согласно описанию в настоящем документе, содержащий X или X1 и/или X2, который демонстрирует более продолжительный период полувыведения по сравнению с химерным белком, не содержащим X или X1 и/или X2. В некоторых вариантах реализации изобретения L1 и/или L2 представляет собой расщепляемый линкер. В определенных вариантах реализации изобретения L4 и/или L5 представляет собой расщепляемый линкер. В определенных вариантах реализации изобретения линкер поддается расщеплению протеазой, выбранной из фактора XIa, фактора XIIa, калликреина, фактора VIIa, фактора IXa, фактора Xa, фактора IIa (тромбина), эластазы 2, гранзима B, протеазы TEV, энтерокиназы, протеазы 3C, сортазы A, MMP-12, MMP-13, MMP-17 и MMP-20. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер поддается расщеплению фактором IIa (тромбином).

Некоторые варианты реализации изобретения включают химерный белок согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что линкер содержит один или более сайтов расщепления, содержащих аминокислотную последовательность, выбранную из

RRRR (SEQ ID NO: 102), RKRRKR (SEQ ID NO: 103), RRRRS (SEQ ID NO: 104), TQSFNDFTR (SEQ ID NO: 2), SVSQTSLKTR (SEQ ID NO: 3), DFLAEGGGVR (SEQ ID NO: 4), TTKIKPR (SEQ ID NO: 5), LVPRG (SEQ ID NO: 6), ALRPR (SEQ ID NO: 7), KLTRAET (SEQ ID NO: 121), DFTRVVG (SEQ ID NO: 122), TMTRIVGG (SEQ ID NO: 123), SPFRSTGG (SEQ ID NO: 124), LQVRIVGG (SEQ ID NO: 125), PLGRIVGG (SEQ ID NO: 126), IEGRTVGG (SEQ ID NO: 127), LTPRSLLV (SEQ ID NO: 128), LGPVSGVP (SEQ ID NO: 129), VAGDSLEE (SEQ ID NO: 130), GPAGLGGA (SEQ ID NO: 131), GPAGLRGA (SEQ ID NO: 132), APLGLRLR (SEQ ID NO: 133), PALPLVAQ (SEQ ID NO: 134), ENLYFQG (SEQ ID NO: 135), DDDKIVGG (SEQ ID NO: 136), LEVLFGQP (SEQ ID NO: 137) и LPKTGSES (SEQ ID NO: 138).

В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит последовательность TLDPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEEK (SEQ ID NO: 146). В определенных вариантах реализации изобретения линкер содержит аминокислотную последовательность LVPRG (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит область a1 FVIII, область a2 FVIII, область a3 FVIII или любое их сочетание. В определенных вариантах реализации изобретения линкер содержит фрагмент области a2 FVIII. В некоторых случаях фрагмент области a2 может содержать последовательность DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRFS (SEQ ID NO: 88). В еще одних вариантах реали-

зации изобретения может быть использован меньший фрагмент области a2 FVIII, включая фрагмент с последовательностью IEPRSFS (SEQ ID NO: 194). В одном конкретном варианте реализации изобретения линкер содержит аминокислотную последовательность IEPRSFS (SEQ ID NO: 194). В другом варианте реализации изобретения линкер содержит аминокислотную последовательность IEPRSFS (SEQ ID NO: 194), причем линкер не представляет собой полноразмерную область a2 FVIII.

Также раскрыт химерный белок согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что область a2 FVIII содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или 100% идентичную либо последовательности ISDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 106) либо последовательности DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 88). В некоторых вариантах реализации изобретения область a1 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80%, около 85%, около 90%, около 95% или 100% идентичную последовательности ISMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSV (SEQ ID NO: 107).

В определенных вариантах реализации изобретения область a3 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или 100% идентичную последовательности

ISEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQ (SEQ ID NO: 108).

В некоторых вариантах реализации изобретения F1 содержит первый фрагмент Fc и/или F2 содержит второй фрагмент Fc.

Некоторые варианты реализации изобретения включают химерный белок согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что химерный белок, содержащий F1 и F2, демонстрирует более продолжительный период полувыведения по сравнению с химерным белком, не содержащим F1 или F2. В определенных вариантах реализации изобретения L3 представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения белок ФВ соединен с белком FVIII нековалентной связью. В некоторых вариантах реализации изобретения период полувыведения химерного белка является продолжительным по сравнению с белком FVIII без белка ФВ и/или последовательности XTEN или по сравнению с FVIII дикого типа. В некоторых вариантах реализации изобретения период полувыведения химерного белка по меньшей мере в около 1,5 раза, по меньшей мере в около 2 раза, по меньшей мере в около 2,5 раза, по меньшей мере в около 3 раза, по меньшей мере в около 4 раза, по меньшей мере в около 5 раз, по меньшей мере в около 6 раз, по меньшей мере в около 7 раз, по меньшей мере в около 8 раз, по меньшей мере в около 9 раз, по меньшей мере в около 10 раз, по меньшей мере в около 11 раз или по меньшей мере в около 12 раз более продолжителен, чем таковой белка FVIII без белка ФВ или последовательности XTEN или чем таковой белка FVIII дикого типа.

Также раскрыт химерный белок согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что период полувыведения химерного белка составляет по меньшей мере около 17 ч, по меньшей мере около 18 ч, по меньшей мере около 19 ч, по меньшей мере около 20 ч, по меньшей мере около 21 ч, по меньшей мере около 22 ч, по меньшей мере около 23 ч, по меньшей мере около 24 ч, по меньшей мере около 25 ч, по меньшей мере около 26 ч, по меньшей мере около 27 ч, по меньшей мере около 28 ч, по меньшей мере около 29 ч, по меньшей мере около 30 ч, по меньшей мере около 31 ч, по меньшей мере около 32 ч, по меньшей мере около 33 ч, по меньшей мере около 34 ч, по меньшей мере около 35 ч, по меньшей мере около 36 ч, по меньшей мере около 48 ч, по меньшей мере около 60 ч, по меньшей мере около 72 ч, по меньшей мере около 84 ч, по меньшей мере около 96 ч или по меньшей мере около 108 ч. В некоторых вариантах реализации изобретения период полувыведения химерного белка составляет около 40 ч у мышей с гемофилией А. В некоторых вариантах реализации изобретения белок ФВ по существу не связывается с рецептором клиренса ФВ. В некоторых вариантах реализации изобретения белок ФВ способен защищать белок FVIII от расщепления одной или более протеазами, защищая белок FVIII от активации, стабилизируя тяжелую цепь и/или легкую цепь белка FVIII или предотвращая клиренс белка FVIII одним или более фагоцитарными рецепторами.

Некоторые варианты реализации изобретения включают химерный белок согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что белок ФВ ингибирует или предотвращает связывание эндогенного ФВ с белком FVIII, экранируя или блокируя сайт связывания ФВ на белке FVIII. В некоторых вариантах реализации изобретения сайт связывания ФВ расположен в домене A3 или домене C2 белка FVIII, или и в домене A3, и в домене C2. В некоторых вариантах реализации изобретения сайт связывания ФВ содержит аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотам 1669-1689 и 2303-2332 последовательности SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах реализации изобретения первая константная область ИГ или ее часть и вторая константная область ИГ или ее часть одинаковы или отличаются. В определенных вариантах реализации изобретения к белку FVIII присоединены и/или в белок FVIII встроены по меньшей мере две последовательности XTEN, по меньшей мере три последовательности XTEN, по меньшей мере четыре последовательности XTEN, по меньшей мере пять последовательностей XTEN или по меньшей мере шесть последовательностей XTEN.

Также раскрыт химерный белок согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем,

что белок FVIII содержит один или более доменов FVIII, выбранных из домена A1, кислой области a1, домена A2, кислой области a2, домена B, домена A3, кислой области a3, домена C1, домена C2, одного или более их фрагментов и любых их сочетаний.

Также раскрыт химерный белок согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что один или более сайтов встраивания в белке FVIII расположены в пределах одного или более доменов белка FVIII, выбранных из домена A1, кислой области a1, домена A2, кислой области a2, домена A3, домена B, домена C1, домена C2 и любых их сочетаний или между одним или более доменами белка FVIII, выбранными из группы, состоящей из домена A1 и кислой области a1, кислой области a1 и домена A2, домена A2 и кислой области a2, кислой области a2 и домена B, домена B и домена A3, домена A3 и домена C1, домена C1 и домена C2 и любых их сочетаний, или между двумя доменами белка FVIII, выбранными из домена A1 и кислой области a1, кислой области a1 и домена A2, домена A2 и кислой области a2, кислой области a2 и домена B, домена B и домена A3, домена A3 и домена C1, домена C1 и домена C2 и любых их сочетаний. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более сайтов встраивания в белке FVIII представляют собой одну или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков в табл. 7, табл. 8, табл. 9 и табл. 10. В определенных вариантах реализации изобретения сайты встраивания в белке FVIII расположены непосредственно ниже аминокислоты, соответствующей аминокислоте 745 в зрелом белке FVIII (SEQ ID NO: 65). В определенных вариантах реализации изобретения сайты встраивания в белке FVIII расположены непосредственно ниже аминокислотных остатков, соответствующих остаткам 1656 и 1900 в зрелом белке FVIII (SEQ ID NO: 65). В определенных вариантах реализации изобретения сайты встраивания в белке FVIII расположены непосредственно ниже аминокислотных остатков, соответствующих остаткам 26, 1656 и 1900 в зрелом белке FVIII (SEQ ID NO: 65). В определенных вариантах реализации изобретения сайты встраивания в белке FVIII расположены непосредственно ниже аминокислотных остатков, соответствующих остаткам 403 и 745 в зрелом белке FVIII (SEQ ID NO: 65). В определенных вариантах реализации изобретения сайты встраивания в белке FVIII расположены непосредственно ниже аминокислотных остатков, соответствующих остаткам 745 и 1900 в зрелом белке FVIII (SEQ ID NO: 65). В определенных вариантах реализации изобретения сайты встраивания в белке FVIII расположены непосредственно ниже аминокислотных остатков, соответствующих остаткам 18 и 745 в зрелом белке FVIII (SEQ ID NO: 65). В некоторых вариантах реализации изобретения белок FVIII представляет собой двухцепочечную изоформу FVIII. В некоторых вариантах реализации изобретения белок FVIII представляет собой одноцепочечную изоформу FVIII. В определенных вариантах реализации изобретения белок FVIII содержит домен B или его часть. В некоторых вариантах реализации изобретения белок FVIII представляет собой FVIII с удаленным доменом SQ B.

Некоторые варианты реализации изобретения включают химерный белок согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что одноцепочечная изоформа FVIII содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в позиции, соответствующей остатку 1648, остатку 1645 или обоим остаткам в полноразмерном зрелом полипептиде фактора FVIII (SEQ ID NO: 65) либо остатку 754, остатку 751 или обоим остаткам в факторе VIII с удаленным доменом SQ B (SEQ ID NO: 67). В определенных вариантах реализации изобретения аминокислотная замена представляет собой аминокислоту, отличную от аргинина. В некоторых вариантах реализации изобретения двухцепочечная изоформа FVIII состоит из первой цепи, содержащей тяжелую цепь FVIII, и второй цепи, содержащей легкую цепь FVIII, причем тяжелая цепь и легкая цепь соединены между собой металлической связью. В определенных вариантах реализации изобретения домен D' содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотам 764-866 последовательности SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах реализации изобретения домен D3 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотам 867-1240 последовательности SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах реализации изобретения белок ФВ представляет собой мономер.

Также раскрыт химерный белок согласно описанию в настоящем документе, содержащий по меньшей мере два белка ФВ, по меньшей мере три белка ФВ, по меньшей мере четыре белка ФВ, по меньшей мере пять белков ФВ или по меньшей мере шесть белков ФВ. В определенных вариантах реализации изобретения белок ФВ содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотам 764-1240 последовательности SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах реализации изобретения белок ФВ по существу состоит или состоит из аминокислот 764-1240 последовательности SEQ ID NO: 21. В определенных вариантах реализации изобретения белок ФВ содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в позиции, соответствующей остатку 1099, остатку 1142 или обоим остаткам 1099 и 1142 последовательности SEQ ID NO: 21. В некоторых вариантах реализации изобретения белок ФВ содержит аминокислоту, отличную от цистеина, которая замещает остаток, соответствующий остатку 1099, остатку 1142 или обоим остаткам (1099 и 1142) последовательности SEQ ID NO: 21. В определенных вариантах реализации изобретения белок ФВ дополнительно содержит домен D1, домен D2 или домены D1 и D2 белка ФВ.

Некоторые варианты реализации изобретения включают химерный белок согласно описанию в на-

стоящем документе, отличающийся тем, что белок ФВ дополнительно содержит домен ФВ, выбранный из домена А1, домена А2, домена А3, домена А4, домена В1, домена В2, домена В3, домена С1, домена С2, домена СК, одного или более их фрагментов и любых их сочетаний.

Также раскрыт химерный белок согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что белок ФВ состоит или по существу состоит из: (1) доменов D' и D3 ФВ или их фрагментов; (2) доменов D1, D' и D3 ФВ или их фрагментов; (3) доменов D2, D' и D3 ФВ или их фрагментов; (4) доменов D1, D2, D' и D3 ФВ или их фрагментов; (5) доменов D1, D2, D', D3 и А1 ФВ или их фрагментов.

Некоторые варианты реализации изобретения включают химерный белок согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что белок ФВ дополнительно содержит сигнальный пептид ФВ или FVIII, функционально связанный с белком ФВ.

Также раскрыт химерный белок согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что один или более линкеров имеют длину по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 или 2000 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более линкеров имеют длину от около 1 до около 2000 аминокислотных остатков. В определенных вариантах реализации изобретения один или более линкеров содержат пептид gly/ser. В некоторых вариантах реализации изобретения пептид gly/ser имеет формулу $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ (SEQ ID NO: 94) или $\text{S}(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ (SEQ ID NO: 164), где n представляет собой положительное целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10. В определенных вариантах реализации изобретения линкер $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ представляет собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ (SEQ ID NO: 100) или $(\text{Gly}_4\text{Ser})_4$ (SEQ ID NO: 165). В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит 20 аминокислот, 35 аминокислот, 48 аминокислот, 73 аминокислоты или 95 аминокислот. В определенных вариантах реализации изобретения расщепляемый линкер представляет собой последовательность SGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSLVPRGSGG (SEQ ID NO: 166).

В некоторых вариантах реализации изобретения химерный белок согласно описанию в настоящем документе полисиалилирован, ПЭГилирован или ГЭКилован.

Также раскрыт химерный белок согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что первый полипептид содержит последовательность, по меньшей мере на около 80%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичную

FVIII161 (SEQ ID NO: 69),

FVIII169 (SEQ ID NO: 70), FVIII173 (SEQ ID NO: 72), FVIII195 (SEQ ID NO: 73), FVIII196 (SEQ ID NO: 74), FVIII199 (SEQ ID NO: 75), FVIII201 (SEQ ID NO: 76), FVIII203 (SEQ ID NO: 77), FVIII204 (SEQ ID NO: 78), FVIII205 (SEQ ID NO: 79), FVIII266 (SEQ ID NO: 80), FVIII267 (SEQ ID NO: 81), FVIII268 (SEQ ID NO: 82), FVIII269 (SEQ ID NO: 83), FVIII271 (SEQ ID NO: 84), FVIII272 (SEQ ID NO: 85) или FVIII282 (SEQ ID NO: 159),

и второй полипептид содержит последовательность, по меньшей мере на около 80%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичную либо ФВ057 (SEQ ID NO: 152), либо ФВ059 (SEQ ID NO: 197). В некоторых вариантах реализации изобретения первый полипептид содержит FVIII169 (SEQ ID NO: 70) и второй полипептид содержит ФВ057 (SEQ ID NO: 152). В других вариантах реализации изобретения первый полипептид содержит FVIII169 (SEQ ID NO: 70) и второй полипептид содержит ФВ059 (SEQ ID NO: 197). В еще одном варианте реализации изобретения первый полипептид содержит FVIII169 (SEQ ID NO: 70) и второй полипептид содержит ФВ062 (SEQ ID NO: 199). В некоторых вариантах реализации изобретения химерный белок эффективен в предотвращении и/или остановке кровотечения у субъекта, имеющего для этого показания.

Также раскрыт полинуклеотид или набор полинуклеотидов, кодирующих химерный белок согласно описанию в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид согласно описанию в настоящем документе дополнительно содержит полинуклеотидную цепь, кодирующую PC5 или PC7.

Некоторые варианты реализации изобретения включают вектор, содержащий полинуклеотид согласно описанию в настоящем документе и один или более промоторов, функционально связанных с полинуклеотидом или набором полинуклеотидов.

В некоторых вариантах реализации изобретения вектор согласно описанию в настоящем документе дополнительно содержит дополнительный вектор, содержащий полинуклеотидную цепь, кодирующую PC5 или PC7.

Также раскрыта клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид или вектор согласно описанию в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. В определенных вариантах реализации изобретения клетка млекопитающего выбрана из клетки НЕК293 (human embryonic kidney 293; линия эмбриональных клеток почки человека), клетки CHO (chinese hamster ovary; линия клеток яичника китайского хомячка) и клетки ВНК (baby ham-

ster kidney; линия клеток почки новорожденного сирийского хомячка).

Также раскрыта фармацевтическая композиция, содержащая химерный белок, полинуклеотид, вектор или клетку-хозяина согласно описанию в настоящем документе и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах реализации изобретения химерный белок имеет более продолжительный период полувыведения по сравнению с белком FVIII дикого типа. В определенных вариантах реализации изобретения период полувыведения химерного белка по меньшей мере в около 1,5 раза, по меньшей мере в около 2 раз, по меньшей мере в около 2,5 раза, по меньшей мере в около 3 раз, по меньшей мере в около 4 раз, по меньшей мере в около 5 раз, по меньшей мере в около 6 раз, по меньшей мере в около 7 раз, по меньшей мере в около 8 раз, по меньшей мере в около 9 раз, по меньшей мере в около 10 раз, по меньшей мере в около 11 раз или по меньшей мере в около 12 раз более продолжителен, чем таковой белка FVIII дикого типа.

Некоторые варианты реализации изобретения включают композицию согласно описанию в настоящем документе, отличающуюся тем, что период полувыведения химерного белка составляет по меньшей мере около 17 ч, по меньшей мере около 18 ч, по меньшей мере около 19 ч, по меньшей мере около 20 ч, по меньшей мере около 21 ч, по меньшей мере около 22 ч, по меньшей мере около 23 ч, по меньшей мере около 24 ч, по меньшей мере около 25 ч, по меньшей мере около 26 ч, по меньшей мере около 27 ч, по меньшей мере около 28 ч, по меньшей мере около 29 ч, по меньшей мере около 30 ч, по меньшей мере около 31 ч, по меньшей мере около 32 ч, по меньшей мере около 33 ч, по меньшей мере около 34 ч, по меньшей мере около 35 ч, по меньшей мере около 36 ч, по меньшей мере около 48 ч, по меньшей мере около 60 ч, по меньшей мере около 72 ч, по меньшей мере около 84 ч, по меньшей мере около 96 ч или по меньшей мере около 108 ч. В определенных вариантах реализации изобретения период полувыведения химерного белка составляет около 40 ч у мышей с гемофилией А. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция согласно описанию в настоящем документе вводится путем, выбранным из группы, состоящей из местного применения, внутриглазного введения, парентерального введения, интратекального введения, субдурального введения и перорального приема. В определенных вариантах реализации изобретения парентеральное введение может представлять собой внутривенное или подкожное введение.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиция согласно описанию в настоящем документе используется для лечения геморрагического заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом. В определенных вариантах реализации изобретения геморрагическое заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из нарушения свертываемости крови, гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения полости рта, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в полости рта, травмы, травмы головы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшного кровоизлияния, кровоизлияния в грудную полость, перелома кости, кровотечения органов центральной нервной системы, кровоизлияния в заглоточном пространстве, кровоизлияния в забрюшинное пространство, кровоизлияния во влагалище подвздошно-поясничной мышцы и любых их комбинаций. В некоторых вариантах реализации изобретения субъекту назначено хирургическое вмешательство. В определенных вариантах реализации изобретения лечение является профилактическим или "по требованию".

Также раскрыт способ продления или увеличения периода полувыведения химерного белка, который включает введение эффективного количества химерного белка, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или композиции согласно описанию в настоящем документе субъекту, имеющему для этого показания, причем белок ФВ, последовательность ХТЕН, первая константная область ИГ или ее часть и вторая константная область ИГ или ее часть увеличивают период полувыведения химерного белка.

Некоторые варианты реализации изобретения включают способ лечения геморрагического заболевания или расстройства у субъекта, имеющего для этого показания, который включает введение эффективного количества химерного белка, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или композиции согласно описанию в настоящем документе, причем геморрагическое заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из нарушения свертываемости крови, гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения полости рта, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в полости рта, травмы, травмы головы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшного кровоизлияния, кровоизлияния в грудную полость, перелома кости, кровотечения органов центральной нервной системы, кровоизлияния в заглоточном пространстве, кровоизлияния в забрюшинное пространство и кровоизлияния во влагалище подвздошно-поясничной мышцы. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект представляет собой животное. В некоторых вариантах реализации изобретения животное представляет собой человека. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект страдает гемофилией А. В определенных вариантах реализации изобретения лечение является профилактическим или "по требованию". В некоторых вариантах реализации изобретения эффективное количество составляет от 0,1 мкг/кг до 500 мг/кг.

Также раскрыт способ согласно описанию в настоящем документе, отличающийся тем, что химерный белок, полинуклеотид, вектор, клетка-хозяин или композиция согласно описанию в настоящем документе вводится путем, выбранным из группы, состоящей из местного применения, внутриглазного

введения, парентерального введения, интратекального введения, субдурального введения и перорального приема. В определенных вариантах реализации изобретения парентеральное введение выбрано из группы, состоящей из внутривенного введения, подкожного введения, внутримышечного введения и внутрисуставного введения.

Некоторые варианты реализации изобретения включают способ изготовления химерного белка, включающий трансфекцию одной или более клеток-хозяев полинуклеотидом или вектором согласно описанию в настоящем документе и экспрессию химерного белка в клетке-хозяине. В некоторых вариантах реализации изобретения способ согласно описанию в настоящем документе дополнительно включает выделение химерного белка. В определенных вариантах реализации изобретения химерный белок эффективен в остановке и/или предотвращении кровотечения у субъекта.

Краткое описание графических материалов/фигур

На фиг. 1 представлено схематическое изображение химерного белка, состоящего из первого полипептида, который содержит белок FVIII (A1-A2-частичный или полный домен B-A3-C1-C2), слитый с фрагментом Fc, причем в сайт встраивания в пределах белка FVIII встроена последовательность XTEN, и второго полипептида, который содержит белок Fb, содержащий домены D'D3, последовательность XTEN из менее чем 288 аминокислот, расщепляемый тромбином линкер и второй фрагмент Fc. Вставки последовательности XTEN в белок FVIII и/или слияния последовательности XTEN с белком Fb продлевают период полувыведения химерного белка, увеличивая гидродинамический радиус и блокируя опосредованный рецепторами клиренс. Домены D'D3 белка Fb блокируют взаимодействие FVIII с эндогенным Fb, стабилизируют белок FVIII и продлевают период полувыведения химерного белка. Домены Fc могут ковалентно связывать домены D'D3 с белком FVIII и продлевать период полувыведения химерного белка через FcRn-опосредованный метаболический путь. Расщепляемый тромбином линкер делает возможным высвобождение доменов D'D3 при активации FVIII и обеспечивает правильное выравнивание между FVIII и доменами D'D3 Fb.

На фиг. 2 представлена трехплазмидная система экспрессии для гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc:D'D3-XTEN-Fc: первая плазида, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую одноцепочечный белок FVIII-XTEN-Fc, в котором последовательность XTEN встроена в домен B; вторая плазида, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую белок D1D2D'D3-XTEN-Fc, в котором последовательность XTEN содержит менее 288 аминокислот; и третья плазида, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую PACE - фермент процессинга пропептида. Когда три полипептида экспрессируются с трех плазмид, полипептидные домены D1D2 белка Fb могут отщепляться от доменов D'D3 путем внутриклеточного процессинга. Полученный в результате комплекс содержит три продукта: первая молекула представляет собой гетеродимеры FVIII-XTEN/D'D3, вторая молекула представляет собой побочный продукт - гомодимер D'D3-XTEN-Fc, и третья молекула представляет собой еще один побочный продукт, то есть FVIII(XTEN)-Fc.

На фиг. 3 представлены аддитивные эффекты вставок XTEN на продление периода полувыведения гетеродимеров. FVIII169 содержит слитый с фрагментом Fc белок FVIII с удаленным доменом B, в котором последовательность XTEN (например, AE288) встроена в позицию, соответствующую аминокислоте 745 зрелого полноразмерного FVIII. FVIII205 содержит слитый с фрагментом Fc белок FVIII с удаленным доменом B, в котором последовательность XTEN (например, AE144) встроена в позицию, соответствующую аминокислоте 18 зрелого полноразмерного FVIII, и еще одна последовательность XTEN (например, AE288) встроена в позицию, соответствующую аминокислоте 745 зрелого полноразмерного FVIII. Fb031 содержит домен D' и домен D3 Fb, слитые с фрагментом Fc с помощью расщепляемого тромбином линкера (без XTEN). Fb034 содержит домен D' и домен D3 Fb, слитые с AE288 и фрагментом Fc. Период полувыведения FVIII169/Fb031 (перевернутый треугольник) составляет 16,7 ч у мышей с гемофилией A; период полувыведения FVIII205/Fb031 (круг) составляет 29,4 ч у мышей с гемофилией A; и период полувыведения FVIII169/Fb034 (квадрат) составляет 31,1 ч у мышей с гемофилией A.

На фиг. 4 показано, что в случае встраивания между доменами D'D3 Fb и доменами Fc последовательность AE144 XTEN обеспечивает большее продление периода полувыведения, чем AE288 XTEN. Например, в то время как период полувыведения FVIII169/Fb034 (квадрат) у мышей с гемофилией A составляет 31,1 ч, период полувыведения FVIII169/Fb057 (круг) у мышей с гемофилией A составляет 42 ч. Fb057 содержит домены D'D3 Fb, слитые с AE144 и фрагментом Fc.

На фиг. 5 показано, что для продления периода полувыведения гетеродимеров химерного белка необходимы домены Fc. При сравнении периода полувыведения FVIII205/Fb031 (круг) у мышей с гемофилией A с таковым белка FVIII263/Fb050 (квадрат), содержащего мутации в сайтах связывания FcRn (тройная мутация IHH (Indian Hedgehog Homolog) в Fc) и, следовательно, не поддающегося рециркуляции в пути FcRn, период полувыведения FVIII263/Fb050 (23 ч) короче периода полувыведения FVIII205/Fb031 (29,4 ч). Это говорит о том, что фрагменты Fc необходимы для продления периода полувыведения.

На фиг. 6A представлена аналогичная мгновенная эффективность гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc:D'D3-XTEN-Fc по сравнению с белком FVIII с удаленным доменом B (SQ BDD FVIII) на модели кровотечения, вызванного отрезанием хвоста, у мышей с гемофилией A. Мышам вводили дозу 75 МЕ/кг и

измеряли активность в анализе АЧТВ. SQ BDD FVIII показан в форме круга, FVIII169/ФВ034 - в форме квадрата, FVIII169/ФВ057 - в форме ромба, а носитель - в форме перевернутого треугольника. Подробное описание конструкций FVIII169, ФВ034 и ФВ057 приведено в другом месте в настоящем документе. На фиг. 6В показано сравнение мгновенной эффективности FVIII169/ФВ034 и FVIII с удаленным доменом В (SQ BDD FVIII) у мышей с гемофилией А при использовании дозы 37,5 МЕ/кг и измерении активности в анализе АЧТВ. Медианы потери крови (мкл) у мышей в каждой экспериментальной группе обозначены горизонтальными линиями, потери крови (мкл) у мышей линии C57/BL6 обозначены незакрашенными треугольниками; потери крови (мкл) после введения rBDD-FVIII в дозе 37,5 МЕ/кг обозначены незакрашенными кругами; потери крови (мкл) после введения FVIII169/ФВ034 в дозе 37,5 МЕ/кг обозначены незакрашенными квадратами и потери крови (мкл) после введения носителя обозначены перевернутыми треугольниками.

На фиг. 7А, В показано, что гетеродимер rFVIII169/ФВ057 обеспечивает более длительную защиту у мышей с гемофилией А в модели кровотечения, вызванного рассечением хвостовой вены. На фиг. 7А представлены данные о повторных кровотечениях у мышей, получавших rFVIII169/ФВ057 за 72 ч до повреждения хвоста (квадрат), SQ BDD-FVIII за 48 ч до повреждения хвоста (ромб), SQ BDD-FVIII за 24 ч до повреждения хвоста (перевернутый треугольник) и носитель (круг). Активность измеряли с помощью анализа АЧТВ. По оси абсцисс отложено время в часах, а по оси ординат - процент особей, у которых не наблюдалось кровотечения. На фиг. 7В представлены соответствующие данные по выживанию для четырех категорий мышей, показанных на фиг. 7А. У мышей, получавших rFVIII169/ФВ057 в дозе 12 МЕ/кг за 72 ч до повреждения хвоста, отмечались аналогичные показатели защиты от повторного кровотечения и выживаемости по сравнению с мышами, получавшими SQ BDD-FVIII за 24 ч до повреждения хвоста.

На фиг. 8А представлены сопоставимые показатели повторных кровотечений у мышей, получавших гетеродимеры FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc за 96 ч до повреждения, и мышей, получавших rBDD-FVIII за 24 ч до повреждения. Закрашенные квадраты иллюстрируют данные о повторных кровотечениях у мышей, получавших FVIII169/ФВ034 за 24 ч до повреждения; незакрашенные квадраты иллюстрируют данные о повторных кровотечениях у мышей, получавших FVIII169/ФВ034 за 96 ч до повреждения; закрашенные ромбы иллюстрируют данные о повторных кровотечениях у мышей, получавших FVIII169/ФВ057 за 24 ч до повреждения; незакрашенные ромбы иллюстрируют данные о повторных кровотечениях у мышей, получавших FVIII169/ФВ057 за 96 ч до повреждения; закрашенные круги иллюстрируют данные о повторных кровотечениях у мышей, получавших rBDD-FVIII за 24 ч до повреждения; незакрашенные круги иллюстрируют данные о повторных кровотечениях у мышей, получавших rBDD-FVIII за 48 ч до повреждения; и закрашенные треугольники иллюстрируют данные о повторных кровотечениях у мышей, получавших носитель. По оси абсцисс отложено время в часах, а по оси ординат - процент особей, у которых не наблюдалось кровотечения.

На фиг. 8В представлены кривые выживания мышей, получавших гетеродимеры FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc за 96 ч до повреждения, по сравнению с мышами, получавшими rBDD-FVIII за 24 ч до повреждения. По оси абсцисс отложено время в часах, по оси ординат - выживаемость в процентах. Условные обозначения такие же, как на фиг. 8А.

На фиг. 9 представлены схематические изображения типичных гетеродимеров FVIII-ФВ и конструкций FVIII169, FVIII286, ФВ057, ФВ059 и ФВ062. Например, конструкция FVIII169 содержит слитый с фрагментом Fc белок FVIII с удаленным доменом В и заменой R1648A, в котором последовательность XTEN (например, AE288) встроена в позицию, соответствующую аминокислоте 745 зрелого полноразмерного FVIII (A1-a1-A2-a2-288XTEN-a3-A3-C1-C2-Fc). Конструкция FVIII286 содержит слитый с фрагментом Fc белок FVIII с удаленным доменом В и заменой R1648, в котором последовательность XTEN (например, AE288) встроена в позицию, соответствующую аминокислоте 745 зрелого полноразмерного FVIII, с дополнительной областью a2 между FVIII и Fc (A1-a1-A2-a2-288XTEN-a3-A3-C1-C2-a2-Fc). ФВ057 представляет собой слитую конструкцию ФВ-Fc, содержащую домен D'D3 белка ФВ (с двумя аминокислотными заменами в домене D'D3, т.е. C336A и C379A), связанный с фрагментом Fc посредством линкера ФВ, содержащего сайт расщепления тромбином LVPRG ("LVPRG"; SEQ ID NO: 6) и глицин-сериновый линкер ("GS"), причем в данной конструкции последовательность XTEN (например, AE144) встроена между доменом D'D3 и линкером ФВ (D'D3-144XTEN-GS+LVPRG-Fc). ФВ059 представляет собой слитую конструкцию ФВ-Fc, содержащую домен D'D3 белка ФВ (с двумя аминокислотными заменами в домене D'D3, т.е. C336A и C379A), связанный с фрагментом Fc посредством кислой области 2 (a2) белка FVIII в качестве линкера ФВ, причем последовательность XTEN (т.е. AE144) встроена между доменом D'D3 и линкером ФВ. ФВ062 представляет собой слитую конструкцию ФВ-Fc, содержащую домен D'D3 белка ФВ (с двумя аминокислотными заменами в домене D'D3, т.е. C336A и C379A), связанный с фрагментом Fc, причем последовательность XTEN (т.е. AE144) встроена между доменом D'D3 и фрагментом Fc (D'D3-144XTEN-Fc).

На фиг. 10 представлено схематическое изображение гетеродимерных конструкций FVIII/ФВ, например FVIII169/ФВ057, FVIII169/ФВ059, FVIII169/ФВ059A и FVIII169/ФВ073. Стрелкой показан сайт, в который добавляется необязательный линкер для введения сайта расщепления тромбином. FVIII169/ФВ057 имеет линкер, содержащий LVPRG (SEQ ID NO: 6). FVIII169/ФВ059 имеет линкер, со-

державший область а2 белка FVIII (т.е.

ISDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRFSFSDKTH (SEQ ID NO: 106)).

FVIII169/ФВ059А имеет линкер, содержащий укороченную область а2 белка FVIII (т.е. DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRFSFSDKTH (SEQ ID NO: 88)). FVIII169/ФВ073 имеет линкер в пределах конструкции ФВ073 (SEQ ID NO: 175), который содержит фрагмент области а2 белка FVIII, состоящий из IEPRFSF (SEQ ID NO: 194).

На фиг. 11А-С показаны ДСН-ПААГ-электрофореграммы, полученные после расщепления FVIII169/ФВ057 тромбином, с использованием FVIII-Fc в качестве контроля. На фиг. 11А представлено окрашивание геля для ДСН-ПААГ-электрофореза антителом к D3 (АВ 96340). Стрелками выделено "LCFc:D'D3-XTEN-Fc," представляющий собой нерасщепленный, полноразмерный FVIII169/ФВ057, и "D'D3-144 XTEN," представляющий собой фрагмент, полученный в результате расщепления тромбином. На фиг. 11В представлено окрашивание геля для ДСН-ПААГ-электрофореза антителом к тяжелой цепи (heavy chain, HC) (GMA012). Стрелками выделено тяжелую цепь FVIII ("HC") и домен А2 FVIII. На фиг. 11С представлено совмещенное изображение тест-панелей А и В. Образцы отбирали в моменты времени, указанные в верхней части каждой тест-панели. Стрелки указывают на соответствующие белки.

На фиг. 12А-С показаны ДСН-ПААГ-электрофореграммы, полученные после расщепления FVIII169/ФВ059 тромбином. На фиг. 12А представлено окрашивание геля для ДСН-ПААГ-электрофореза антителом к D3 (АВ 96340). Стрелками выделено "LCFc:D'D3-XTEN-Fc," представляющий собой нерасщепленный, полноразмерный FVIII169/ФВ059, и "D'D3-144 XTEN," представляющий собой фрагмент, полученный в результате расщепления тромбином. На фиг. 12В представлено окрашивание геля для ДСН-ПААГ-электрофореза антителом к HC (GMA012). Стрелками выделено нерасщепленный, полноразмерный FVIII169/ФВ059, D'D3-144 XTEN-а3, представляющий собой фрагмент, полученный в результате расщепления тромбином, и "А2", представляющий собой домен А2 белка FVIII. На фиг. 12С представлено совмещенное изображение тест-панелей А и В. Образцы отбирали в моменты времени, указанные в верхней части каждой тест-панели.

На фиг. 13 представлены данные по мгновенной эффективности у мышей с гемофилией А, получавших FVIII169/ФВ059 (круг), в сравнении с мышами с гемофилией А, получавшими BDD-FVIII в качестве контроля (квадрат). Показатель кровопотери измеряли после отрезания хвоста, $p=0.9883$.

Подробное описание сущности изобретения

Настоящее изобретение относится к химерному белку, содержащему два полипептида, первый из которых содержит белок FVIII, слитый с первой константной областью ИГ, и второй из которых содержит белок ФВ, слитый со второй константной областью ИГ или ее частью посредством последовательности XTEN, причем последовательность XTEN содержит менее 288 аминокислотных остатков.

I. Определения.

Следует отметить, что существительное в единственном числе подразумевает также и множественное число; например, под определением "нуклеотидная последовательность" понимают одну или более нуклеотидных последовательностей. Таким образом, термины в единственном числе, термины "один или более" и "по меньшей мере один" могут применяться в настоящем документе взаимозаменяемо.

Более того, использование термина "и/или" в настоящем документе следует принимать за частное описание любого из двух указанных свойств или компонентов отдельно от второго свойства или компонента или вместе с ним. Следовательно, подразумевается, что термин "и/или", примененный в настоящем документе в таком выражении, как "А и/или В", включает "А и В", "А или В", только "А" и только "В".

Аналогично, подразумевается, что термин "и/или", примененный в таком выражении, как "А, В и/или С", охватывает каждый из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; только А; только В; и только С.

Необходимо понимать, что повсюду в настоящем документе, где для описания аспектов применяется формулировка "содержит", также подразумеваются в остальном аналогичные аспекты, описываемые понятиями "состоит из" и/или "по существу состоит из".

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, что обычно понимается средним специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, the Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2-nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3-е изд., 1999 год, Academic Press; и the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, предлагают специалисту в данной области техники общий словарь многих терминов, использованных в настоящем описании.

Единицы, приставки и символы указаны в их принятой форме согласно Международной системе единиц (Système International de Unités, СИ). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, аминокислотные последовательности записаны слева направо в направлении от амино- до карбоксильного конца. Приведенные в настоящем документе заголовки не ограничивают различные аспекты изобретения, которые могут быть доступны при обращении к описанию в целом. Соответственно, термины, определения которых приведены непосредственно далее по тексту, более

полно определяются посредством ссылки на описание в полном объеме.

Термин "около" в настоящем документе означает приблизительно, грубо говоря, примерно или порядка. Когда термин "около" используют в сочетании с диапазоном числовых значений, он изменяет этот диапазон, расширяя границы выше и ниже указанных далее числовых значений. В целом, термин "около" может отклонять числовое значение выше или ниже указанного значения на величину, например 10%, в сторону увеличения или уменьшения (выше или ниже).

Подразумевается, что термин "полинуклеотид" или "нуклеотид" охватывает одну нуклеиновую кислоту и множество нуклеиновых кислот и относится к выделенной молекуле или конструкции нуклеиновой кислоты, например, матричной РНК (мРНК) или плазмидной ДНК (пДНК). В определенных вариантах реализации изобретения полинуклеотид содержит обычную фосфодиэфирную связь или нестандартную связь (например, амидную связь, как в пептидных нуклеиновых кислотах (ПНК)). Термин "нуклеиновая кислота" относится к одному или более сегментам нуклеиновой кислоты, например, фрагментам ДНК или РНК, присутствующим в полинуклеотиде. Термин "выделенная" нуклеиновая кислота или "выделенный" полинуклеотид подразумевает молекулу нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), которая была удалена из своей нативной среды. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий полипептид фактора VIII и входящий в состав вектора, считается выделенным для целей настоящего изобретения. Дополнительные примеры выделенных полинуклеотидов включают рекомбинантные полинуклеотиды, поддерживаемые в гетерологических клетках-хозяевах или очищенные (частично или существенно) от прочих полинуклеотидов в растворе. Выделенные молекулы РНК включают *in vivo* или *in vitro* РНК-транскрипты полинуклеотидов по настоящему изобретению. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению дополнительно включают таковые молекулы, полученные путем синтеза. К тому же, полинуклеотид или нуклеиновая кислота может включать регуляторные элементы, такие как промоторы, энхансеры, участки связывания рибосом или сигналы терминации транскрипции.

В контексте настоящего документа термин "кодирующая область" или "кодирующая последовательность" означает часть полинуклеотида, состоящую из кодонов, поддающихся трансляции в аминокислотную последовательность. Хотя "стоп-кодон" (TAG, TGA или TAA), как правило, не транслируется в аминокислоту, он может считаться частью кодирующей области, однако любые фланкирующие последовательности, например промоторы, участки связывания рибосом, терминаторы транскрипции, интроны и тому подобные, не являются частью кодирующей области. Границы кодирующей области, как правило, определяются стартовым кодоном на 5'-конце, кодирующим amino-конец синтезируемого полипептида, и стоп-кодоном трансляции на 3'-конце, кодирующим карбоксильный конец синтезируемого полипептида. Две или более кодирующие области по настоящему изобретению могут присутствовать в одной полинуклеотидной конструкции, например, на одном векторе, или в отдельных полинуклеотидных конструкциях, например, на отдельных (разных) векторах. Отсюда следует, что один вектор может содержать всего одну кодирующую область или две и более кодирующие области, например, один вектор может отдельно кодировать связывающий домен А и связывающий домен В, как описано ниже. К тому же, вектор, полинуклеотид или нуклеиновая кислота по данному изобретению может содержать гетерологические кодирующие области, будь то слитые или не слитые с нуклеиновой кислотой, кодирующей связывающий домен по данному изобретению. Гетерологические кодирующие области включают специализированные элементы или мотивы, такие как секреторный сигнальный пептид или гетерологический функциональный домен, но не ограничиваются ими.

Определенные белки, секретируемые клетками млекопитающих, соединены с секреторным сигнальным пептидом, который отщепляется от зрелого белка после начала переноса растущей полипептидной цепи через шероховатый эндоплазматический ретикулум. Средним специалистам в данной области техники известно, что сигнальные пептиды обычно соединены с N-концом полипептида и отщепляются от готового или "полноразмерного" полипептида, чтобы образовалась секретируемая или "зрелая" форма полипептида. В определенных вариантах реализации изобретения нативный сигнальный пептид или функциональное производное той же последовательности сохраняет способность направлять секрецию полипептида, функционально соединенного с этим пептидом или производным. В альтернативном варианте может использоваться гетерологический сигнальный пептид млекопитающих, например, тканевой активатор плазминогена (ТАП) человека или сигнальный пептид мышинной β -глюкуронидазы, либо их функциональное производное.

Термин "ниже(лежащий)" применительно к нуклеотидной последовательности означает, что нуклеиновая кислота или нуклеотидная последовательность расположена в 3'-направлении относительно нуклеотидной последовательности сравнения. В определенных вариантах реализации изобретения ниже-лежащие нуклеотидные последовательности означают последовательности, лежащие после точки начала транскрипции. Например, кодон инициации трансляции в гене лежит ниже сайта начала транскрипции. Термин "ниже(лежащий)" применительно к полипептидной последовательности означает, что аминокислота или сайт встраивания аминокислоты расположены с С-конца аминокислотной последовательности сравнения. Например, сайт встраивания непосредственно ниже аминокислоты, соответствующей аминокислоте 745 в зрелом белке FVIII дикого типа, означает, что сайт встраивания расположен между amino-

кислотными остатками, соответствующими остаткам 745 и 746 в зрелом белке FVIII дикого типа.

Термин "выше(лежащий)" означает нуклеотидную последовательность, которая расположена в 5'-направлении относительно нуклеотидной последовательности сравнения. В определенных вариантах реализации изобретения вышележащие нуклеотидные последовательности означают последовательности, расположенные с 5'-стороны кодирующей области или точки начала транскрипции. Например, большинство промоторов расположены выше сайта начала транскрипции.

В контексте настоящего документа термин "регуляторная область" относится к нуклеотидным последовательностям, которые расположены выше (5'-некодирующие последовательности), в пределах или ниже (3'-некодирующие последовательности) кодирующей области и которые влияют на транскрипцию, процессинг РНК, стабильность или трансляцию соответствующей кодирующей области. Регуляторные области могут включать промоторы, лидерные последовательности трансляции, интроны, последовательности распознавания полиаденилирования, участки процессинга РНК, участки связывания эффекторов и структуры типа "петля-на-стебле". Если кодирующая область предназначена для экспрессии в эукариотической клетке, сигнал полиаденилирования и последовательность терминации транскрипции обычно расположены в 3'-направлении относительно кодирующей последовательности.

Полинуклеотид, кодирующий продукт гена, например, полипептид, может включать промотор и/или прочие элементы контроля транскрипции или трансляции, функционально соединенные с одной или более кодирующими областями. В случае функционального соединения кодирующая область для продукта гена, например полипептида, соединена с одной или более регуляторными областями таким образом, чтобы экспрессия продукта гена находилась под влиянием или контролем регуляторной(ых) области(ей). Например, кодирующая область и промотор являются "функционально соединенными", если индукция функции промотора приводит к транскрипции мРНК, кодирующей продукт гена, кодируемой кодирующей областью, и если природа связи между промотором и кодирующей областью не препятствует способности промотора направлять экспрессию данного продукта гена или не препятствует способности ДНК-матрицы транскрибироваться в РНК. Прочие элементы контроля транскрипции, помимо промотора, например энхансеры, репрессоры и сигналы терминации транскрипции, также могут быть функционально соединены с кодирующей областью, чтобы направлять экспрессию продукта гена.

Специалистам в данной области техники известны различные области контроля транскрипции. Они включают области контроля транскрипции, функционирующие в клетках позвоночных, такие как промоторные и энхансерные сегменты из цитомегаловирусов (немедленно-ранний промотор в сочетании с интроном А), вируса обезьян 40 (ранний промотор) и ретровирусов (например, вируса саркомы Рауса), но не ограничиваются перечисленным. Прочие области контроля транскрипции включают области, полученные из генов позвоночных, таких как гены актина, белков теплового шока, гормона роста крупного рогатого скота и кроличьего β -глобина, а также другие последовательности, способные контролировать экспрессию генов в клетках эукариот. Дополнительные пригодные области контроля транскрипции включают тканеспецифичные промоторы и энхансеры, а также промоторы, индуцируемые лимфокинами (например, промоторы, индуцируемые интерферонами или интерлейкинами).

Аналогичным образом, средним специалистам в данной области техники известны различные элементы контроля трансляции. Они включают участки связывания рибосом, кодоны инициации и терминации транскрипции и элементы, полученные из пикорнавирусов (в частности, участок внутренней посадки рибосомы, или IRES [internal ribosome entry site], также именуемый последовательностью CITE [cap independent transcription enhancer, кэп-независимый энхансер транскрипции]), но не ограничиваются перечисленным.

В контексте настоящего документа термин "экспрессия" относится к процессу, посредством которого полинуклеотид генерирует продукт гена, например РНК или полипептид. Он включает транскрипцию полинуклеотида в матричную РНК (мРНК), транспортную РНК (тРНК), малую шпильчатую РНК (мшРНК), малую интерферирующую РНК (миРНК) или любой другой РНК-продукт и трансляцию мРНК в полипептид, но не ограничивается перечисленным. Экспрессия приводит к образованию "продукта гена". В контексте настоящего документа продукт гена может представлять собой либо нуклеиновую кислоту, например, матричную РНК, синтезированную посредством транскрипции гена, либо полипептид, транслированный из транскрипта. Продукты генов, описанные в настоящем документе, дополнительно включают нуклеиновые кислоты с посттранскрипционными модификациями, например, полиаденилированием или сплайсингом, либо полипептиды с посттрансляционными модификациями, например, метилированием, гликозилированием, добавлением липидов, объединением с другими белковыми субъединицами или протеолитическим расщеплением.

"Вектор" означает любой носитель для клонирования и/или переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Вектор может представлять собой репликон, к которому может быть присоединен другой сегмент нуклеиновой кислоты для осуществления репликации присоединенного сегмента. Термин "репликон" относится к любому генетическому элементу (например, плазмиде, фагу, космиде, хромосоме, вирусу), который функционирует в качестве автономной единицы репликации *in vivo*, т.е. способен реплицироваться под собственным контролем. Термин "вектор" включает как вирусные, так и невирусные носители для введения нуклеиновой кислоты в клетку *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В данной области тех-

ники известно и используется большое количество векторов, включая, например, плазмиды, модифицированные вирусы эукариот или модифицированные вирусы бактерий. Вставка полинуклеотида в подходящий вектор может достигаться путем лигирования соответствующих полинуклеотидных фрагментов с выбранным вектором, имеющим комплементарные "липкие" концы.

Вектор может быть сконструирован таким образом, чтобы кодировать селективные маркеры или репортеры, обеспечивающие отбор или идентификацию клеток, содержащих вектор. Экспрессия селективных маркеров или репортеров позволяет выявить и/или отобрать клетки-хозяев, которые содержат и экспрессируют прочие кодирующие области, расположенные на векторе. Примеры генов селективных маркеров, известных и применяемых в данной области техники, включают: гены, обеспечивающие стойкость к ампициллину, стрептомицину, гентамицину, канамицину, гиромоцину, гербициду биалафосу, сульфаниламидам и тому подобным; и гены, используемые в качестве фенотипических маркеров, т.е. регуляторные гены биосинтеза антоцианов, ген изопентилтрансферазы и тому подобные. Примеры репортеров, известных и применяемых в данной области техники, включают: люциферазу (Luc), зеленый флуоресцентный белок (GFP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), β -галактозидазу (LacZ), Р-глюкуронидазу (Gus) и тому подобные. Селективные маркеры также можно считать репортерами.

Термин "плазида" относится к внехромосомному элементу, часто несущему ген, который не является частью основного метаболизма клетки, и обычно имеющему форму кольцевых двухцепочечных молекул ДНК. Такие элементы могут представлять собой автономно реплицирующиеся последовательности, встраивающиеся в геном последовательности, фаговые или нуклеотидные последовательности, линейную, кольцевую или суперспиральную одно- или двухцепочечную ДНК или РНК, полученные из любого источника, в которых ряд нуклеотидных последовательностей соединены или рекомбинированы в уникальную конструкцию, которая способна вводить в клетку фрагмент промотора и последовательность ДНК для выбранного продукта гена вместе с подходящей 3'-нетранслируемой последовательностью.

Векторы на основе эукариотических вирусов, которые можно применять, включают аденовирусные векторы, ретровирусные векторы, векторы на основе аденоассоциированного вируса и поксвирусные векторы, например векторы на основе вируса осповакцины, бакуловирусные векторы или герпесвирусные векторы, но не ограничиваются перечисленными. Невирусные векторы включают плазмиды, липосомы, электрически заряженные липиды (цитофектины), комплексы ДНК-белок и биополимеры.

Термин "клонировующий вектор" относится к "репликону", который представляет собой последовательно реплицирующийся участок нуклеиновой кислоты единичной длины и который содержит точку начала репликации, такому как плазида, фаг или космида, к которому может быть присоединен другой сегмент нуклеиновой кислоты для осуществления репликации присоединенного сегмента. Определенные клонирующие векторы способны к репликации в клетках одного типа, например, в бактериях, и экспрессии в клетках другого типа, например, в клетках эукариот. Клонировующие векторы, как правило, содержат одну или более последовательностей, которые можно использовать для отбора клеток, содержащих данный вектор, и/или один или более сайтов множественного клонирования для вставки целевых последовательностей нуклеиновой кислоты.

Термин "экспрессионный вектор" относится к носителю, разработанному таким образом, чтобы обеспечить экспрессию вставленной последовательности нуклеиновой кислоты после ее введения в клетку-хозяина. Вставленная последовательность нуклеиновой кислоты функционально соединяется с регуляторными областями, как описано выше.

Для введения векторов в клетки-хозяев используются способы, хорошо известные в данной области, например, трансфекция, электропорация, микроинъекция, трансдукция, слияние клеток, обработка ДЭАЭ-декстраном, осаждение фосфатом кальция, липофекция (слияние с липосомами), использование генной пушки или переносчика ДНК-векторов.

В контексте настоящего документа термины "культура", "культивировать" и "культивирование" означают инкубацию клеток в условиях *in vitro*, обеспечивающих их рост и деление, или поддержание жизнеспособности клеток. В контексте настоящего документа термин "культивируемые клетки" означает клетки, которые размножают *in vitro*.

В контексте настоящего документа подразумевается, что термин "полипептид" охватывает единственное число "полипептид" и множественное число "полипептиды" и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" означает любую цепь или цепи из двух и более аминокислот безотносительно к конкретной длине продукта. Таким образом, под определение "полипептид" подпадают пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, "белки", "аминокислотные цепи" или любой другой термин, используемый для обозначения цепи или цепей из двух и более аминокислот, и термин "полипептид" можно использовать вместо любого из этих терминов или взаимозаменяемо с ними. Подразумевается, что термин "полипептид" также относится к продуктам постэкспрессионных модификаций полипептида, включая гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию с помощью известных защитных/блокирующих групп, протеолитическое расщепление или модификацию не встречающимися в природе аминокислотами, но не ограничиваясь перечисленным. Полипептид может быть получен из природного биологического источника или синтезирован с использованием рекомби-

нантных технологий, но не обязательно транслирован с определяющей его последовательности нуклеиновой кислоты. Он может быть получен любым способом, в том числе путем химического синтеза.

"Выделенный" полипептид или его фрагмент, вариант либо производное относится к полипептиду, который находится вне своей естественной среды. Конкретный уровень очистки не требуется. Например, выделенный полипептид может быть просто извлечен из своей нативной или естественной среды. Рекомбинантные полипептиды и белки, экспрессируемые в клетках-хозяевах, считается выделенным для целей настоящего изобретения, как и нативные или рекомбинантные полипептиды, которые были разделены, фракционированы или частично либо существенно очищены любым подходящим способом.

Настоящее изобретение также включает фрагменты или варианты полипептидов и любые их сочетания. Термин "фрагмент" или "вариант" применительно к полипептидным связывающим доменам или связывающим молекулам по настоящему изобретению включает любые полипептиды, сохраняющие по меньшей мере некоторые из свойств (например, аффинность связывания с FcRn для FcRn-связывающего домена или варианта Fc, свертывающая активность для варианта FVIII или FVIII-связывающая активность для фрагмента FВ) полипептида сравнения. Фрагменты полипептидов включают протеолитические фрагменты, делеционные фрагменты, а также фрагменты специфических антител, обсуждаемые в другом месте в настоящем документе, но не включают встречающийся в природе полноразмерный полипептид (или зрелый полипептид). Варианты полипептидных связывающих доменов или связывающих молекул по настоящему изобретению включает фрагменты согласно вышеприведенному описанию, а также полипептиды с аминокислотными последовательностями, измененными вследствие аминокислотных замен, делеций или вставок. Варианты могут встречаться или не встречаться в природе. Не встречающиеся в природе варианты можно получить, применяя методики мутагенеза, известные в данной области техники. Варианты полипептидов могут содержать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, делеций или добавления.

В контексте настоящего документа термин "белок FВ" или "белки FВ" означает любые фрагменты FВ, которые взаимодействуют с FVIII и сохраняют по меньшей мере одно или более свойств, обычно проявляемых полноразмерным FВ в отношении FVIII, например, предотвращение преждевременной активации до FVIIIa, предотвращение преждевременного протеолиза, предотвращение ассоциации с фосфолипидными мембранами, что может привести к преждевременному клиренсу, предотвращение связывания с рецепторами клиренса FVIII, которые могут связывать незащищенный FVIII, но не FVIII, связанный с FВ, и/или стабилизацию взаимодействий между тяжелой цепью и легкой цепью FVIII.

"Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток замещается аминокислотным остатком с аналогичной боковой цепью. В данной области техники определены семейства аминокислотных остатков с аналогичными боковыми цепями, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), полярные незаряженные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Следовательно, если аминокислота в полипептиде замещается другой аминокислотой с боковой цепью того же семейства, замена считается консервативной. В другом варианте реализации изобретения цепочка аминокислот может быть консервативно замещена структурно аналогичной цепочкой, отличающейся порядком и/или составом представителей одного семейства боковых цепей.

Как известно в данной области техники, "идентичность последовательностей" двух полипептидов определяется сравнением аминокислотной последовательности одного полипептида с последовательностью второго полипептида. В случаях, рассмотренных в настоящем документе, идентичность какого-либо конкретного полипептида по меньшей мере на около 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% другому полипептиду можно определить с использованием методов и программного обеспечения/компьютерных программ, известных в данной области техники, включая программу BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package, версия 8 для Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711), но не ограничиваясь ею. Программа BESTFIT использует алгоритм локальной гомологии Смита и Ватермана (Smith и Waterman), *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489, для поиска сегмента с самой высокой степенью сходства между двумя последовательностями. При использовании BESTFIT или другой программы выравнивания последовательностей для определения того, идентична ли конкретная последовательность, например, на 95% последовательности сравнения по настоящему изобретению, разумеется, устанавливают такие параметры, чтобы процент идентичности рассчитывался для всей длины полипептидной последовательности сравнения и чтобы допускались разрывы в гомологии вплоть до 5% от общего количества аминокислот в последовательности сравнения.

В контексте настоящего документа "аминокислота, соответствующая аминокислоте" или "аминокислота, эквивалентная аминокислоте" в последовательности белка FВ или FVIII определяется методом выравнивания, чтобы обеспечить максимальную идентичность или сходность между первой последовательностью FВ или FVIII и второй последовательностью FВ или FVIII. Номер, используемый для иден-

тификации эквивалентной аминокислоты во второй последовательности ФВ или FVIII, основывается на номере, используемом для идентификации соответствующей аминокислоты в первой последовательности ФВ или FVIII.

В контексте настоящего документа термин "сайт встраивания" относится к позиции в пределах полипептида FVIII или его фрагмента, варианта либо производного, расположенной непосредственно выше позиции, в которую может встраиваться гетерологический фрагмент. "Сайт встраивания" указывается в виде числа, представляющего собой номер аминокислоты в зрелом нативном белке FVIII (SEQ ID NO: 65), которой соответствует сайт встраивания, то есть аминокислоты, расположенной непосредственно с N-концевой стороны относительно позиции встраивания. Например, выражение "а3 содержит последовательность XTEN в сайте встраивания, отвечающем аминокислоте 1656 последовательности SEQ ID NO: 65", указывает на то, что гетерологический фрагмент расположен между двумя аминокислотами, соответствующими аминокислоте 1656 и аминокислоте 1657 последовательности SEQ ID NO: 65.

Выражение "непосредственно ниже аминокислоты" в контексте настоящего документа относится к позиции непосредственно рядом с концевой карбоксильной группой аминокислоты. Аналогичным образом, выражение "непосредственно выше аминокислоты" относится к позиции непосредственно рядом с концевой аминогруппой аминокислоты. Следовательно, выражение "между двумя аминокислотами сайта встраивания" в контексте настоящего документа относится к позиции между двумя соседними аминокислотами, в которую встраивается последовательность XTEN или любой другой полипептид. Таким образом, выражения "встроенный непосредственно ниже аминокислоты" и "встроенный между двумя аминокислотами сайта встраивания" используются синонимично выражению "встроенный в сайт встраивания".

Термины "встроена", "встраивается", "встраивается в" или грамматически родственные термины в контексте настоящего документа относятся к позиции последовательности XTEN в химерном полипептиде относительно аналогичной позиции в нативном зрелом белке FVIII человека. В контексте настоящего документа указанные термины касаются сравнительных характеристик рекомбинантного полипептида FVIII и нативного зрелого FVIII человека и не указывают, не подразумевают и не предполагают никаких методов или процессов, посредством которых был создан химерный полипептид. Например, в отношении химерного полипептида, предлагаемого в настоящем изобретении, выражение "последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислотного остатка 745 полипептида FVIII" означает, что химерный полипептид содержит последовательность XTEN непосредственно ниже аминокислоты, соответствующей аминокислоте 745 в нативном зрелом FVIII человека, например, последовательность XTEN, ограниченную аминокислотами, соответствующими аминокислотам 745 и 746 нативного зрелого FVIII человека.

Термин "слитый" или "химерный" белок включает первую аминокислотную последовательность, связанную со второй аминокислотной последовательностью, с которой она естественным образом не связывается в природе. Аминокислотные последовательности, обычно входящие в состав разных белков, могут быть объединены в слитом полипептиде, или же аминокислотные последовательности, обычно существующие в составе одного белка, могут быть расположены в новой конфигурации в составе слитого полипептида, например, в случае слияния домена фактора VIII по настоящему изобретению с доменом Fc иммуноглобулина. Слитый белок создают, например, путем химического синтеза или путем создания и трансляции полинуклеотида, кодирующего пептидные участки в желаемом взаимном расположении. Химерный белок может дополнительно содержать вторую аминокислотную последовательность, соединенную с первой аминокислотной последовательностью ковалентной непептидной связью или нековалентной связью.

В контексте настоящего документа термин "период полувыведения" относится к биологическому периоду полувыведения конкретного полипептида *in vivo*. Период полувыведения может быть представлен как время, необходимое для выведения половины введенной субъекту дозы из кровотока и/или из других тканей животного. При построении графика клиренса заданного полипептида как функции времени обычно отмечают двухфазный процесс с быстрой α -фазой и более продолжительной β -фазой. Как правило, α -фаза отображает уравнивание концентрации введенного полипептида Fc между внутрисосудистым и внесосудистым пространством и частично определяется размером полипептида. β -фаза, как правило, отображает катаболизм полипептида во внутрисосудистом пространстве. В некоторых вариантах реализации изобретения клиренс белка FVIII и химерного белка, содержащего FVIII, подчиняется однофазной модели, следовательно, у них нет альфа-фазы, а только бета-фаза. Таким образом, в определенных вариантах реализации изобретения термин "период полувыведения" в контексте настоящего документа относится к периоду полувыведения полипептида в β -фазе. Обычный период полувыведения человеческого антитела в фазе β у человека составляет 21 день.

Термин "связанный" в контексте настоящего документа относится к первой аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, ковалентно или нековалентно присоединенной ко второй аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности соответственно. Первая аминокислотная последовательность или нуклеотидная последовательность может быть непосредственно соединена или помещена рядом со второй аминокислотной последовательностью или нук-

леотидной последовательностью, либо же, как альтернативный вариант, первая последовательность может ковалентно соединяться со второй последовательностью посредством вставочной последовательности между ними. Термин "связанный" означает не только слияние первой аминокислотной последовательности со второй аминокислотной последовательностью на С-конце или N-конце, но также включает вставку целой первой аминокислотной последовательности (или второй аминокислотной последовательности) между любыми двумя аминокислотами второй аминокислотной последовательности (или первой аминокислотной последовательности соответственно). В одном варианте реализации изобретения первая аминокислотная последовательность может быть связана со второй аминокислотной последовательностью посредством пептидной связи или линкера. Первая нуклеотидная последовательность может быть связана со второй нуклеотидной последовательностью посредством фосфодиэфирной связи или линкера. Линкер может представлять собой пептид или полипептид (для полипептидных цепей), либо нуклеотид или нуклеотидную цепь (для нуклеотидных цепей), или любую химическую структуру (как для полипептидов, так и для полинуклеотидных цепей). Термин "связанный" также обозначен дефисом (-).

В контексте настоящего документа термин "соединенный с" относится к ковалентной или нековалентной связи между первой аминокислотной цепью и второй аминокислотной цепью. В одном варианте реализации изобретения термин "соединенный с" означает ковалентную непептидную связь или нековалентную связь. Данное соединение может обозначаться двоеточием, т.е. (:). В другом варианте реализации изобретения данный термин означает ковалентную связь, за исключением пептидной связи. Например, аминокислота цистеин содержит тиольную группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик с тиольной группой второго остатка цистеина. В большинстве встречающихся в природе молекул IgG области CH1 и CL соединены дисульфидной связью и две тяжелые цепи соединены двумя дисульфидными связями в позициях, соответствующих позициям 239 и 242 согласно системе нумерации по Кабату (позициям 226 или 229 по европейской системе нумерации). Примеры ковалентной связи включают пептидную связь, металлическую связь, водородную связь, дисульфидную связь, сигма-связь, пи-связь, дельта-связь, гликозидную связь, агостическую связь, банановую связь, донорно-акцепторную связь, пи-дативную связь, двойную связь, тройную связь, четверную связь, пятерную связь, шестерную связь, конъюгацию, гиперконъюгацию, ароматичность, гаптность или антисвязывание, но не ограничиваются перечисленным. Неограничивающие примеры нековалентной связи включают ионную связь (например, катион-пи-взаимодействие или солевую связь), металлическую связь, водородную связь (например, диводородную связь, диводородный комплекс, низкобарьерную водородную связь или симметричную водородную связь), силу Ван-дер-Ваальса, лондоновские дисперсионные силы, механическую связь, галогенную связь, ауофильность, интеркаляцию, стэкинг, энтропийную силу или химическую полярность.

Применяемый в настоящем документе термин "мономер-димерный гибрид" относится к химерному белку, содержащему первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, соединенные между собой дисульфидной связью, причем первая цепь содержит фактор свертывания крови, например фактор VIII, и первый фрагмент Fc, а вторая цепь содержит, состоит по существу или состоит из второго фрагмента Fc без фактора свертывания крови. Таким образом, мономер-димерная гибридная конструкция представляет собой гибрид, содержащий мономерную часть со всего лишь одним фактором свертывания крови и димерную часть с двумя фрагментами Fc.

В контексте настоящего документа термин "сайт расщепления" или "сайт ферментативного расщепления" относится к сайту, распознаваемому ферментом. Некоторые сайты ферментативного расщепления содержат сайт внутриклеточного процессинга. В одном варианте реализации изобретения полипептид содержит сайт ферментативного расщепления, расщепляемый ферментом, который активируется во время реакции каскада свертывания крови, так что расщепление таких сайтов происходит в месте образования сгустка. Примеры таких сайтов включают, например, сайты, распознаваемые тромбином, фактором XIa или фактором Ха. Примеры сайтов расщепления фактором XIa включают, например, TQSFNDFTR (SEQ ID NO: 1) и SVSQTSKLTR (SEQ ID NO: 3).

Примеры сайтов расщепления тромбином включают, например,

DFLAEGGGVR (SEQ ID NO: 4), TTKIKPR (SEQ ID NO: 5), LVPRG (SEQ ID NO: 6), ALRPR (SEQ ID NO: 7), ISDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFs (SEQ ID NO: 106), DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFs (SEQ ID NO: 88) и IEPRSFs (SEQ ID NO: 194).

Прочие сайты ферментативного расщепления известны в данной области техники и описаны в других местах настоящего документа.

В контексте настоящего документа термин "сайт процессинга" или "сайт внутриклеточного процессинга" относится к типу сайтов ферментативного расщепления в полипептиде, которые являются мишенью ферментов, выполняющих свою функцию после трансляции полипептида. В одном варианте реализации изобретения такие ферменты выполняют свою функцию во время переноса полипептида из полости аппарата Гольджи в транс-отдел аппарата Гольджи. Ферменты внутриклеточного процессинга расще-

плюют полипептиды перед секрецией белка из клетки. Примеры таких сайтов процессинга включают, например, сайты-мишени PACE/фуринового (где PACE представляет собой сокращение от "Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme" - "фермент, расщепляющий белок в месте спаренных основных аминокислот) семейства эндопептидаз. Эти ферменты сосредоточены на мембране аппарата Гольджи и расщепляют белки на карбоксильном конце мотива Arg-[любой остаток]-(Lys или Arg)-Arg. В контексте настоящего документа "фуриновое" семейство ферментов включает, например, PCSK1 (также известный как PC1/PC3), PCSK2 (также известный как PC2), PCSK3 (также известный как фурин или PACE), PCSK4 (также известный как PC4), PCSK5 (также известный как PC5 or PC6), PCSK6 (также известный как PA-CE4) или PCSK7 (также известный как PC7/LPC, PC8 или SPC7). Прочие сайты процессинга известны в данной области техники.

В конструкциях, включающих более одного сайта процессинга или расщепления, следует понимать, что эти сайты могут быть разными или одними и теми же.

Термин "фурин" относится к ферментам, соответствующим шифру КФ 3.4.21.75. Фурин представляет собой субтилизиноподобную пропротеинконвертазу, также известную как PACE ("Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme" - "фермент, расщепляющий белок в месте спаренных основных аминокислот"). Фурин удаляет фрагменты неактивных белков-предшественников, чтобы преобразовать их в биологически активные белки. Фурин может отщеплять пропептид ФВ от зрелой молекулы ФВ в процессе внутриклеточного транспорта пропептида ФВ. В некоторых вариантах реализации изобретения фурин отщепляет домен D1D2 от домена D'D3 белка ФВ. В других вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность, кодирующая фурин, может экспрессироваться вместе с нуклеотидной последовательностью, кодирующей фрагмент ФВ, в результате чего домены D1D2 могут отщепляться фурином внутри клетки.

В конструкциях, включающих более одного сайта процессинга или расщепления, следует понимать, что эти сайты могут быть разными или одними и теми же.

В контексте настоящего документа термин "процессируемый линкер" относится к линкеру, содержащему по меньшей мере один сайт внутриклеточного процессинга из описанных в другом месте в настоящем документе.

В контексте настоящего документа нарушение гемостаза означает генетически унаследованное или приобретенное состояние, которое характеризуется склонностью к кровотечениям, будь то спонтанным или вызванным травмой, из-за нарушенной или отсутствующей способности к образованию фибринового сгустка. К примерам таких нарушений относятся гемофилии. Тремя основными формами гемофилии являются гемофилия А (недостаточность фактора VIII), гемофилия В (недостаточность фактора IX, или "болезнь Кристмаса") и гемофилия С (недостаточность фактора XI, легкая склонность к кровотечениям). Другие нарушения гемостаза включают, например, болезнь Виллебранда, недостаточность фактора XI (недостаточность плазменного предшественника тромбопластина), недостаточность фактора XII, недостаточности или структурные аномалии фибриногена, протромбина, фактора V, фактора VII, фактора X или фактора XIII, синдром Бернара-Сулье, вызванный дефектом или недостаточностью тромбоцитарного гликопротеина 1b (GPIb). GPIb - рецептор ФВ - может быть дефектным и приводить к нарушению образования первичного сгустка (нарушению первичного гемостаза и повышенной склонности к кровотечениям) и к тромбастении Гланцманна-Негели (тромбастении Гланцманна). При печеночной недостаточности (острой и хронической) печень синтезирует факторы свертывания крови в недостаточном количестве, из-за чего может повышаться риск кровотечения.

Химерные молекулы по настоящему изобретению можно использовать в профилактических целях. В контексте настоящего документа термин "профилактическое лечение" относится к введению молекулы до эпизода кровотечения. В одном варианте реализации изобретения субъект, нуждающийся в общем кровоостанавливающем средстве, подвергается хирургическому вмешательству или собирается перенести хирургическое вмешательство. Химерный белок по данному изобретению может быть введен до или после хирургического вмешательства в качестве профилактического средства. Химерный белок по данному изобретению может быть введен до или после хирургического вмешательства для контроля эпизода острого кровотечения. Хирургическое вмешательство может включать трансплантацию печени, резекцию печени, стоматологические процедуры или трансплантацию стволовых клеток, но не ограничивается перечисленным.

Химерный белок по настоящему изобретению также может использоваться для лечения "по требованию". Термин "лечение по требованию" относится к введению химерной молекулы в ответ на симптомы эпизода кровотечения или перед осуществлением деятельности, которая может привести к кровотечению. В одном аспекте изобретения лечение "по требованию" может предоставляться субъекту после начала кровотечения, например, после повреждения, или в том случае, когда ожидается кровотечение, например, перед хирургическим вмешательством. В другом аспекте изобретения лечение "по требованию" может предоставляться перед деятельностью, которая повышает риск кровотечения, например, перед занятием контактным видом спорта.

В контексте настоящего документа термин "острое кровотечение" относится к эпизоду кровотечения независимо от причины, лежащей в его основе. Например, у субъекта может быть травма, уремия,

наследственное нарушение свертываемости крови (например, недостаточность фактора VII), заболевание тромбоцитов или резистентность, обусловленная выработкой антител к факторам свертывания крови.

В контексте настоящего документа термины "лечить", "лечение", "лечащий" относятся, например, к уменьшению тяжести заболевания или патологического состояния; уменьшению продолжительности течения заболевания; уменьшению одного или более симптомов, связанных с заболеванием или состоянием; оказанию благоприятного эффекта для субъекта с заболеванием или состоянием, не обязательно излечивая это заболевание или состояние, либо профилактике одного или более симптомов, связанных с заболеванием или состоянием. В одном варианте реализации изобретения термин "лечить" или "лечение" означает поддержание минимальной концентрации FVIII на уровне по меньшей мере около 1 МЕ/дл, 2 МЕ/дл, 3 МЕ/дл, 4 МЕ/дл, 5 МЕ/дл, 6 МЕ/дл, 7 МЕ/дл, 8 МЕ/дл, 9 МЕ/дл, 10 МЕ/дл, 11 МЕ/дл, 12 МЕ/дл, 13 МЕ/дл, 14 МЕ/дл, 15 МЕ/дл, 16 МЕ/дл, 17 МЕ/дл, 18 МЕ/дл, 19 МЕ/дл или 20 МЕ/дл у субъекта путем введения химерного белка или фрагмента ФВ по данному изобретению. В другом варианте реализации изобретения "лечить" или "лечение" означает поддержание минимальной концентрации FVIII на уровне от около 1 до около 20 МЕ/дл, от около 2 до около 20 МЕ/дл, от около 3 до около 20 МЕ/дл, от около 4 до около 20 МЕ/дл, от около 5 до около 20 МЕ/дл, от около 6 до около 20 МЕ/дл, от около 7 до около 20 МЕ/дл, от около 8 до около 20 МЕ/дл, от около 9 до около 20 МЕ/дл или от около 10 до около 20 МЕ/дл. Лечение заболевания или патологического состояния также может включать поддержание активности FVIII у субъекта на уровне, сопоставимом с уровнем по меньшей мере около 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% от активности FVIII у субъекта, не болеющего гемофилией. Минимальную концентрацию, требуемую для лечения, можно измерять с помощью одного или более известных методов и можно корректировать (повышать или снижать) для каждого конкретного пациента.

II. Химерные белки.

Настоящее изобретение относится к продлению периода полувыведения химерного белка, в котором используется белок ФВ, слитый с последовательностью XTEN, посредством предотвращения или ингибирования ассоциации фактора, ограничивающего период полувыведения FVIII, т.е. эндогенного ФВ, с белком FVIII. Эндогенный ФВ ассоциирован в нековалентных комплексах с около 95-98% FVIII. Хотя эндогенный ФВ представляет собой фактор, ограничивающий период полувыведения FVIII, также известно, что эндогенный ФВ, связанный с белком FVIII, различными способами защищает белок FVIII. Например, полноразмерный ФВ (в виде мультимера массой около 250 кДа) может защищать FVIII от расщепления протеазами и активации FVIII, стабилизировать тяжелую цепь и/или легкую цепь FVIII и предотвращает клиренс FVIII фагоцитарными рецепторами. Однако в то же время эндогенный ФВ ограничивает период полувыведения FVIII, предотвращая пиноцитоз и выводя комплекс FVIII-ФВ из системы через путь клиренса ФВ. Безотносительно к какой-либо теории, считается, что эндогенный ФВ представляет собой фактор, ограничивающий период полувыведения, который не позволяет продлить период полувыведения химерного белка, слитого с компонентом, продлевающим период полувыведения, более чем примерно вдвое по сравнению с FVIII дикого типа. Следовательно, настоящее изобретение направлено на предотвращение или ингибирование взаимодействия между эндогенным ФВ и белком FVIII благодаря использованию белка ФВ, содержащего домен D' и домен D3 (например, фрагмента ФВ), и в то же время на увеличение периода полувыведения полученного(-ых) в результате белка(-ов) FVIII благодаря использованию последовательности XTEN в сочетании с константной областью ИГ или ее частью. В частности, настоящее изобретение показывает, что более короткая последовательность XTEN (т.е. последовательность XTEN длиной менее 288 аминокислот, т.е. последовательность XTEN короче 288 аминокислот) обеспечивает лучшее продление периода полувыведения химерного белка.

В одном варианте реализации изобретение касается химерного белка, содержащего (i) первый полипептид, состоящий из белка FVIII, слитого с первой константной областью ИГ или ее частью, и (ii) второй полипептид, состоящий из белка ФВ, который включает домен D' и домен D3 ФВ, слитого со второй константной областью ИГ или ее частью посредством расположенной между ними последовательности XTEN, причем последовательность XTEN содержит менее 288 аминокислотных остатков и первый полипептид связан или соединен со вторым полипептидом. В другом варианте реализации последовательность XTEN во втором полипептиде состоит из аминокислотной последовательности длиной от 12 аминокислот до 287 аминокислот. В прочих вариантах реализации химерный белок демонстрирует более продолжительный период полувыведения по сравнению с соответствующим слитым белком, содержащим первый полипептид и второй полипептид, в котором второй полипептид включает последовательность XTEN, содержащую по меньшей мере 288 аминокислот, например, AE288, например, SEQ ID NO: 8. В еще одних вариантах реализации изобретения последовательность XTEN второго полипептида содержит по меньшей мере около 36, по меньшей мере около 42, по меньшей мере около 72 или по меньшей мере около 144 аминокислот, но менее 288 аминокислот, например,

AE42, AE72, AE144 (AE144, AE144_2A, AE144_3B, AE144_4A, AE144_5A, AE144_6B), AG42, AG72 или AG144 (AG144, AG144_A, AG144_B, AG144_C, AG144_F), например, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 57; SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 60; SEQ ID NO: 61; SEQ ID NO: 62; или SEQ ID NO: 63.

Химерный белок по настоящему изобретению может дополнительно содержать вторую последовательность XTEN, которая связывает белок FVIII с первой константной областью ИГ или ее частью.

В определенных вариантах реализации изобретение касается химерного белка, содержащего (i) первый полипептид, состоящий из белка FVIII, слитого с первой константной областью ИГ или ее частью, и (ii) второй полипептид, состоящий из белка ФВ, который включает домен D' и домен D3 ФВ, слитого со второй константной областью ИГ или ее частью посредством расположенной между ними первой последовательности XTEN, причем последовательность XTEN содержит менее 288 аминокислотных остатков, первый полипептид связан или соединен со вторым полипептидом и первый полипептид дополнительно содержит вторую последовательность XTEN, встроенную в один или более сайтов встраивания в пределах белка FVIII или слитую с белком FVIII и/или первой константной областью ИГ или ее частью. Таким образом, в одном варианте реализации изобретения вторая последовательность XTEN встроена в один или более сайтов встраивания в пределах белка FVIII. В другом варианте реализации изобретения вторая последовательность XTEN слита с белком FVIII и/или с первой константной областью ИГ или ее частью. В прочих вариантах реализации изобретения вторая последовательность XTEN встроена в один или более сайтов встраивания в пределах белка FVIII и третья последовательность XTEN слита с белком FVIII и/или с первой константной областью ИГ или ее частью.

Вторая и/или третья последовательности XTEN могут представлять собой аминокислотные последовательности XTEN любой длины. Например, вторая и/или третья последовательности XTEN могут представлять собой последовательности, описанные в другом месте настоящего документа, например,

AE42, AE72, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288 и AG144, например, SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 54; SEQ ID NO: 19; SEQ ID NO: 16; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; SEQ ID NO: 57; SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 60; SEQ ID NO: 61; SEQ ID NO: 62; или SEQ ID NO: 63.

В конкретном варианте реализации изобретения вторая и/или третья последовательности XTEN представляют собой AE288 или AG288, например, SEQ ID NO: 8 или 19.

В определенных вариантах реализации изобретение касается химерного белка, содержащего (i) первый полипептид, состоящий из белка FVIII, слитого с первой константной областью ИГ или ее частью посредством необязательного линкера, причем необязательная последовательность XTEN (X2) встроена в один или более сайтов встраивания в пределах белка FVIII или слита с белком FVIII или первой константной областью ИГ или ее частью, и (ii) второй полипептид, состоящий из белка ФВ, который включает домен D' и домен D3 ФВ, слитого со второй константной областью ИГ или ее частью посредством последовательности XTEN (X1), расположенной между белком ФВ и второй константной областью ИГ или ее частью, причем последовательность XTEN (X1) содержит менее 288 аминокислотных остатков и слита с белком ФВ посредством линкера, и причем первый полипептид соединен со вторым полипептидом. В некоторых вариантах реализации изобретение касается химерного белка, содержащего (i) первый полипептид, состоящий из белка FVIII, слитого с первой константной областью ИГ или ее частью посредством необязательного линкера, причем необязательная последовательность XTEN (X2) встроена в один или более сайтов встраивания в пределах белка FVIII или слита с белком FVIII или первой константной областью ИГ или ее частью, и (ii) второй полипептид, состоящий из белка ФВ, который включает домен D' и домен D3 ФВ, слитого со второй константной областью ИГ или ее частью посредством последовательности XTEN (X1), расположенной между белком ФВ и второй константной областью ИГ или ее частью, причем последовательность XTEN (X1) содержит менее 288 аминокислотных остатков и слита со второй константной областью ИГ или ее частью посредством линкера, и причем первый полипептид соединен со вторым полипептидом. В других вариантах реализации изобретения линкер, посредством которого последовательность XTEN (X1) слита с белком ФВ или со второй константной областью ИГ или ее частью, представляет собой расщепляемый линкер. Неограничивающие примеры расщепляемых линкеров описаны в других местах в данном документе. В конкретном варианте реализации изобретения линкер представляет собой линкер, расщепляемый тромбином.

В некоторых вариантах реализации изобретения химерный белок представляет собой две полипептидные цепи, первая из которых содержит описанный выше первый полипептид, а вторая содержит опи-

санный выше второй полипептид. Например, две полипептидные цепи включают (i) первую цепь, содержащую одноцепочечный белок FVIII, первую константную область ИГ или ее часть и необязательную последовательность XTEN, встроенную в один или более сайтов встраивания в пределах белка FVIII или слитую с белком FVIII или с первой константной областью ИГ или ее частью, и (ii) вторую цепь, содержащую белок ФВ, слитый со второй константной областью ИГ или ее частью посредством расположенной между ними последовательности XTEN (X1), причем последовательность XTEN (X1) содержит менее 288 аминокислот.

В определенных вариантах реализации изобретения химерный белок представляет собой две полипептидные цепи, первая из которых содержит тяжелую цепь белка FVIII, а вторая содержит, в направлении от N-конца до С-конца, легкую цепь белка FVIII, необязательную последовательность XTEN, встроенную в один или более сайтов встраивания в пределах белка FVIII или слитую с белком FVIII или первой константной областью ИГ или ее частью, первую константную область ИГ или ее часть, необязательный линкер (например, процессируемый линкер), белок ФВ, последовательность XTEN (X1), второй необязательный линкер (например, расщепляемый линкер) и вторую константную область ИГ или ее часть.

В других вариантах реализации изобретения химерный белок представляет собой три полипептидные цепи: (i) первую цепь, содержащую тяжелую цепь белка FVIII, (ii) вторую цепь, содержащую легкую цепь белка FVIII, первую константную область ИГ или ее часть и необязательную последовательность XTEN, встроенную в один или более сайтов встраивания в пределах тяжелой цепи или легкой цепи белка FVIII или слитую с белком FVIII или с первой константной областью ИГ или ее частью, и (iii) третью цепь, содержащую белок ФВ, слитый со второй константной областью ИГ или ее частью посредством расположенной между ними последовательности XTEN (X1), причем первая цепь и вторая цепь соединены посредством нековалентной связи, например, металлической связи, а вторая цепь и третья цепь соединены посредством ковалентной связи, например, дисульфидной связи.

В еще одних вариантах реализации изобретения химерный белок представляет собой одноцепочечный белок, содержащий, в направлении от N-конца к С-концу, одноцепочечный белок FVIII, необязательную последовательность XTEN, встроенную в один или более сайтов встраивания в пределах белка FVIII или слитую с белком FVIII или с первой константной областью ИГ или ее частью, необязательный линкер (например, процессируемый линкер), белок ФВ, последовательность XTEN (X1), второй необязательный линкер (например, расщепляемый линкер) и вторую константную область ИГ или ее часть.

В определенных вариантах реализации изобретения химерный белок содержит одну из нижеприведенных формул (a)-(hh):

- (a) FVIII-F1:F2-L2-X-L1-V;
- (b) FVIII-F1:V-L1-X-L2-F2;
- (c) F1-FVIII:F2-L2-X-L1-V;
- (d) F1-FVIII:V-L1-X-L2-F2;

- (e) FVIII-X2-F1:F2-L2-X1-L1-V;
- (f) FVIII-X2-F1:V-L1-X1-L2-F2;
- (g) FVIII(X2)-F1:F2-L2-X1-L1-V;
- (h) FVIII(X2)-F1:V-L1-X1-L2-F2;
- (i) F1-X2-F1:F2-L2-X1-L1-V;
- (j) F1-X2-F1:V-L1-X1-L2-F2;
- (k) V-L1-X-L2-F2-L3-FVIII-L4-F1;
- (l) V-L1-X-L2-F2-L3-F1-L4-FVIII;
- (m) F1-L4-FVIII-L3-F2-L2-X-L1-V;
- (n) FVIII-L4-F1-L3-F2-L2-X-L1-V;
- (o) FVIII-L4-F1-L3-V-L1-X-L2-F2;
- (p) FVIII-L4-F1-L3-F2-L2-X-L1-V;
- (q) F2-L2-X-L1-V-L3-F1-L4-FVIII;
- (r) F2-L2-X-L1-V-L3-FVIII-L4-F1;
- (s) V-L1-X1-L2-F2-L3-FVIII(X2)-L4-F1;
- (t) V-L1-X1-L2-F2-L3-F1-L4-FVIII(X2);
- (u) F1-L4-FVIII(X2)-L3-F2-L2-X1-L1-V;
- (v) F-L4-FVIII(X2)-L3-V-L1-X1-L2-F2;
- (w) FVIII(X2)-L4-F1-L3-V-L1-X1-L2-F2;
- (x) FVIII(X2)-L4-F1-L3-F2-L2-X1-L1-V;
- (y) F2-L2-X1-L1-V-L3-F1-L4-FVIII(X2);
- (z) F2-L2-X1-L1-V-L3-FVIII(X2)-L4-F1;
- (aa) V-L1-X2-L2-F2-L3-FVIII-L4-X2-L5-F1;
- (bb) V-L1-X2-L2-F2-L3-F1-L5-X2-L4-FVIII;
- (cc) F1-L5-X2-L4-FVIII-L3-F2-L2-X2-L1-V;
- (dd) F1-L5-X2-L4-FVIII-L3-V-L1-X2-L2-F2;
- (ee) FVIII-L5-X2-L4-F2-L3-V-L1-X1-L2-F1;
- (ff) FVIII-L5-X2-L4-F2-L3-F1-L2-X1-L1-V;
- (gg) F1-L2-X1-L1-V-L3-F2-L4-X2-L5-FVIII; или
- (hh) F1-L2-X1-L1-V-L3-FVIII-L5-X2-L4-F2;

где V представляет собой белок ФВ, который содержит домен D' и домен D3,
 X или X1 является первой последовательностью XTEN, имеющей менее чем 288 аминокислот,
 X2 представляет собой вторую последовательность XTEN, FVIII включает белок FVIII,
 FVIII(X2), включает белок FVIII, имеющий вторую последовательность XTEN, встроенную в один
 или более сайтов встраивания в пределах белка FVIII,

F1 представляет собой первую константную область ИГ или ее часть,

F2 представляет собой вторую константную область ИГ или ее часть,

L1, L2, L3, L4, или L5 представляют собой необязательный линкер,

(-) представляет собой пептидную связь; и

(:) представляет собой ковалентную связь или нековалентную связь.

В одном варианте реализации изобретения последовательность X или

X1 состоит из аминокислотной последовательности длиной от 12 аминокислот до 287 аминокислот.

В другом варианте реализации изобретения химерный белок демонстрирует более продолжительный период полувыведения по сравнению с соответствующим химерным белком по формуле, где X или X1 представляет собой AE288, например, SEQ ID NO: 8.

В других вариантах реализации изобретения X или X1 в формуле содержит по меньшей мере около

36, по меньшей мере около 42, по меньшей мере около 72 или по меньшей мере около 144 аминокислот, но менее 288 аминокислот, например

AE42, AE72, AE144 (AE144, AE144_2A, AE144_3B, AE144_4A, AE144_5A, AE144_6B),

AG42, AG72 или AG144 (AG144, AG144_A, AG144_B, AG144_C, AG144_F), например,

SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 55; SEQ ID NO: 56; SEQ ID

NO: 57; SEQ ID NO: 58; SEQ ID NO: 59; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 60; SEQ ID NO: 61;

SEQ ID NO: 62; или SEQ ID NO: 63.

Еще в одних вариантах реализации изобретения X2 содержит аминокислотную последовательность длиной по меньшей мере около 36 аминокислот, по меньшей мере 42 аминокислоты, по меньшей мере 144 аминокислоты, по меньшей мере 288 аминокислот, по меньшей мере 576 аминокислот или по меньшей мере 864 аминокислоты, например

AE42, AE72, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576,

AG288 или AG144, например, SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 15; SEQ ID NO:

16; SEQ ID NO: 8; SEQ ID NO: 11; SEQ ID NO: 17; SEQ ID NO: 18; SEQ ID NO: 19; или

SEQ ID NO: 14.

В конкретном варианте реализации изобретения X2 представляет собой AE288 или AG288, например, SEQ ID NO: 8 или 19.

В определенных вариантах реализации изобретения химерный белок, содержащий X или X1 и/или X2, демонстрирует более продолжительный период полувыведения по сравнению с химерным белком, не содержащим X или X1 и/или X2. В других вариантах реализации изобретения L1 и/или L2 представляет собой расщепляемый линкер. Еще в одних вариантах реализации изобретения L4 и/или L5 представляет собой расщепляемый линкер.

II.A. Белки фактора фон Виллебранда (ФВ).

ФВ (также известный как F8ФВ) является большим мультимерным гликопротеином, присутствующим в плазме крови и постоянно производимым в эндотелии (в тельцах Вейбел-Палада), мегакариocyтах (альфа-гранулы тромбоцитов) и субэндотелии соединительной ткани. Основным мономер ФВ является белком, состоящим из 2813 аминокислот. Каждый мономер содержит ряд специфических доменов с определенной функцией, домен D'/D3 (который связывается с фактором VIII), домен A1 (который связывается с тромбоцитарным рецептором GPIIb, гепарином, и/или, возможно, коллагеном), домен A3 (который связывается с коллагеном), домен C1 (в котором домен RGD связывается с тромбоцитарным интегрином $\alpha IIb\beta 3$, когда он активирован) и домен "цистеиновый узел" на С терминальном конце белка (который ФВ разделяет с тромбоцитарным фактором роста (PDGF), трансформирующим фактор роста-бета (TGF- β) и бета-хорионическом гонадотропином человека (PHCG)).

В одном варианте реализации изобретения белок ФВ является фрагментом ФВ. Термин "фрагмент ФВ" в данном контексте включает в себя, но не ограничивается ими, функциональные фрагменты ФВ, содержащие домен D' и домен D3, которые обладают способностью ингибировать связывание эндогенных ФВ с FVIII. В одном варианте реализации изобретения фрагмент ФВ связывается с белком FVIII. В другом варианте реализации изобретения фрагмент ФВ блокирует сайт связывания белка FVIII, тем самым ингибируя взаимодействие белка FVIII с эндогенными ФВ. Фрагменты ФВ включают в себя производные, варианты, мутанты или аналоги, которые сохраняют эту активность ФВ.

Аминокислотная последовательность мономера ФВ человека (2813 аминокислот) описана под номером доступа _NP_000543.2_ в Genbank. Нуклеотидная последовательность, кодирующая ФВ, описана под номером доступа _NM_000552.3_ в Genbank. Нуклеотидная последовательность ФВ человека обозначена как SEQ ID NO: 20. SEQ ID NO: 21 представляет собой аминокислотную последовательность полноразмерного ФВ. Каждый домен ФВ представлен в табл. 1.

Последовательности ФВ

Домены ФВ	Аминокислотная последовательность		
Сигнальный пептид ФВ (Аминокислоты 1-22 из SEQ ID NO: 21)	1	<u>MIPARFAGVL</u> <u>LALALILPGT</u> <u>LC</u>	22
Область D1D2 ФВ (Аминокислоты 23- 763 из SEQ ID NO: 21)	23	AEGTRGRS STARCSLFGS	
		DFVNTFDGSM	
	51	YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE	
		FFDIHLFVNG	
	101	TVTQGDQRVS MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI	
		DGSGNFQVLL	
	151	SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS	
		WALSSGEQWC	
	201	ERASPPSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL	
		VDPEPFVALC	
	251	EKTLCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWTDHSA	
		CSPVCPAGME	
	301	YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG	
		LCVESTPCPC	
	351	VHSGKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV	
		TGQSHFKSFD	
	401	NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIETV QCADDRDAVC	
		TRSVTVRLPG	
	451	LHNSLVKLKH GAGVAMDGQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV	
		RLSYGEDLQM	
	501	DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG	
		LAEPRVEDFG	
	551	NAWKLHGDCQ DLQKQHSDPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP	
		TFEACHRAVS	
	601	PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV	
		AWREPGRCEL	
	651	NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP	
		PGLYMDERGD	
	701	CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM	
		SGVPGSLLPD	
	751	AVLSSPLSHR SKR	763
Домен D' ФВ	764	<u>SLSCRPP MVKLVC PADN LRAEGLECTK</u>	
		<u>TCQNYDLECM</u>	
	801	<u>SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE</u>	
		<u>TVKIGCNTCV</u>	

	851	<u>CRDRKWNCTD HVC DAT</u>	866
Домен D3 ФВ	867	<u>CSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGE CQ</u>	
		<u>YVLVQDYCGS</u>	
	901	<u>NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRV TILVE GGEI E LFDGE</u>	
		<u>VNVKRPMKDE</u>	
	951	<u>THFEV VESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE</u>	
		<u>KVCGLCGNFD</u>	
	1001	<u>GIONNDLTSS NLOVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRK VPLD</u>	
		<u>SSPATCHNNI</u>	
	1051	<u>MKQTMVDSSC RILTSDVFQD CNKLVDP E PY LDVCIYDTCS</u>	
		<u>CESIGDCACF</u>	
Домен A1 ФВ	1101	<u>CDTIAAYAHV CAQH GK VVTW RTATLCPOSC EERNLRENGY</u>	
		<u>ECEWRYNSCA</u>	
	1151	<u>PACQVTCQHP EPLACP VQCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC</u>	
		<u>VDPEDCPVCE</u>	
	1201	<u>VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP</u>	
	1240		
	1241	GGLVVPPTDA	
	1251	PVSPTTLYVE DISEPPLHDF YCSRLLDLVF LLDGSSRLSE	
		AEFEVLKAFV	
	1301	VDMMERLRIS QKWVRVAVVE YHDGSHAYIG LKDRKRPSSEL	
		RRIASQVKYA	
	1351	GSQVASTSEV LKYTLFQIFS KIDRPEASRI ALLLMASQEP	
		QRMSRN FVRY	
	1401	VQGLKKKKVI VIPVGIGPHA NLKQIRLIEK QAPENKAFVL	
		SSVDELEQQR	
	1451	DEIVSYLCDL APEAPPPTLP PDMAQVTVG	1479
	1480	P GLLGVSTLGP KRNSMVL DVA	
	1501	FVLEGSDKIG EADFNRSKEF MEEVIQRMDV GQDSIHVTVL	
		QYSYMVTVEY	
	1551	PFSEAQSKGD ILQRVREIRY QGGNRTNTGL ALRYLSDHSF	
		LVSQGDREQA	1600
	1601	PNLVYMTGN PASDEIKRLP GDIQVVP IGV GPNANVQELE	
		RIGWPNAPIL	
	1651	IQDFETLPRE APDLVLQRCC SGEG LQIPTL SPAPDCSQPL	
		DVILLLDGSS	
	1701	SFPASYFDEM KSFAKAFISK ANIGPRLTQV SVLQYGSITT	
		IDVPWNVVPE	
	1751	KAHLLSLVDV MQREGGPSQI GDALGFAVRY LTSEMHGARP	
		GASKAVVILV	
	1801	TDVSVDSVDA AADAARSNRV TVFPIGIGDR YDAAQLRILA	

		GPAGDSNVVK
	1851	LQRIEDLPTM VTLGNSFLHK LCSGFVRICM DEDGNEKRP DVWTLPDQCH
	1901	TVTCQPDGQT LLKSHRVNCD RGLRPSCPNS QSPVKVEETC GCRWTCPCVC
	1951	TGSSTRHIVT FDGQNFKL TG SCSYVLFQNK EQDLEVILHN GACSPGARQG
	2001	CMKSIEVKHS ALSVEXHSDM EVTVNGRLVS VPYVGGNMEV NVYGAIMHEV
	2051	RFNHLGHIFT FTPQNNEFQL QLSPKTFASK TYGLCGICDE NGANDFMLRD
	2101	GTVTTDWCTL VQEWTVQRPG QTCQPILEEQ CLVPDSSHQC VLLLPLFAEC
	2151	HKVLAPATFY AICQQDSCHQ EQVCEVIASY AHLCRTNGVC VDWRTPDFCA
	2201	MSCPPSLVYN HCEHGCPRHC DGNVSSCGDH PSEGCFPPD KVMLEGSCVP
	2251	EEACTQCIGE DGVQHQFLEA WVPDHQPCQI CTCLSGRKVN CTTQPCPTAK
	2301	APTCGLCEVA RLRQNADQCC PEYECVCDPV SCDLPPVPHC ERGLQPTLTN
	2351	PGECRPNFTC ACRKEECKRV SPPSCPPHRL PTLRKTQCCD EYECACNCVN
	2401	STVSCPLGYL ASTATNDCGC TTTTCLPDKV CVHRSTIYPV GQFWEEGCDV
	2451	CTCTDMEDAV MGLRVAQCSQ KPCEDSCRSG FTYVLHEGEC CGRCLPSACE
	2501	VVTGSPRGDS QSSWKS VGSQ WASPENPCLI NECVRVKEEV FIQQRNVSCP
	2551	QLEVPVCPSP FQLSCKTSAC CPSCRCERME ACMLNGTVIG PGKTVMIDVC
	2601	TTCRCMVQVG VISGFKLECR KTTCNPCPLG YKEENNTGEC CGRCLPTACT
	2651	IQLRGGQIMT LKRDETLQDG CDTHFCKVNE RGEYFWEKRV TGCPPFDEHK
	2701	CLAEKGKIMK IPGTCCDTCE EPECNDITAR LQYVKVGSK SEVEVDIHYC
	2751	QGKCASKAMY SIDINDVQDQ CSCCSPTRTE PMQVALHCTN GSVVYHEVLN
	2801	AMECKCSPRK CSK
	Нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 20)	
Полоноразмерный	1	ATGATTCCTG CCAGATTTGC CGGGGTGCTG CTTGCTCTGG

ΦB	CCCTCATTTT
51	GCCAGGGACC CTTTGTGCAG AAGGAACTCG CGGCAGGTCA TCCACGGCCC
101	GATGCAGCCT TTTCGGAAGT GACTTCGTCA ACACCTTTGA TGGGAGCATG
151	TACAGCTTTG CGGGATACTG CAGTTACCTC CTGGCAGGGG GCTGCCAGAA
201	ACGCTCCTTC TCGATTATTG GGGACTTCCA GAATGGCAAG AGAGTGAGCC
251	TCTCCGTGTA TCTTGGGGAA TTTTGTGACA TCCATTTGTT TGTCAATGGT
301	ACCGTGACAC AGGGGGACCA AAGAGTCTCC ATGCCCTATG CCTCCAAAGG
351	GCTGTATCTA GAAACTGAGG CTGGGTACTA CAAGCTGTCC GGTGAGGCCT
401	ATGGCTTTGT GGCCAGGATC GATGGCAGCG GCAACTTTCA AGTCCTGCTG
451	TCAGACAGAT ACTTCAACAA GACCTGCGGG CTGTGTGGCA ACTTTAACAT
501	CTTTGCTGAA GATGACTTTA TGACCCAAGA AGGGACCTTG ACCTCGGACC
551	CTTATGACTT TGCCAACTCA TGGGCTCTGA GCAGTGGAGA ACAGTGGTGT
601	GAACGGGCAT CTCCTCCAG CAGCTCATGC AACATCTCCT CTGGGGAAAT
651	GCAGAAGGGC CTGTGGGAGC AGTGCCAGCT TCTGAAGAGC ACCTCGGTGT
701	TTGCCCCTG CCACCCTCTG GTGGACCCCG AGCCTTTTGT GGCCCTGTGT
751	GAGAAGACTT TGTGTGAGTG TGCTGGGGGG CTGGAGTGCG CCTGCCCTGC
801	CCTCCTGGAG TACGCCCGGA CCTGTGCCCA GGAGGGAATG GTGCTGTACG
851	GCTGGACCGA CCACAGCGCG TGCAGCCCAG TGTGCCCTGC TGGTATGGAG
901	TATAGGCAGT GTGTGTCCCC TTGCGCCAGG ACCTGCCAGA GCCTGCACAT
951	CAATGAAATG TGTCAGGAGC GATGCGTGGA TGGCTGCAGC TGCCCTGAGG
1001	GACAGCTCCT GGATGAAGGC CTCTGCGTGG AGAGCACCGA GTGTCCCTGC
1051	GTGCATTCCG GAAAGCGCTA CCCTCCCGGC ACCTCCCTCT

	CTCGAGACTG
1101	CAACACCTGC ATTTGCCGAA ACAGCCAGTG GATCTGCAGC AATGAAGAAT
1151	GTCCAGGGGA GTGCCTTGTC ACTGGTCAAT CCCACTTCAA GAGCTTTGAC
1201	AACAGATACT TCACCTTCAG TGGGATCTGC CAGTACCTGC TGGCCCGGGA
1251	TTGCCAGGAC CACTCCTTCT CCATTGTCAT TGAGACTGTC CAGTGTGCTG
1301	ATGACCGCGA CGCTGTGTGC ACCCGCTCCG TCACCGTCCG GCTGCCTGGC
1351	CTGCACAACA GCCTTGTAAG ACTGAAGCAT GGGGCAGGAG TTGCCATGGA
1401	TGGCCAGGAC ATCCAGCTCC CCCTCCTGAA AGGTGACCTC CGCATCCAGC
1451	ATACAGTGAC GGCCTCCGTG CGCCTCAGCT ACGGGGAGGA CCTGCAGATG
1501	GACTGGGATG GCCGCGGGAG GCTGCTGGTG AAGCTGTCCC CCGTCTATGC
1551	CGGGAAGACC TGCGGCCTGT GTGGGAATTA CAATGGCAAC CAGGGCGACG
1601	ACTTCCTTAC CCCCTCTGGG CTGGCRGAGC CCCGGGTGGA GGACTTCGGG
1651	AACGCCTGGA AGCTGCACGG GGAAGTCCAG GACCTGCAGA AGCAGCACAG
1701	CGATCCCTGC GCCCTCAACC CGCGCATGAC CAGGTTCTCC GAGGAGGCGT
1751	GCGCGGTCTT GACGTCCCCC ACATTCGAGG CCTGCCATCG TGCCGTCAGC
1801	CCGCTGCCCT ACCTGCGGAA CTGCCGCTAC GACGTGTGCT CCTGCTCGGA
1851	CGGCCGCGAG TGCCTGTGCG GCGCCCTGGC CAGCTATGCC GCGGCCTGCG
1901	CGGGGAGAGG CGTGCGCGTC GCGTGGCGCG AGCCAGGCCG CTGTGAGCTG
1951	AACTGCCCCA AAGGCCAGGT GTACCTGCAG TCGGGGACCC CCTGCAACCT
2001	GACCTGCCGC TCTCTCTCTT ACCCGGATGA GGAATGCAAT GAGGCCTGCC
2051	TGGAGGGCTG CTTCTGCCCC CCAGGGCTCT ACATGGATGA GAGGGGGGAC
2101	TGCGTGCCCA AGGCCAGTG CCCCTGTTAC TATGACGGTG

	AGATCTTCCA
2151	GCCAGAAGAC ATCTTCTCAG ACCATCACAC CATGTGCTAC TGTGAGGATG
2201	GCTTCATGCA CTGTACCATG AGTGGAGTCC CCGGAAGCTT GCTGCCTGAC
2251	GCTGTCCTCA GCAGTCCCCT GTCTCATCGC AGCAAAAGGA GCCTATCCTG
2301	TCGGCCCCC ATGGTCAAGC TGGTGTGTCC CGCTGACAAC CTGCGGGCTG
2351	AAGGGCTCGA GTGTACCAA ACGTGCCAGA ACTATGACCT GGAGTGCATG
2401	AGCATGGGCT GTGTCTCTGG CTGCCTCTGC CCCCCGGCA TGGTCCGGCA
2451	TGAGAACAGA TGTGTGGCCC TGGAAAGGTG TCCCTGCTTC CATCAGGGCA
2501	AGGAGTATGC CCCTGGAGAA ACAGTGAAGA TTGGCTGCAA CACTTGTGTC
2551	TGTCGGGACC GGAAGTGGAA CTGCACAGAC CATGTGTGTG ATGCCACGTG
2601	CTCCACGATC GGCATGGCCC ACTACCTCAC CTTGACGGG CTCAAATACC
2651	TGTTCCCCGG GGAGTGCCAG TACGTTCTGG TGCAGGATTA CTGCGGCAGT
2701	AACCCTGGGA CCTTTCGGAT CCTAGTGGGG AATAAGGGAT GCAGCCACCC
2751	CTCAGTGAAA TGCAAGAAAC GGGTCACCAT CCTGGTGGAG GGAGGAGAGA
2801	TTGAGCTGTT TGACGGGGAG GTGAATGTGA AGAGGCCAT GAAGGATGAG
2851	ACTCACTTGT AGGTGGTGGG GTCTGGCCGG TACATCATTC TGCTGCTGGG
2901	CAAAGCCCTC TCCGTGGTCT GGGACCGCCA CCTGAGCATC TCCGTGGTCC
2951	TGAAGCAGAC ATACCAGGAG AAAGTGTGTG GCCTGTGTGG GAATTTTGAT
3001	GGCATCCAGA ACAATGACCT CACCAGCAGC AACCTCCAAG TGGAGGAAGA
3051	CCCTGTGGAC TTTGGGAACT CCTGGAAAGT GAGCTCGCAG TGTGCTGACA
3101	CCAGAAAAGT GCCTCTGGAC TCATCCCCTG CCACCTGCCA TAACAACATC
3151	ATGAAGCAGA CGATGGTGGG TTCCTCCTGT AGAATCCTTA

	CCAGTGACGT
3201	CTTCCAGGAC TGCAACAAGC TGGTGGACCC CGAGCCATAT CTGGATGTCT
3251	GCATTACGA CACCTGCTCC TGTGAGTCCA TTGGGGACTG CGCCTGCTTC
3301	TGCGACACCA TTGCTGCCTA TGCCCACGTG TGTGCCCAGC ATGGCAAGGT
3351	GGTGACCTGG AGGACGGCCA CATTGTGCCC CCAGAGCTGC GAGGAGAGGA
3401	ATCTCCGGGA GAACGGGTAT GAGTGTGAGT GGCGCTATAA CAGCTGTGCA
3451	CCTGCCTGTC AAGTCACGTG TCAGCACCTT GAGCCACTGG CCTGCCCTGT
3501	GCAGTGTGTG GAGGGCTGCC ATGCCCACTG CCCTCCAGGG AAAATCCTGG
3551	ATGAGCTTTT GCAGACCTGC GTTGACCCTG AAGACTGTCC AGTGTGTGAG
3601	GTGGCTGGCC GGCGTTTTC CTCAGGAAAG AAAGTCACCT TGAATCCAG
3651	TGACCCTGAG CACTGCCAGA TTTGCCACTG TGATGTTGTC AACCTCACCT
3701	GTGAAGCCTG CCAGGAGCCG GGAGGCCTGG TGGTGCCTCC CACAGATGCC
3751	CCGGTGAGCC CCACCACTCT GTATGTGGAG GACATCTCGG AACCGCCGTT
3801	GCACGATTTC TACTGCAGCA GGCTACTGGA CCTGGTCTTC CTGCTGGATG
3851	GCTCTCCAG GCTGTCCGAG GCTGAGTTT AAGTGCTGAA GGCCTTTGTG
3901	GTGGACATGA TGGAGCGGCT GCGCATCTCC CAGAAGTGGG TCCGCGTGGC
3951	CGTGGTGGAG TACCACGACG GCTCCCACGC CTACATCGGG CTCAAGGACC
4001	GGAAGCGACC GTCAGAGCTG CGGCGCATTG CCAGCCAGGT GAAGTATGCG
4051	GGCAGCCAGG TGGCCTCCAC CAGCGAGGTC TTGAAATACA CACTGTCCA
4101	AATCTTCAGC AAGATCGACC GCCCTGAAGC CTCCCGCATC GCCCTGCTCC
4151	TGATGGCCAG CCAGGAGCCC CAACGGATGT CCCGGAACCT TGTCCGCTAC
4201	GTCCAGGGCC TGAAGAAGAA GAAGGTCATT GTGATCCCGG

	TGGGCATTGG
4251	GCCCCATGCC AACCTCAAGC AGATCCGCCT CATCGAGAAG CAGGCCCCCTG
4301	AGAACAAGGC CTTCGTGCTG AGCAGTGTGG ATGAGCTGGA GCAGCAAAGG
4351	GACGAGATCG TTAGCTACCT CTGTGACCTT GCCCCTGAAG CCCCTCCTCC
4401	TACTCTGCCC CCCGACATGG CACAAGTCAC TGTGGGCCCCG GGGCTCTTGG
4451	GGGTTTCGAC CCTGGGGCCC AAGAGGAACT CCATGGTTCT GGATGTGGCG
4501	TTCGTCCTGG AAGGATCGGA CAAAATTGGT GAAGCCGACT TCAACAGGAG
4551	CAAGGAGTTC ATGGAGGAGG TGATTCAGCG GATGGATGTG GGCCAGGACA
4601	GCATCCACGT CACGGTGCTG CAGTACTCCT ACATGGTGAC CGTGGAGTAC
4651	CCCTTCAGCG AGGCACAGTC CAAAGGGGAC ATCCTGCAGC GGGTGCGAGA
4701	GATCCGCTAC CAGGGCGGCA ACAGGACCAA CACTGGGCTG GCCCTGCGGT
4751	ACCTCTCTGA CCACAGCTTC TTGGTCAGCC AGGGTGACCG GGAGCAGGCG
4801	CCCAACCTGG TCTACATGGT CACCGGAAAT CCTGCCTCTG ATGAGATCAA
4851	GAGGCTGCCT GGAGACATCC AGGTGGTGCC CATTGGAGTG GGCCCTAATG
4901	CCAACGTGCA GGAGCTGGAG AGGATTGGCT GGCCCAATGC CCCTATCCTC
4951	ATCCAGGACT TTGAGACGCT CCCCCGAGAG GCTCCTGACC TGGTGCTGCA
5001	GAGGTGCTGC TCCGGAGAGG GGCTGCAGAT CCCCACCCTC TCCCCTGCAC
5051	CTGACTGCAG CCAGCCCCTG GACGTGATCC TTCTCCTGGA TGGCTCCTCC
5101	AGTTTCCCAG CTTCTTATTT TGATGAAATG AAGAGTTTCG CCAAGGCTTT
5151	CATTTCAAAA GCCAATATAG GGCCTCGTCT CACTCAGGTG TCAGTGCTGC
5201	AGTATGGAAG CATCACCACC ATTGACGTGC CATGGAACGT GGTCCCGGAG
5251	AAAGCCCATT TGCTGAGCCT TGTGGACGTC ATGCAGCGGG

	AGGGAGGCCC
5301	CAGCCAAATC GGGGATGCCT TGGGCTTTGC TGTGCGATAC TTGACTTCAG
5351	AAATGCATGG TGCCAGGCCG GGAGCCTCAA AGGCGGTGGT CATCCTGGTC
5401	ACGGACGTCT CTGTGGATTC AGTGGATGCA GCAGCTGATG CCGCCAGGTC
5451	CAACAGAGTG ACAGTGTTC CTATTGGAAT TGGAGATCGC TACGATGCAG
5501	CCCAGCTACG GATCTTGGCA GGCCCAGCAG GCGACTCCAA CGTGGTGAAG
5551	CTCCAGCGAA TCGAAGACCT CCCTACCATG GTCACCTTGG GCAATTCCTT
5601	CCTCCACAAA CTGTGCTCTG GATTTGTTAG GATTTGCATG GATGAGGATG
5651	GGAATGAGAA GAGGCCCGGG GACGTCTGGA CCTTGCCAGA CCAGTGCCAC
5701	ACCGTGACTT GCCAGCCAGA TGGCCAGACC TTGCTGAAGA GTCATCGGGT
5751	CAACTGTGAC CGGGGGCTGA GGCCTTCGTG CCCTAACAGC CAGTCCCCTG
5801	TTAAAGTGGA AGAGACCTGT GGCTGCCGCT GGACCTGCCC CTGYGTGTGC
5851	ACAGGCAGCT CCACTCGGCA CATCGTGACC TTTGATGGGC AGAATTCAA
5901	GCTGACTGGC AGCTGTTCTT ATGTCCTATT TCAAAACAAG GAGCAGGACC
5951	TGGAGGTGAT TCTCCATAAT GGTGCCTGCA GCCCTGGAGC AAGGCAGGGC
6001	TGCATGAAAT CCATCGAGGT GAAGCACAGT GCCCTCTCCG TCGAGSTGCA
6051	CAGTGACATG GAGGTGACGG TGAATGGGAG ACTGGTCTCT GTTCTTACG
6101	TGGGTGGGAA CATGGAAGTC AACGTTTATG GTGCCATCAT GCATGAGGTC
6151	AGATTCAATC ACCTTGGTCA CATCTTCACA TTCACTCCAC AAAACAATGA
6201	GTTCCAAC TG CAGCTCAGCC CCAAGACTTT TGCTTCAAAG ACGTATGGTC
6251	TGTGTGGGAT CTGTGATGAG AACGGAGCCA ATGACTTCAT GCTGAGGGAT
6301	GGCACAGTCA CCACAGACTG GAAAACACTT GTTCAGGAAT

	GGACTGTGCA
6351	GCGGCCAGGG CAGACGTGCC AGCCCATCCT GGAGGAGCAG TGTCTTGTC
6401	CCGACAGCTC CCACTGCCAG GTCCTCCTCT TACCACTGTT TGCTGAATGC
6451	CACAAGGTCC TGGCTCCAGC CACATTCTAT GCCATCTGCC AGCAGGACAG
6501	TTGCCACCAG GAGCAAGTGT GTGAGGTGAT CGCCTCTTAT GCCCACCTCT
6551	GTCGGACCAA CGGGGTCTGC GTTGACTGGA GGACACCTGA TTTCTGTGCT
6601	ATGTCATGCC CACCATCTCT GGTCTACAAC CACTGTGAGC ATGGCTGTCC
6651	CCGGCACTGT GATGGCAACG TGAGCTCCTG TGGGGACCAT CCCTCCGAAG
6701	GCTGTTTCTG CCCTCCAGAT AAAGTCATGT TGGAAGGCAG CTGTGTCCCT
6751	GAAGAGGCCT GCACTCAGTG CATTGGTGAG GATGGAGTCC AGCACCAGTT
6801	CCTGGAAGCC TGGGTCCCGG ACCACCAGCC CTGTCAGATC TGCACATGCC
6851	TCAGCGGGCG GAAGGTCAAC TGCACAACGC AGCCCTGCCC CACGGCCAAA
6901	GCTCCACAGT GTGGCCTGTG TGAAGTAGCC CGCCTCCGCC AGAATGCAGA
6951	CCAGTGCTGC CCCGAGTATG AGTGTGTGTG TGACCCAGTG AGCTGTGACC
7001	TGCCCCCAGT GCCTCACTGT GAACGTGGCC TCCAGCCCAC ACTGACCAAC
7051	CCTGGCGAGT GCAGACCCAA CTTCACCTGC GCCTGCAGGA AGGAGGAGTG
7101	CAAAAGAGTG TCCCCACCCT CCTGCCCCCC GCACCGTTTG CCCACCCTTC
7151	GGAAGACCCA GTGCTGTGAT GAGTATGAGT GTGCCTGCAA CTGTGTCAAC
7201	TCCACAGTGA GCTGTCCCCT TGGGTACTTG GCCTCAACCG CCACCAATGA
7251	CTGTGGCTGT ACCACAACCA CCTGCCTTCC CGACAAGGTG TGTGTCCACC
7301	GAAGCACCAT CTACCCTGTG GGCCAGTTCT GGGAGGAGGG CTGCGATGTG
7351	TGCACCTGCA CCGACATGGA GGATGCCGTG ATGGGCCTCC

	GCGTGGCCCA
7401	GTGCTCCCAG AAGCCCTGTG AGGACAGCTG TCGGTCGGGC TTCACCTACG
7451	TTCTGCATGA AGGCGAGTGC TGTGGAAGGT GCCTGCCATC TGCCTGTGAG
7501	GTGGTGACTG GCTCACCGCG GGGGGACTCC CAGTCTTCCT GGAAGAGTGT
7551	CGGCTCCCAG TGGGCCTCCC CGGAGAACCC CTGCCTCATC AATGAGTGTG
7601	TCCGAGTGAA GGAGGAGGTC TTTATACAAC AAAGGAACGT CTCCTGCCCC
7651	CAGCTGGAGG TCCCTGTCTG CCCCTCGGGC TTTCAGCTGA GCTGTAAGAC
7701	CTCAGCGTGC TGCCCAAGCT GTCGCTGTGA GCGCATGGAG GCCTGCATGC
7751	TCAATGGCAC TGTCATTGGG CCCGGAAGA CTGTGATGAT CGATGTGTGC
7801	ACGACCTGCC GCTGCATGGT GCAGGTGGGG GTCATCTCTG GATTCAAGCT
7851	GGAGTGCAGG AAGACCACCT GCAACCCCTG CCCCCTGGGT TACAAGGAAG
7901	AAAATAACAC AGGTGAATGT TGTGGGAGAT GTTTGCCTAC GGCTTGCACC
7951	ATTCAGCTAA GAGGAGGACA GATCATGACA CTGAAGCGTG ATGAGACGCT
8001	CCAGGATGGC TGTGATACTC ACTTCTGCAA GGTCAATGAG AGAGGAGAGT
8051	ACTTCTGGGA GAAGAGGGTC ACAGGCTGCC CACCCTTTGA TGAACACAAG
8101	TGTCTTGCTG AGGGAGGTAA AATTATGAAA ATTCCAGGCA CCTGCTGTGA
8151	CACATGTGAG GAGCCTGAGT GCAACGACAT CACTGCCAGG CTGCAGTATG
8201	TCAAGGTGGG AAGCTGTAAG TCTGAAGTAG AGGTGGATAT CCACTACTGC
8251	CAGGGCAAAT GTGCCAGCAA AGCCATGTAC TCCATTGACA TCAACGATGT
8301	GCAGGACCAG TGCTCCTGCT GCTCTCCGAC ACGGACGGAG CCCATGCAGG
8351	TGGCCCTGCA CTGCACCAAT GGCTCTGTTG TGTACCATGA GGTTCTCAAT
8401	GCCATGGAGT GCAAATGCTC CCCCAGGAAG TGCAGCAAGT GA

В данном контексте белок ФВ может быть фрагментом ФВ, содержащим домен D' и домен D3 из ФВ, в котором фрагмент ФВ связывается с фактором VIII (FVIII) и ингибирует связывание эндогенного ФВ (полноразмерного ФВ) с FVIII. Фрагмент ФВ, содержащий домен D' и домен D3 может дополнительно содержать домен ФВ, выбранный из группы, состоящей из домена A1, домена A2, домена A3, домена D1, домена D2, домена D4, домена B1, домена B2, домена B3, домена C1, домена C2, домена СК, одного или нескольких их фрагментов и любых их сочетаний. В одном варианте реализации изобретения фрагмент ФВ содержит, по существу состоит или состоит из: (1) доменов D' и D3 ФВ или их фрагментов; (2)

доменов D1, D' и D3 ФВ или их фрагментов; (3) доменов D2, D' и D3 ФВ или их фрагментов; (4) доменов D1, D2, D' и D3 ФВ или их фрагментов; (5) доменов D1, D2, D', D3 и A1 ФВ или их фрагментов. Фрагмент ФВ, описанные в настоящем документе, не содержит сайта связывания с рецептором клиренса ФВ. В другом варианте реализации изобретения фрагмент ФВ, описанный в настоящем документе, не является аминокислотами 764-1274 из SEQ ID NO: 21. Фрагмент ФВ по настоящему изобретению может включать в себя любые другие последовательности, связанные с или слитые с фрагментом ФВ. Например, фрагмент ФВ, описанный в настоящем документе, может дополнительно содержать сигнальный пептид.

В одном варианте реализации изобретения фрагмент ФВ, содержащий домен D' и домен D3, связывается или соединяется с белком FVIII. Связываясь или соединяясь с белком FVIII, фрагмент ФВ по настоящему изобретению защищает FVIII от расщепления протеазой и активации FVIII, стабилизирует тяжелую цепь и легкую цепь FVIII и предотвращает клиренс FVIII фагоцитарными рецепторами. В другом варианте реализации изобретения фрагмент ФВ связывается или соединяется с белком FVIII и блокирует или предотвращает связывание белка FVIII с фосфолипидом и активированным протеином C. Путем предотвращения или ингибирования связывания белка FVIII с эндогенным полноразмерным ФВ, фрагмент ФВ по настоящему изобретению снижает клиренс FVIII рецепторами клиренса ФВ, таким образом, продлевается период полувыведения химерного белка. Таким образом, увеличение периода полувыведения химерного белка обуславливается связыванием или соединением с фрагментом ФВ, с отсутствующим сайтом связывания рецептора клиренса ФВ, с белком FVIII и экранированием или защитой белка FVIII фрагментом ФВ от эндогенных ФВ, содержащих сайт связывания рецептора клиренса ФВ. Благодаря связыванию или защите белка FVIII фрагментом ФВ может также обеспечиваться рециркуляция белка FVIII. За счет исключения сайтов связывания рецепторов клиренса ФВ, содержащихся в молекуле полноразмерного ФВ, гетеродимеры FVIII/ФВ по настоящему изобретению защищены от клиренса ФВ с дальнейшим увеличением периода полувыведения FVIII.

В одном варианте реализации изобретения белок ФВ, пригодный для использования по настоящему изобретению, содержит домен D' и домен D3 из ФВ, причем домен D' по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен аминокислотам 764-866 из SEQ ID NO: 21, причем белок ФВ предотвращает или ингибирует связывание эндогенного ФВ с FVIII. В другом варианте реализации изобретения белок ФВ содержит домен D' и домен D3 из ФВ, причем домен D3 по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен аминокислотам 867-1240 из SEQ ID NO: 21, причем белок ФВ предотвращает или ингибирует связывание эндогенного ФВ с FVIII. В некоторых вариантах реализации изобретения белок ФВ, описанный в настоящем документе, по существу состоит или состоит из домена D' и домена D3 ФВ, которые по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны аминокислотам 764-1240 SEQ ID NO: 21, причем белок ФВ предотвращает или ингибирует связывание эндогенного ФВ с FVIII. В других вариантах реализации изобретения белок ФВ содержит, по существу состоит или состоит из доменов D1, D2, D' и D3, которые по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны аминокислотам 23-1240 из SEQ ID NO: 21, причем белок ФВ предотвращает или ингибирует связывание эндогенного ФВ с FVIII. В еще одних вариантах реализации изобретения белок ФВ дополнительно содержит сигнальный пептид, функционально связанный с ним.

В некоторых вариантах реализации изобретения белок ФВ, пригодный для использования по настоящему изобретению, по существу состоит или состоит из (1) домена D'D3, домена D1D'D3, домена D2D'D3 или домена D1D2D'D3 и (2) дополнительной последовательности ФВ, размером до около 10 аминокислот (например, любые последовательности от аминокислот 764-1240 из SEQ ID NO: 21, до аминокислот 764-1250 из SEQ ID NO: 21), до около 15 аминокислот (например, любые последовательности от аминокислот 764-1240 из SEQ ID NO: 21 до аминокислот 764-1255 из SEQ ID NO: 21), до около 20 аминокислот (например, любые последовательности от аминокислот 764-1240 из SEQ ID NO: 21 до аминокислот 764-1260 из SEQ ID NO: 21), до около 25 аминокислот (например, любые последовательности от аминокислот 764-1240 из SEQ ID NO: 21 до аминокислот 764-1265 из SEQ ID NO: 21) или до около 30 аминокислот (например, любые последовательности от аминокислот 764-1240 из SEQ ID NO: 21 до аминокислот 764-1260 из SEQ ID NO: 21). В конкретном варианте реализации изобретения белок ФВ, содержащий или по существу состоящий из домена D' и домена D3, не является ни аминокислотами 764-1274 из SEQ ID NO: 21 ни полноразмерным зрелым ФВ. В некоторых вариантах реализации изобретения домен D1D2 экспрессируется в транс положении с доменом D'D3. В некоторых вариантах реализации изобретения домен D1D2 экспрессируется в цис положении с доменом D'D3.

В других вариантах реализации изобретения ФВ белок, содержащий домены D'D3, связанные с доменами D1D2, дополнительно содержит внутриклеточный сайт расщепления, например, (сайт расщепления PACE (фурином) или PC5), позволяющий расщепление доменов D1D2 от доменов D'D3 при экспрессии. Неограничивающие примеры внутриклеточных сайтов расщепления описаны в других местах в настоящем документе.

В еще одних вариантах реализации изобретения белок ФВ содержит домен D' и домен D3, но не содержит аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из (1) аминокислот 1241-2813, соответствующих SEQ ID NO: 21, (2) аминокислот 1270-2813, соответствующих SEQ ID NO: 21, (3)

аминокислот 1271-2813, соответствующих SEQ ID NO: 21, (4) аминокислот 1272-2813, соответствующих SEQ ID NO: 21, (5) аминокислот 1273-2813, соответствующих SEQ ID NO: 21, (6) аминокислот 1274-2813, соответствующих SEQ ID NO: 21 и любых их комбинаций.

В еще одних вариантах реализации изобретения белок ФВ по настоящему изобретению содержит, по существу состоит или состоит из аминокислотной последовательности, соответствующей домену D', домену D3 и домену A1, причем аминокислотная последовательность по меньшей мере на 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотам 764-1479 из SEQ ID NO: 21, причем белок ФВ предотвращает или ингибирует связывание эндогенного ФВ с FVIII. В конкретном варианте реализации изобретения белок ФВ не является аминокислотами 764-1274 из SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах реализации изобретения белок ФВ по настоящему изобретению включает в себя домен D' и домен D3, но не включает в себя по меньшей мере один домен ФВ, выбранный из группы, состоящей из (1) домена A1, (2) домена A2, (3) домена A3, (4) домена D4, (5) домена B1, (6) домена B2, (7) домена B3, (8) домена C1, (9) домена C2, (10) домена CK, (11) домена CK и домена C2, (12) домена CK, домена C2 и домена C1, (13) домена CK, домена C2, домена C1, домена B3, (14) домена CK, домена C2, домена C1, домена B3, домена B2, (15) домена CK, домена C2, домена C1, домена B3, домена B2, и домена B1, (16) домена CK, домена C2, домена C1, домена B3, домена B2, домена B1 и домена D4, (17) домена CK, домена C2, домена C1, домена B3, домена B2, домена B1, домена D4 и домена A3, (18) домена CK, домена C2, домена C1, домена B3, домена B2, домена B1, домена D4, домена A3 и домена A2, (19) домена CK, домена C2, домена C1, домена B3, домена B2, домена B1, домена D4, домена A3, домена A2 и домена A1, и (20) любые их комбинации.

В еще одних вариантах реализации изобретения белок ФВ содержит D'D3 домены и один или более доменов или модулей. Примеры таких доменов или модулей включают в себя, но не ограничиваются ими, домены и модули, описанные в Zhou et al., Blood опубликовано онлайн 6 апреля 2012 года: DOI 10.1182/blood-2012-01-405134, полное содержание которой включено в настоящий документ посредством ссылки. Например, белок ФВ может содержать домен D'D3 и один или более доменов или модулей, выбранных из группы, состоящей из домена A1, домена A2, домена A3, модуля D4N, модуля VWD4, модуля C8-4, модуля TIL-4, модуля C1, модуля C2, модуля C3, модуля C4, модуля C5, модуля C6 и любых их сочетаний.

В еще одних вариантах реализации изобретения белок ФВ связан с гетерологичный фрагментом, причем гетерологичный фрагмент присоединен к N-концу или C-концу белка ФВ или встроен непосредственно ниже одной или более аминокислот (например, один или более сайтов встраивания XTEN) в белке ФВ. Например, сайты встраивания для гетерологичного фрагмента в белок ФВ могут находиться в домене D', домене D3 или обоих доменах. Гетерологичный фрагмент может продлевать период полувыведения.

В некоторых вариантах реализации изобретения белок ФВ, пригодный для использования по настоящему изобретению, образует мультимер, например, димер, тример, тетрамер, пентамер, гексамер, гептамер или мультимеры высшего порядка. В других вариантах реализации изобретения белок ФВ представляет собой мономер, содержащий только один белок ФВ. В некоторых вариантах реализации изобретения белок ФВ по настоящему изобретению может иметь одну или более аминокислотных замен, делеций, вставок или модификаций. В одном варианте реализации изобретения белок ФВ может включать в себя аминокислотные замены, делеций, вставки или модификации таким образом, что белок ФВ теряет способность образовывать дисульфидную связь или образовывать димер или мультимер. В другом варианте реализации изобретения аминокислотная замена находится в пределах домена D' и домена D3. В конкретном варианте реализации изобретения белок ФВ, пригодный для использования по настоящему изобретению, содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в позиции, соответствующей остатку 1099, остатку 1142 или обоим остаткам 1099 и 1142 последовательности SEQ ID NO: 21. По меньшей мере одной аминокислотной заменой могут быть любые аминокислоты, которые не встречающиеся в естественных условиях у ФВ дикого типа. Например, аминокислотной заменой может быть любая аминокислота, отличная от цистеина, например, Изолейцин, аланин, лейцин, аспарагин, лизин, аспарагиновая кислота, метионин, фенилаланин, глутаминовая кислота, треонин, глутамин, триптофан, глицин, валин, пролин, серин, тирозин, аргинин или гистидин. В другом примере аминокислотная замена имеет одну или более аминокислот, которые предотвращают или ингибируют формирования мультимеров у белков ФВ.

В некоторых вариантах реализации изобретения белок ФВ, пригодный для использования по настоящему изобретению, может быть дополнительно модифицирован с целью улучшения его взаимодействия с FVIII, например, чтобы повысить аффинность связывания с FVIII. В качестве не ограничивающего примера, белок ФВ содержит остаток серина в положении, соответствующем аминокислоте 764 из SEQ ID NO: 21 и остаток лизина в положении, соответствующем аминокислоте 773 из SEQ ID NO: 21. Остатки 764 и/или 773 могут способствовать аффинности связывания белков ФВ с FVIII. В других вариантах реализации изобретения белки ФВ, пригодные для использования по настоящему изобретению, могут иметь другие модификации, например, белок может быть ПЭГилированный, гликозилированный, ГЭКирированный или полисиалилированный.

II. В. Последовательности XTEN.

В данном контексте "последовательность XTEN" означает удлиненные полипептиды с неповторяющимися последовательностями неестественного происхождения, которые в основном состоят из малых гидрофильных аминокислот с последовательностью, имеющей низкий уровень или не имеющей вообще вторичной или третичной структуры в физиологических условиях. В качестве партнера химерного белка последовательности XTEN могут служить носителем, придавая определенные желательные фармакокинетические, физико-химические и фармацевтические свойства при соединении с белком ФВ или последовательностью FVIII по настоящему изобретению для создания химерного белка. Такие желательные свойства включают в себя, но не ограничиваются ими, улучшенные фармакокинетические параметры и характеристики растворимости. В данном контексте термин "XTEN" специально исключает антитела и фрагменты антител, такие как одноцепочечные антитела или фрагменты Fc легкой цепи или тяжелой цепи.

Настоящее изобретение относится к более короткой последовательности XTEN, которая обеспечивает улучшенные свойства, касающиеся увеличения периода полувыведения, по сравнению с более длинной последовательностью XTEN, когда последовательность XTEN слита с белком ФВ и/или второй константной областью ИГ или ее частью. Следовательно, последовательность XTEN, слитая с белком ФВ и/или второй константной областью ИГ или ее частью, имеет длину менее 288 аминокислот, то есть короче 288 аминокислот. В одном варианте реализации изобретения последовательность XTEN, слитая с белком ФВ и/или второй константной областью ИГ или ее частью, состоит из аминокислотной последовательности, имеющей длину от 12 до 287 аминокислот. В другом варианте реализации изобретения последовательность XTEN, слитая с белком ФВ и/или второй константной областью ИГ или ее частью, содержит по меньшей мере около 36 аминокислот, по меньшей мере около 42 аминокислоты, по меньшей мере около 72 аминокислоты или по меньшей мере около 144 аминокислоты, но меньше чем 288 аминокислот. В других вариантах реализации изобретения последовательность XTEN, слитая с белком ФВ и/или второй константной областью ИГ или ее частью, выбирается из AE36, AG36, AE42, AG42, AE72, AG72, AE144 или AG144. В одном варианте реализации изобретения последовательность XTEN, слитая с белком ФВ и/или второй константной областью ИГ или ее частью, является аминокислотной последовательностью, идентичной по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% последовательностям SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 14, в которых химерный белок проявляет улучшенный период полувыведения по сравнению с химерным белком без последовательности XTEN.

Химерный белок по настоящему изобретению может также содержать дополнительную (вторую, третью или больше) последовательность XTEN. Дополнительная последовательность XTEN может также быть слита с белком FVIII или с первой константной областью ИГ или ее частью. Дополнительные последовательности XTEN могут иметь любую длину. Например, дополнительная последовательность XTEN, слитая с белком FVIII или первой константной областью ИГ, представляет собой пептид или полипептид, имеющий примерное число аминокислотных остатков более около 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 или 2000. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительная последовательность XTEN представляет собой пептид или полипептид с примерным числом аминокислотных остатков от более около 20 до около 3000 аминокислотных остатков, от более около 30 до около 2500 остатков, от более около 40 до около 2000 остатков, от более около 50 до около 1500 остатков, от более около 60 до около 1000 остатков, от более около 70 до около 900 остатков, от более около 80 до около 800 остатков, от более около 90 до около 700 остатков, от более около 100 до около 600 остатков, от более около 110 до около 500 остатков или более около 120 до около 400 остатков.

Последовательности XTEN (т.е. последовательность XTEN, слитая с белком ФВ и/или второй константной областью ИГ или ее частью, или последовательность XTEN, слитая с белком FVIII и/или первой константной областью ИГ или ее частью, или встроена в один или более сайт встраивания в белке FVIII), могут содержать один или более мотивов последовательности от 9 до 14 аминокислотных остатков или аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% мотиву последовательности, причем мотив включает в себя, по существу состоит или состоит из 4-6 видов аминокислот, выбранных из группы, состоящей из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P). См. US 2010-0239554 A1.

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность XTEN содержит неперекрывающиеся мотивы последовательности, в которых по меньшей мере около 80% или по меньшей мере около 85%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99%, или около 100% последовательности состоит из множества единиц неперекрывающихся последовательностей, выбранных из семейства с одним мотивом из табл. 2A, что дает в результате последовательность семейства. В данном контексте термин "семейство" означает, что XTEN имеет мотивы, выбранные только из одной категории мотивов из табл. 2A; т.е. AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC или BD XTEN, и что любые другие аминокислоты в XTEN не из семейства мотивов

выбирались для достижения необходимого свойства, например, чтобы обеспечить включение сайта рестрикции посредством кодирующих нуклеотидов, включение последовательности для расщепления или для достижения более эффективной связи с FVIII или ФВ. В некоторых вариантах реализации изобретения ХТЕН семейств последовательность ХТЕН включает множество единиц неперекрывающихся мотивов последовательности из семейства мотивов AD, или семейства мотивов AE, или семейства мотивов AF, или семейства мотивов AG, или семейства мотивов AM, или семейства мотивов AQ, или семейства мотивов BC, или семейства мотивов BD, причем выбранная ХТЕН проявляет диапазон гомологии, описанный выше. В других вариантах реализации изобретения ХТЕН включает множество единиц мотивов последовательностей из двух или более семейств мотивов из табл. 2А. Эти последовательности могут быть выбраны для достижения желаемых физических/химических свойств, в том числе таких свойств, как суммарный заряд, гидрофильность, отсутствие вторичной структуры или отсутствие повторяемости, которые предоставляются в соответствии с аминокислотным составом мотивов, который более подробно описан ниже. В вариантах реализации изобретения, описанных выше в этом параграфе, мотивы, внедренные в ХТЕН, могут быть выбраны и собраны с использованием описанных в данном документе способов для достижения размера ХТЕН от около 36 до около 3000 аминокислотных остатков.

Таблица 2А
Мотивы последовательности ХТЕН из 12
аминокислот и семейства мотивов

Семейс тво мотива*	МОТИВ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ
AD	GESPGGSSGSES (SEQ ID NO: 24)
AD	GSEGSSGPGESS (SEQ ID NO: 25)
AD	GSSESGSSEGGP (SEQ ID NO: 26)
AD	GSGGEPSESGSS (SEQ ID NO: 27)
AE, AM	GSPAGSPTSTEE (SEQ ID NO: 28)
AE, AM, AQ	GSEPATSGSETP (SEQ ID NO: 29)
AE, AM, AQ	GTSESATPESGP (SEQ ID NO: 30)
AE, AM, AQ	GTSTEPSEGSAP (SEQ ID NO: 31)
AF, AM	GSTSESPSGTAP (SEQ ID

	NO: 32)
AF, AM	GTSTPESGSASP (SEQ ID NO: 33)
AF, AM	GTSPSGESSTAP (SEQ ID NO: 34)
AF, AM	GSTSSTAESPGP (SEQ ID NO: 35)
AG, AM	GTPGSGTASSSP (SEQ ID NO: 36)
AG, AM	GSSTPSGATGSP (SEQ ID NO: 37)
AG, AM	GSSPSASTGTGP (SEQ ID NO: 38)
AG, AM	GASPGTSSTGSP (SEQ ID NO: 39)
AQ	GEPAGSPTSTSE (SEQ ID NO: 40)
AQ	GTGEPSSTPASE (SEQ ID NO: 41)
AQ	GSGPSTESAPTE (SEQ ID NO: 42)
AQ	GSETPSGPSETA (SEQ ID NO: 43)
AQ	GPSETSTSEPGA (SEQ ID NO: 44)
AQ	GSPSEPTEGTSA (SEQ ID NO: 45)
BC	GSGASEPTSTEP (SEQ ID NO: 46)
BC	GSEPATSGTEPS (SEQ ID NO: 47)
BC	GTSEPSTSEPGA (SEQ ID

	NO: 48)
BC	GTSTEPSEPGSA (SEQ ID NO: 49)
BD	GSTAGSETSTEA (SEQ ID NO: 50)
BD	GSETATSGSETA (SEQ ID NO: 51)
BD	GTSESATSESGA (SEQ ID NO: 52)
BD	GTSTEASEGSAS (SEQ ID NO: 53)

Обозначает отдельные последовательности мотивов, которые, при применении совместно с различными перестановками, дают "последовательность семейства".

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность XTEN, используемая в настоящем изобретении по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из
AE42, AG42, AE48, AM48,

AE72, AG72, AE108, AG108, AE144, AF144, AG144, AE180, AG180, AE216, AG216, AE252, AG252, AE288, AG288, AE324, AG324, AE360, AG360, AE396, AG396, AE432, AG432, AE468, AG468, AE504, AG504, AF504, AE540, AG540, AF540, AD576, AE576, AF576, AG576, AE612, AG612, AE624, AE648, AG648, AG684, AE720, AG720, AE756, AG756, AE792, AG792, AE828, AG828, AD836, AE864, AF864, AG864, AM875, AE912, AM923, AM1318, BC864, BD864, AE948, AE1044, AE1140, AE1236, AE1332, AE1428, AE1524, AE1620, AE1716, AE1812, AE1908, AE2004A, AG948, AG1044, AG1140, AG1236, AG1332, AG1428, AG1524, AG1620, AG1716, AG1812, AG1908 и AG2004. См. US 2010-0239554 A1.

В одном варианте реализации изобретения последовательность XTEN по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

AE42 (SEQ ID NO: 9), AE72 (SEQ ID NO: 10), AE144_2A (SEQ ID NO: 55), AE144_3B (SEQ ID NO: 56), AE144_4A (SEQ ID NO: 57), AE144_5A (SEQ ID NO: 58), AE144_6B (SEQ ID NO: 59), AG144_A (SEQ ID NO: 60), AG144_B (SEQ ID NO: 61), AG144_C (SEQ ID NO: 62), AG144_F (SEQ ID NO: 63), AE864 (SEQ ID NO: 15), AE576 (SEQ ID NO: 16), AE288 (SEQ ID NO: 8), AE288_2 (SEQ ID NO: 54), AE144 (SEQ ID NO: 11), AG864 (SEQ ID NO: 17), AG576 (SEQ ID NO: 18), AG288 (SEQ ID NO: 19), AG144 (SEQ ID NO: 14)

и любую их комбинацию. В другом варианте реализации изобретения последовательность XTEN выбрана из группы, состоящей из

AE42 (SEQ ID NO: 9), AE72 (SEQ ID NO: 10), AE144_2A (SEQ ID NO: 55), AE144_3B (SEQ ID NO: 56), AE144_4A (SEQ ID NO: 57), AE144_5A (SEQ ID NO: 58), AE144_6B (SEQ ID NO: 59), AG144_A (SEQ ID NO: 60), AG144_B (SEQ ID NO: 61), AG144_C (SEQ ID NO: 62), AG144_F (SEQ ID NO: 63), AE864 (SEQ ID NO: 15), AE576 (SEQ ID NO: 16), AE288 (SEQ ID NO: 8), AE288_2 (SEQ ID NO: 54), AE144 (SEQ ID NO: 11), AG864 (SEQ ID NO: 17), AG576 (SEQ ID NO: 18), AG288 (SEQ ID NO: 19), AG144 (SEQ ID NO: 14)

и любую их комбинацию. В конкретном варианте реализации изобретения последовательность XTEN является AE288. Аминокислотные последовательности для определенных последовательностей XTEN по настоящему изобретению приведены в табл. 2B.

Последовательности XTEN

XTEN	Аминокислотная последовательность
AE42 SEQ ID NO: 9	GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS
AE72 SEQ ID NO: 10	GAP TSESATPESG PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG TSTEPSEGS A PGASS
AE144 SEQ ID NO:11	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEG SAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGS A PGTSESA PESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
AE144_2A (SEQ ID NO: 55)	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG
AE144_3B (SEQ ID NO: 56)	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG
AE144_4A	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAG

(SEQ ID NO: 57)	SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AE144_5A (SEQ ID NO: 58)	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG
AE144_6B (SEQ ID NO: 59)	TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AG144 SEQ ID NO:14	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPPTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP
AG144_A (SEQ ID NO: 60)	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP
AG144_B (SEQ ID NO: 61)	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP
AG144_C (SEQ ID NO: 62)	GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP
AG144_F (SEQ ID NO: 63)	GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP
AE288 SEQ ID NO: 8	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPE SGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS

		AP
AE288_2 (SEQ ID NO: 54)		GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG288 SEQ ID NO:19		PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTG TGPSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGAT GSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGS
AE576 SEQ ID NO:16		GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG SPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG576 SEQ ID NO:18		PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPG SSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTG PGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATG SPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT GSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSST

		PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGS STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGS
AE864 SEQ NO:15	ID	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG SPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGT SESATPESG PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG864 SEQ NO:17	ID	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGS PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG PGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGT ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTG TGPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGA TGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGAS
		PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGS STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPG TPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP

В тех вариантах реализации изобретения, в которых компонент(ы) XTEN менее чем на 100% состо-
ят из аминокислот 4, 5 или 6 типов, выбранных из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T),

глутамата (E) и пролина (P), или менее 100% последовательности состоит из мотивов последовательности из табл. 3 или последовательностей XTEN из табл. 4 и 13-17, другие аминокислотные остатки в XTEN могут быть выбраны из любой из остальных 14 природных L-аминокислот, но предпочтительно из гидрофильных аминокислот, таких, чтобы последовательность XTEN содержала по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или по меньшей мере около 99% гидрофильных аминокислот. Аминокислоты XTEN, которые не являются глицином (G), аланином (A), серином (S), треонином (T), глутаматом (E) и пролином (P) могут быть распределены по всей последовательности XTEN, могут быть расположены внутри или между мотивами последовательности или могут быть сконцентрированы в виде одного или более участков последовательности XTEN, например, чтобы создать линкер между XTEN и компонентами FVIII или ФВ. В тех случаях, когда компонент XTEN содержит аминокислоты, отличные от глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), предпочтительно, чтобы менее чем около 2% или менее чем около 1% аминокислотных остатков были гидрофобными, так чтобы полученные в результате последовательности в целом были лишены вторичной структуры, например, имели не более 2% альфа-спиралей или 2% бета-листов, как определено способами, описанными в настоящем документе. Гидрофобные остатки, менее предпочтительные в структуре XTEN, включают триптофан, фенилаланин, тирозин, лейцин, изолейцин, валин и метионин. Кроме того, можно спроектировать последовательности XTEN таким образом, чтобы они содержали менее 5% или менее 4%, или менее 3%, или менее 2%, или менее 1% или не содержали ни одну из следующих аминокислот: цистеин (во избежание образования дисульфида и окисления), метионин (во избежание окисления), аспарагин и глутамин (во избежание дезамидирования). Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения компонент XTEN, содержащий другие аминокислоты в дополнение к глицину (G), аланину (A), серину (S), треонину (T), глутамату (E) и пролину (P), имеет последовательность с менее чем 5% остатков, содействующих образованию альфа-спиралей и бета-листов, согласно алгоритму Чоу-Фасмана, и имеет по меньшей мере 90%, или по меньшей мере около 95%, или больше структур статистического клубка, согласно алгоритму GOR.

В дополнительных вариантах реализации изобретения последовательность XTEN, применяемая в настоящем изобретении, влияет на физическое или химическое свойство, например, фармакокинетику химерного белка по данному изобретению. Последовательность XTEN, применяемая в данном изобретении, может проявлять одно или более из следующих полезных свойств: конформационную гибкость, повышенную растворимость в водной среде, высокую степень устойчивости к протеазам, низкую иммуногенность, низкое сродство с рецепторами клеток млекопитающих и увеличенные гидродинамические (или Стокса) радиусы. В конкретном варианте реализации изобретения последовательность XTEN, связанная с белком FVIII по данному изобретению, улучшает фармакокинетические свойства, такие как увеличение терминального периода полувыведения и увеличение площади под кривой (AUC) таким образом, что химерный белок, описанный в данном документе, остается *in vivo* увеличенный период времени по сравнению с диким типом FVIII. В дополнительных вариантах реализации изобретения последовательность XTEN, применяемая в настоящем изобретении, улучшает фармакокинетические свойства, такие как увеличение терминального периода полувыведения или увеличение площади под кривой (AUC) таким образом, что белок FVIII остается *in vivo* увеличенный период времени по сравнению с диким типом FVIII.

Один вариант реализации по данному изобретению представляет собой слитый белок FVIII/ФВ, содержащий часть FVIII, слитую с фрагментом Fc, и часть ФВ, слитую с Fc фрагментом, в котором последовательность XTEN (например, AE288) вставляется в часть FVIII, и в котором последовательность XTEN содержит менее 288 аминокислот (например, AE144) вставляется между частью ФВ и фрагментом Fc. Как описано в примерах, вставка XTEN, имеющая менее 288 аминокислот, между частью ФВ и частью Fc имеет большее влияние на фармакокинетику химерного белка, чем вставка XTEN, имеющей 288 аминокислот, между частью ФВ и частью Fc. Например, вставка последовательности XTEN, имеющая менее 288 аминокислот, между участком ФВ и фрагментом Fc в слитый белок FVIII/ФВ может увеличить конечный период полувыведения химерного белка по сравнению с XTEN, имеющей 288 аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения конечный период полувыведения увеличивается по меньшей мере на около 5% по меньшей мере на около 10% по меньшей мере на около 15% по меньшей мере на около 20% по меньшей мере на около 25%, или по меньшей мере, на около 30%, по сравнению со вставкой последовательности XTEN, имеющей 288 аминокислот. В одном конкретном варианте реализации изобретения конечный период полувыведения увеличивается по меньшей мере на около 35% по сравнению со вставкой XTEN, имеющей 288 аминокислот. Вставка последовательности XTEN, имеющая менее 288 аминокислот, может также увеличить значение AUC химерного белка. В некоторых вариантах реализации изобретения значение AUC увеличивается по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 100%, или по меньшей мере на около 200% по сравнению со вставкой XTEN, имеющей 288 аминокислот. В конкретном варианте реализации изобретения значение AUC увеличивается примерно в 2 раза. Вставка последовательности XTEN, имеющая менее 288 аминокислот, может также уменьшить клиренс химерного белка. Например, клиренс может быть уменьшен по меньшей мере на около 5% по меньшей мере на около 10% по меньшей мере на около 15% по меньшей мере на около 20% по меньшей мере

мере на около 25%, или по меньшей мере, на около 30%, по сравнению со вставкой последовательности XTEN, имеющей 288 аминокислот. Вставка последовательности XTEN, имеющая менее 288 аминокислот, может увеличить среднее время удержания препарата (MRT) и/или уменьшить кажущийся объем распределения в равновесном состоянии (Vss) по отношению к вставке XTEN, имеющей 288 аминокислот.

Различные способы и анализы могут быть использованы для определения физических/химических свойств белков, содержащих последовательность XTEN. Такие способы включают в себя, но не ограничиваются ими, аналитическое центрифугирование, ЭПР, ионообменную ВЭЖХ, эксклюзионную ВЭЖХ, обращенно-фазовую ВЭЖХ, светорассеяние, капиллярный электрофорез, круговой дихроизм, дифференциальную сканирующую калориметрию, флуоресценцию, ионообменную ВЭЖХ, эксклюзионную ВЭЖХ, ИК, ЯМР, раман-спектроскопию, рефрактометрию и УФ/видимую спектроскопию. Дополнительные способы описаны в Amau et al., *Prot Expr and Purif* 48, 1-13 (2006 год).

Дополнительные примеры последовательностей XTEN, которые могут быть использованы в соответствии с данным изобретением, и раскрыты в патентных публикациях США № 2010/0239554 A1, 2010/0323956 A1, 2011/0046060 A1, 2011/0046061 A1, 2011/0077199 A1 или 2011/0172146 A1, или международных патентных публикациях № WO 2010091122 A1, WO 2010144502 A2, WO 2010144508 A1, WO 2011028228 A1, WO 2011028229 A1, WO 2011028344 A2 или WO 20130122617 A1.

II.C. Белок фактора VIII (FVIII).

В данном контексте "белок FVIII" означает функциональный полипептид FVIII в его нормальной роли в процессе коагуляции, если не указано иное. Термин белок FVIII включает в себя функциональный фрагмент, вариант, аналог или его производное, которое сохраняет функцию полноразмерного фактора VIII дикого типа в каскаде реакций коагуляции. "Белок FVIII" взаимозаменяемо используется с полипептидом (или белком) FVIII или FVIII. Примеры функций FVIII включают, но не ограничиваются ими, способность активировать коагуляцию, способность выступать в качестве кофактора для фактора IX, или способность образовывать теназный комплекс с фактором IX в присутствии Ca^{2+} и фосфолипидов, которые затем преобразует фактор X в активированную форму Xa . Белок FVIII может быть человеческий, свиной, собачий, крысиный или мышинный белок FVIII. Кроме того, сравнение человеческого FVIII с FVIII других видов выявило наличие консервативных остатков, которые могут быть необходимыми для выполнения функции (Cameron et al., *Thromb. Haemost.* 79:317-22 (1998 год); US 6,251,632).

Для оценки функции системы свертывания крови имеется ряд тестов: определение активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), хромогенный анализ, ротационная тромбоэластометрия, определение протромбинового времени (ПТВ) (используется также для определения МНО), определение фибриногена (часто методом Клауса), определение количества тромбоцитов, определение тромбоцитарной функции (часто посредством PFA-100), определение тромбоинового времени, определение времени кровотечения, смешанный анализ (исправляется ли отклонение от нормы, если плазму пациента смешать с нормальной плазмой), определение фактора свертывания крови, определение антифосфолипидных антител, определение D-димеров, генетические тесты (например, фактор V Лейдена, протромбиновая мутация G20210A), определение времени разбавленного яда гадюки Рассела (dRVVT), различные функциональные тесты тромбоцитов, тромбоэластография (ТЭГ или Sonoclot), тромбоэластометрия (TEM®, например, ROTEM®) или определение времени лизиса эуглобулина (ELT).

Тест АЧТВ является показателем эффективности измерения эффективности как "внутренних" (также известный как внутренний путь активации свертывания крови) так и общих каскадов коагуляции. Этот тест обычно используется для измерения коагулирующей активности коммерчески доступных рекомбинантных факторов свертывания крови, например, FVIII или FIX. Он используется в сочетании с тестом на определение протромбинового времени (ПТВ), который измеряет внешний путь активации свертывания крови.

Ротационная тромбоэластометрия предоставляет информацию о всей кинетики гемостаза: время свертывания крови, образование сгустков, стабильность сгустков и лизис. Различные параметры тромбоэластометрии зависят от активности плазматической системы свертывания, функции тромбоцитов, фибринолиза или многих факторов, которые влияют на эти взаимодействия. Этот анализ может предоставить полное представление о вторичном гемостазе.

Полипептид FVIII и последовательности полинуклеотидов являются известными, как и многие другие функциональные фрагменты, мутанты и их модифицированные варианты. Примеры последовательностей человеческого FVIII (полноразмерные) приведены ниже.

Табл. 3. Аминокислотная последовательность полноразмерного фактора VIII (Полноразмерный FVIII (сигнальный пептид FVIII подчеркнут; FVIII тяжелой цепи дважды подчеркнут; Домен В выделен курсивом; и FVIII легкой цепи представлен в виде обычного текста).

Сигнальный пептид: (SEQ ID NO: 64)

MQIELSTCFFLCLLRFCFS

Зрелый фактор VIII (SEQ ID NO: 65)*

ATTRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFPRVPKSPFNTSVVYKKTLEVEF
TDHLFENIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDVTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGA
EYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLN
SGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARA
WPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPFVHSIFLEGHTFLVRNHRQAS
LEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAED
YDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPD
DRSYKSQYLNNGPQIRGRKYKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDILLI
IFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPGKVHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKS
DPRCLTRYSSSFVNMRDLASGLIGPLLCYKESVDQRGNOIMSDKRNVILFVFDENRS
WYLTENIQRFPLNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGA
QTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMT
ALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPEN
 DIEKTDPFWAHRTMPKIQNVSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKEYTFSDDPSPGAIDS
 NNSLSEMTFRPQLHSGDMVFTPESEGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNLISTIPS
 DNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDITLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLESGLMN
 SQESSWGKNVSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGP
 SLLIENSPSVWQNILEDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTSSKNMEMVQKQK
 KEGPIPPDAQNPDMSSFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSKQLVSLGPEKSVEGQN
 FLSEKNKVVVGKEFTKDVGLKEMVFPSSRNFLTNDNLHENNTHNQEKKEIEIEKKEETLI
 QENVVLPQIHVTGTGNFMKNLFLSTRQNVESYDGAAPVLQDFRSLNDSTNRKHTAH
 FSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKALKQFRLPLEETELEKRI
 IVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSF
 PSIRPIYLTRVLFDQNSSHLP AASYRKKDSGVQESSHFLQAKKNLSLAILTLEMTGDQREVG
 SLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSQKVELLPKVHIYQKDLFPETSTNGSPGHLDLVEGS
 LLQGTEGAIKWNEANRPVKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEK
 PEKTAFAKKKDITSLNACESNHAIAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREI
 TRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDY
 GMSSSPHVLNRNAQSGSVQFKKVVFEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE
 DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRNFKVKNETKTYFWKVQHMAPT
 KDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLL VCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDE
 TKSIFYTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQQRIRWY
 LLSMGSNENIHSIHFGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLI
 GEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGGWAPKLARLHYSGSIN
 AWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNST
 GTLMVFFGNVDSSGIKHNFNPPIIARYIRLHPHTHSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGME
 SKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMK
 VTGVTQGVKSLLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFGQNGDSFTPVVNSL
 DPPLLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

Нуклеотидная последовательность, кодирующая
полноразмерный FVIII (SEQ ID NO: 66)*

661 ATG CAAATAGAGC TCTCCACCTG
 721 CTTCTTTCTG TGCCTTTTGC GATTCTGCTT TAGTGCCACC
 AGAAGATACT ACCTGGGTGC
 781 AGTGGAAGCTG TCATGGGACT ATATGCAAAG TGATCTCGGT
 GAGCTGCCTG TGGACGCAAG
 841 ATTTCTCCT AGAGTGCCAA AATCTTTTCC ATTCAACACC
 TCAGTCGTGT AAAAAAGAC
 901 TCTGTTTGTA GAATTCACGG ATCACCTTTT CAACATCGCT
 AAGCCAAGGC CACCCTGGAT
 961 GGGTCTGCTA GGTCTACCA TCCAGGCTGA GGTTTATGAT
 ACAGTGGTCA TTACACTTAA
 1021 GAACATGGCT TCCCATCCTG TCAGTCTTCA TGCTGTTGGT
 GTATCCTACT GGAAAGCTTC
 1081 TGAGGGAGCT GAATATGATG ATCAGACCAG TCAAAGGGAG
 AAAGAAGATG ATAAAGTCTT
 1141 CCCTGGTGGA AGCCATACAT ATGTCTGGCA GGTCCTGAAA
 GAGAATGGTC CAATGGCCTC
 1201 TGACCCACTG TGCCTTACCT ACTCATATCT TTCTCATGTG
 GACCTGGTAA AAGACTTGAA
 1261 TTCAGGCCTC ATTGGAGCCC TACTAGTATG TAGAGAAGGG
 AGTCTGGCCA AGGAAAAGAC
 1321 ACAGACCTTG CACAAATTTA TACTACTTTT TGCTGTATTT
 GATGAAGGGA AAAGTTGGCA
 1381 CTCAGAAACA AAGAACTCCT TGATGCAGGA TAGGGATGCT
 GCATCTGCTC GGGCCTGGCC
 1441 TAAAATGCAC ACAGTCAATG GTTATGTAAA CAGGTCTCTG
 CCAGGTCTGA TTGGATGCCA
 1501 CAGGAAATCA GTCTATTGGC ATGTGATTGG AATGGGCACC
 ACTCCTGAAG TGCACTCAAT

1561 ATTCCTCGAA GGTCACACAT TTCTTGAGAG GAACCATCGC
CAGGCGTCCT TGGAAATCTC

1621 GCCAATAACT TTCCTTACTG CTCAAACACT CTTGATGGAC
CTTGGACAGT TTCTACTGTT

1681 TTGTCATATC TCTTCCCACC AACATGATGG CATGGAAGCT
TATGTCAAAG TAGACAGCTG

1741 TCCAGAGGAA CCCCAACTAC GAATGAAAAA TAATGAAGAA
GCGGAAGACT ATGATGATGA

1801 TCTTACTGAT TCTGAAATGG ATGTGGTCAG GTTTGATGAT
GACAACTCTC CTCCTTTAT

1861 CCAAATTCGC TCAGTTGCCA AGAAGCATCC TAAAACTTGG
GTACATTACA TTGCTGCTGA

1921 AGAGGAGGAC TGGGACTATG CTCCCTTAGT CCTCGCCCCC
GATGACAGAA GTTATAAAAG

1981 TCAATATTTG AACAAATGGCC CTCAGCGGAT TGGTAGGAAG
TACAAAAAAG TCCGATTTAT

2041 GGCATACACA GATGAAACCT TTAAGACTCG TGAAGCTATT
CAGCATGAAT CAGGAATCTT

2101 GGGACCTTTA CTTTATGGGG AAGTTGGAGA CACACTGTTG
ATTATATTTA AGAATCAAGC

2161 AAGCAGACCA TATAACATCT ACCCTCACGG AATCACTGAT
GTCCGTCCTT TGTATTCAAG

2221 GAGATTACCA AAAGGTGTAA AACATTTGAA GGATTTTCCA
ATTCTGCCAG GAGAAATATT

2281 CAAATATAAA TGGACAGTGA CTGTAGAAGA TGGGCCAACT
AAATCAGATC CTCGGTGCCT

2341 GACCCGCTAT TACTCTAGTT TCGTTAATAT GGAGAGAGAT
CTAGCTTCAG GACTCATTGG

2401 CCCTCTCCTC ATCTGCTACA AAGAATCTGT AGATCAAAGA
GGAAACCAGA TAATGTCAGA

2461 CAAGAGGAAT GTCATCCTGT TTTCTGTATT TGATGAGAAC
CGAAGCTGGT ACCTCACAGA

2521 GAATATACAA CGCTTTCTCC CCAATCCAGC TGGAGTGCAG
CTTGAGGATC CAGAGTTCCA

2581 AGCCTCCAAC ATCATGCACA GCATCAATGG CTATGTTTTT
GATAGTTTGC AGTTGTCAGT

2641 TTGTTTGCAT GAGGTGGCAT ACTGGTACAT TCTAAGCATT
GGAGCACAGA CTGACTTCCT

2701 TTCTGTCTTC TTCTCTGGAT ATACCTTCAA ACACAAAATG
GTCTATGAAG ACACACTCAC

2761 CCTATTCCCA TTCTCAGGAG AAAGTGTCTT CATGTTCGATG
GAAAACCCAG GTCTATGGAT

2821 TCTGGGGTGC CACAACCTCAG ACTTTCGGAA CAGAGGCATG
ACCGCCTTAC TGAAGGTTTC

2881 TAGTTGTGAC AAGAACACTG GTGATTATTA CGAGGACAGT
TATGAAGATA TTTCAGCATA

2941 CTTGCTGAGT AAAAACAATG CCATTGAACC AAGAAGCTTC
TCCCAGAATT CAAGACACCC

3001 TAGCACTAGG CAAAAGCAAT TTAATGCCAC CACAATTCCA
GAAAATGACA TAGAGAAGAC

3061 TGACCCTTGG TTTGCACACA GAACACCTAT GCCTAAAATA
CAAAATGTCT CCTCTAGTGA

3121 TTTGTTGATG CTCTTGCGAC AGAGTCCTAC TCCACATGGG
CTATCCTTAT CTGATCTCCA

3181 AGAAGCCAAA TATGAGACTT TTTCTGATGA TCCATCACCT
GGAGCAATAG ACAGTAATAA

3241 CAGCCTGTCT GAAATGACAC ACTTCAGGCC ACAGCTCCAT
CACAGTGGGG ACATGGTATT

3301 TACCCCTGAG TCAGGCCTCC AATTAAGATT AAATGAGAAA
CTGGGGACAA CTGCAGCAAC

3361 AGAGTTGAAG AAAGTTGATT TCAAAGTTTC TAGTACATCA
AATAATCTGA TTCAACAAT

3421 TCCATCAGAC AATTTGGCAG CAGGTACTGA TAATACAAGT
TCCTTAGGAC CCCCAAGTAT

3481 GCCAGTTCAT TATGATAGTC AATTAGATAC CACTCTATTT
GGCAAAAAGT CATCTCCCCT

3541 TACTGAGTCT GGTGGACCTC TGAGCTTGAG TGAAGAAAAT
AATGATTCAA AGTTGTTAGA

3601 ATCAGGTTTA ATGAATAGCC AAGAAAGTTC ATGGGGAAAA
 AATGTATCGT CAACAGAGAG
 3661 TGGTAGGTTA TTAAAGGGA AAAGAGCTCA TGGACCTGCT
 TTGTTGACTA AAGATAATGC
 3721 CTTATTCAAA GTTAGCATCT CTTTGTTAAA GACAAACAAA
 ACTTCCAATA ATTCAGCAAC
 3781 TAATAGAAAG ACTCACATTG ATGGCCCATC ATTATTAATT
 GAGAATAGTC CATCAGTCTG
 3841 GCAAAATATA TTAGAAAGTG AACTGAGTT TAAAAAAGTG
 ACACCTTTGA TTCATGACAG
 3901 AATGCTTATG GACAAAAATG CTACAGCTTT GAGGCTAAAT
 CATATGTCAA ATAAACTAC
 3961 TTCATCAAAA AACATGGAAA TGGTCCAACA GAAAAAAGAG
 GGCCCCATTC CACCAGATGC
 4021 ACAAATCCA GATATGTCGT TCTTTAAGAT GCTATTCTTG
 CCAGAATCAG CAAGGTGGAT
 4081 ACAAAGGACT CATGGAAAGA ACTCTCTGAA CTCTGGGCAA
 GGCCCCAGTC CAAAGCAATT
 4141 AGTATCCTTA GGACCAGAAA AATCTGTGGA AGGTCAGAAT
 TTCTTGCTG AGAAAAACAA
 4201 AGTGGTAGTA GGAAAGGGTG AATTACAAA GGACGTAGGA
 CTCAAAGAGA TGGTTTTTCC
 4261 AAGCAGCAGA AACCTATTTT TACTAACTT GGATAATTTA
 CATGAAAATA ATACACACAA
 4321 TCAAGAAAAA AAAATTCAGG AAGAAATAGA AAAGAAGGAA
 ACATTAATCC AAGAGAATGT
 4381 AGTTTTGCCT CAGATACATA CAGTGACTGG CACTAAGAAT
 TTCATGAAGA ACCTTTTCTT
 4441 ACTGAGCACT AGGCAAAATG TAGAAGGTTC ATATGACGGG
 GCATATGCTC CAGTACTTCA
 4501 AGATTTTAGG TCATTAAATG ATTCAACAAA TAGAACAAAG
 AAACACACAG CTCATTTCTC
 4561 AAAAAAAGGG GAGGAAGAAA ACTTGGAAGG CTTGGGAAAT
 CAAACCAAGC AAATTGTAGA

4621 GAAATATGCA TGCACCACAA GGATATCTCC TAATACAAGC
CAGCAGAATT TTGTACGCA
4681 ACGTAGTAAG AGAGCTTTGA AACAATTCAG ACTCCCCTA
GAAGAAACAG AACTTGAAAA
4741 AAGGATAATT GTGGATGACA CCTCAACCCA GTGGTCCAAA
AACATGAAAC ATTTGACCCC
4801 GAGCACCTC ACACAGATAG ACTACAATGA GAAGGAGAAA
GGGGCCATTA CTCAGTCTCC
4861 CTTATCAGAT TGCCTTACGA GGAGTCATAG CATCCCTCAA
GCAAATAGAT CTCCATTACC
4921 CATTGCAAAG GTATCATCAT TTCCATCTAT TAGACCTATA
TATCTGACCA GGGTCCTATT
4981 CCAAGACAAC TCTTCTCATC TTCCAGCAGC ATCTTATAGA
AAGAAAGATT CTGGGGTCCA
5041 AGAAAGCAGT CATTTCTTAC AAGGAGCCAA AAAAAATAAC
CTTTCTTTAG CCATTCTAAC
5101 CTTGGAGATG ACTGGTGATC AAAGAGAGGT TGGCTCCCTG
GGGACAAGTG CCACAAATTC
5161 AGTCACATAC AAGAAAGTTG AGAACACTGT TCTCCCGAAA
CCAGACTTGC CCAAAACATC
5221 TGGCAAAGTT GAATTGCTTC CAAAAGTTCA CATTATCAG
AAGGACCTAT TCCCTACGGA
5281 AACTAGCAAT GGGTCTCCTG GCCATCTGGA TCTCGTGGA
GGGAGCCTTC TTCAGGGAAC
5341 AGAGGGAGCG ATTAAGTGGA ATGAAGCAA CAGACCTGGA
AAAGTTCCTT TTCTGAGAGT
5401 AGCAACAGAA AGCTCTGCAA AGACTCCCTC CAAGCTATTG
GATCCTCTTG CTTGGGATAA
5461 CCACTATGGT ACTCAGATAC CAAAAGAAGA GTGGAAATCC
CAAGAGAAGT CACCAGAAAA
5521 AACAGCTTTT AAGAAAAAGG ATACCATTTT GTCCCTGAAC
GCTTGTGAAA GCAATCATGC
5581 AATAGCAGCA ATAAATGAGG GACAAAATAA GCCCCGAAATA
GAAGTCACCT GGGCAAAGCA

5641 AGGTAGGACT GAAAGGCTGT GCTCTCAAAA CCCACCAGTC
 TTGAAACGCC ATCAACGGGA
 5701 AATAACTCGT ACTACTCTTC AGTCAGATCA AGAGGAAATT
 GACTATGATG ATACCATATC
 5761 AGTTGAAATG AAGAAGGAAG ATTTTGACAT TTATGATGAG
 GATGAAAATC AGAGCCCCCG
 5821 CAGCTTTCAA AAGAAAACAC GACACTATTT TATTGCTGCA
 GTGGAGAGGC TCTGGGATTA
 5881 TGGGATGAGT AGCTCCCCAC ATGTTCTAAG AAACAGGGCT
 CAGAGTGGCA GTGTCCCTCA
 5941 GTTCAAGAAA GTTGTTTTCC AGGAATTTAC TGATGGCTCC
 TTTACTCAGC CCTTATACCG
 6001 TGGAGAACTA AATGAACATT TGGGACTCCT GGGGCCATAT
 ATAAGAGCAG AAGTTGAAGA
 6061 TAATATCATG GTAAC TTCA GAAATCAGGC CTCTCGTCCC
 TATTCCTTCT ATTCTAGCCT
 6121 TATTTCTTAT GAGGAAGATC AGAGGCAAGG AGCAGAACCT
 AGAAAAAACT TTGTCAAGCC
 6181 TAATGAAACC AAAACTTACT TTTGGAAAGT GCAACATCAT
 ATGGCACCCA CTAAAGATGA
 6241 GTTTGACTGC AAAGCCTGGG CTTATTTCTC TGATGTTGAC
 CTGGAAAAAG ATGTGCACTC
 6301 AGGCCTGATT GGACCCCTTC TGGTCTGCCA CACTAACACA
 CTGAACCCTG CTCATGGGAG
 6361 ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT TTTCACCATC
 TTTGATGAGA CAAAAGCTG
 6421 GTACTTCACT GAAAATATGG AAAGAACTG CAGGGCTCCC
 TGCAATATCC AGATGGAAGA
 6481 TCCCACTTTT AAAGAGAATT ATCGCTTCCA TGCAATCAAT
 GGCTACATAA TGGATACACT
 6541 ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG GATTGATGG
 TATCTGCTCA GCATGGGCAG
 6601 CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTTCA TGGACATGTG
 TTCACTGTAC GAAAAAAGA

6661 GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA TCCAGGTGTT
 TTTGAGACAG TGGAAATGTT
 6721 ACCATCCAAA GCTGGAATTT GCGGGTGGA ATGCCTTATT
 GCGGAGCATC TACATGCTGG
 6781 GATGAGCACA CTTTTCTGG TGTACAGCAA TAAGTGTCAG
 ACTCCCCTGG GAATGGCTTC
 6841 TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA
 TATGGACAGT GGGCCCCAAA
 6901 GCTGGCCAGA CTTCATTATT CCGGATCAAT CAATGCCTGG
 AGCACCAAGG AGCCCTTTTC
 6961 TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGACCAAT GATTATTCAC
 GGCATCAAGA CCCAGGGTGC
 7021 CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC
 ATCATGTATA GTCTTGATGG
 7081 GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC
 TTAATGGTCT TCTTTGGCAA
 7141 TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTAACCCT
 CCAATTATTG CTCGATACAT
 7201 CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCG CAGCACTCTT
 CGCATGGAGT TGATGGGCTG
 7261 TGATTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG AATGGAGAGT
 AAAGCAATAT CAGATGCACA
 7321 GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC
 TGGTCTCCTT CAAAAGCTCG
 7381 ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG
 GTGAATAATC CAAAAGAGTG
 7441 GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA
 GTAACCTACTC AGGGAGTAAA
 7501 ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC
 TCCAGCAGTC AAGATGGCCA
 7561 TCAGTGGACT CTCTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT
 TTTCAGGGAA ATCAAGACTC
 7621 CTTACACCT GTGGTGAACCT CTCTAGACCC ACCGTTACTG
 ACTCGCTACC TTCGAATTCA
 7681 CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG
 GTTCTGGGCT GCGAGGCACA
 7741 GGACCTCTAC

*Подчеркнутые нуклеиновые кислоты кодируют сигнальный пептид

Полипептиды FVIII включают полноразмерный FVIII, полноразмерный FVIII без метионина на N-конце, зрелый FVIII (без сигнальной последовательности), зрелый FVIII с дополнительным метионином на N-конце и/или FVIII с полным или частичным удалением домена В. В определенных вариантах реализации изобретения варианты FVIII включают делеции домена В, будь то частичные или полные делеции.

Последовательность нативного зрелого фактора FVIII человека представлена в SEQ ID NO: 65. Нативный белок FVIII имеет следующую формулу: A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2, где A1, A2, и A3 - структурно родственные "домены А", В - "домены В", C1 и C2 - структурно родственные "домены С", и a1, a2 и a3 - кислые спейсерные участки. Ссылаясь на первичную аминокислотную позицию в SEQ ID NO:65, домен A1 FVIII человека простирается от Ala1 до около Arg336, спейсерный участок a1 простирается около от Met337 до около Val374, домен A2 простирается около от Ala375 до около Tyr719, спейсерный домен a2 простирается около от Glu720 до около Arg740, домен В простирается около от Ser741 до около

Arg1648, спейсерный домен а3 простирается около от Glu1649 до около Arg1689, домен А3 простирается около от Ser1690 до около Leu2025, домен С1 простирается от около Gly2026 до около Asn2072, и домен С2 простирается около от Ser2073 до Tyr2332. Помимо специфических сайтов протеолитического расщепления обозначение расположения границ между доменами и участками FVIII может отличаться в различных литературных источниках. Границы, представленные в настоящем документе, обозначены как приближительные путем использования термина "около".

Ген FVIII человека был выделен и экспрессирован в клетках млекопитающих (Toole, J. J., et al., Nature 312:342-347 (1984 год); Gitschier, J., et al., Nature 312:326-330 (1984 год); Wood, W. I., et al., Nature 312:330-337 (1984 год); Vehar, G A, et al., Nature 312:337-342 (1984 год); WO 87/04187; WO 88/08035; WO 88/03558; и патент США № 4,757,006). Аминокислотная последовательность FVIII была предсказана из кДНК, как показано в патенте США № 4,965,199. Кроме того, FVIII с частично или полностью удаленным доменом В, показан в патентах США № 4,994,371 и 4,868,112. В некоторых вариантах реализации изобретения домен В FVIII человека заменяется на домен В фактора V человека, как показано в патенте США № 5,004,803. Последовательность кДНК, кодирующая фактор VIII человека, и аминокислотная последовательность показаны в SEQ ID NOs: 1 и 2 соответственно из публикации заявки США №2005/0100990.

Последовательность свиного FVIII опубликована в Toole, J. J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5939-5942 (1986 год). Кроме того, полная последовательность свиной кДНК, полученная посредством ПЦР амплификации последовательностей FVIII из библиотеки кДНК из свиной селезенки, описана в Healey, J. F., et al., Blood 88:4209-4214 (1996 год). Гибридный FVIII (человеческий/свиной), имеющий замены всех доменов, всех субъединиц и конкретных аминокислотных последовательностей, описан в патенте США № 5,364,771 в Lollar и Runge и в WO 93/20093. Совсем недавно были описаны нуклеотидные и соответствующие аминокислотные последовательности доменов А1 и А2 свиного FVIII и химерного FVIII, имеющего свиные домены А1 и/или А2, замещающие соответствующие человеческие домены, в WO 94/11503. Патент США № 5,859,204, Lollar, J. S., также описывает свиную кДНК и предсказанные аминокислотные последовательности. Патент США № 6458563 описывает свиную FVIII с удаленным доменом В.

Патент США № 5,859,204, Lollar, J. S. описывает функциональные мутанты FVIII с пониженной антигенностью и пониженной иммунореактивностью. Патент США № 6,376,463, Lollar, J. S. описывает мутанты FVIII с пониженной иммунореактивностью. Публикация заявки США № 2005/0100990 Saenko et al. описывают функциональные мутации в домене А2 FVIII.

В одном варианте реализации изобретения FVIII (или часть FVIII химерного белка) может по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% быть идентичным аминокислотной последовательности FVIII, представляющей собой аминокислоты 1-1438 из SEQ ID NO: 67 или аминокислоты 1-2332 из SEQ ID NO: 65 (без сигнальной последовательности), или аминокислотной последовательности FVIII, представляющей собой аминокислоты 1-19 из SEQ ID NO: 64, и аминокислоты 1-1438 из SEQ ID NO: 67, или аминокислоты 1-19 из SEQ ID NO: 64, и аминокислоты 1-2332 из SEQ ID NO: 65 (с сигнальной последовательностью), в которой FVIII имеет свертывающую активность, например, активирует фактор IX в качестве кофактора, чтобы преобразовать фактор X в активированный фактор X. FVIII (или часть FVIII химерного белка) может быть идентичным аминокислотной последовательности FVIII, представляющей собой аминокислоты 1-1438 из SEQ ID NO: 67 или аминокислоты 1-2332 из SEQ ID NO: 65 (без сигнальной последовательности). FVIII может дополнительно включать сигнальную последовательность.

"Домен В" FVIII в данном контексте является тем же доменом В, известным в данной области техники, который определяется внутренней идентичностью аминокислотной последовательности и сайтов протеолитического расщепления, например, остатки Ser741-Arg1648 полноразмерного FVIII человека. Другие домены FVIII человека определяются следующими аминокислотными остатками: А1, остатки Ala1-Arg372; А2, остатки Ser373-Arg740; А3, остатки Ser1690-Asn2019; С1, остатки Lys2020-Asn2172; С2, остатки Ser2173-Tyr2332. Последовательность А3-С1-С2 включает в себя остатки Ser1690-Tyr2332. Оставшуюся последовательность, остатки Glu1649-Arg1689, обычно называют кислым участком а3. Расположение границ всех доменов, в том числе доменов В свиного, мышинового и собачьего FVIII также известны в данной области техники. В одном варианте реализации изобретения из FVIII удаляется домен В ("фактор VIII с удаленным доменом В" или "FVIII BDD"). Примером BDD FVIII является REFACTO® (рекомбинантный BDD FVIII), который имеет ту же последовательность, что и часть фактора VIII из последовательности в табл. 5. (BDD FVIII тяжелой цепи выделен двойным подчеркиванием; домен В выделен курсивом; и BDD FVIII легкой цепи представлен в виде обычного текста). Нуклеотидная последовательность, кодирующая табл. 6 (SEQ ID NO: 68) представлена в табл. 6.

Таблица 5

Аминокислотная последовательность фактора VIII с
удаленным доменом В (BDD FVIII).

BDD FVIII (SEQ ID NO: 67)

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFPRVPKSPFENTSVVYKKTLEVEF
TDHLENIAPRPPWMGLLGPTIQAEVYDVTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGA
EYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLN
SGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARA
WPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPFVHSIFLEGHTFLVRNHRQAS
LEISPITFLTAQTLMDLGQFLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAED
YDDDLTDSEMDVVRFDDDNPSFQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPD
DRSYKSOYLNNQPORIGRKYKKVREMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLI
IFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKS
DPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQRGNOJMSDKRNVILFESVDENRS
WYLTENIQRFLEPNPAGVQLEDPEFOASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGA
QTDFLSVFFSGYTFKHKMYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMT
ALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNPVLRHQREITRTLQSD
QEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHV
LRNRAQSGSVPQFKKVVFQFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLPYIRAEVEDNIMVTFR
NQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKTYFWKVQHMAPTKDEFDCKA
WAYFSDVDLEKDVHSLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTE
NMERNCRAPCNQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPLGLVMAQDQIRRWYLLSMGSNE
NIHSIHFGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGM
STLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFS
WIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGN
VDSSGIKHNFNPIIARYIRLHPHYSIRSITLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQIT
ASSYFTNMFWATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQG
VKSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYL
RIHPQSVVHQIALRMEVLGCEAQDLY

Таблица 6

Нуклеотидная последовательность, кодирующая
BDD FVIII (SEQ ID NO: 68)*

661 A TGCAAATAGA GCTCTCCACC TGCTTCTTTC
721 TGTGCCTTTT GCGATTCTGC TTTAGTGCCA CCAGAAGATA
CTACCTGGGT GCAGTGGAAC
781 TGTCATGGGA CTATATGCAA AGTGATCTCG GTGAGCTGCC
TGTGGACGCA AGATTTCCTC
841 CTAGAGTGCC AAAATCTTTT CCATTCAACA CCTCAGTCGT
GTACAAAAAG ACTCTGTTTG
901 TAGAATTCAC GGATCACCTT TTCAACATCG CTAAGCCAAG
GCCACCCTGG ATGGGTCTGC
961 TAGGTCCTAC CATCCAGGCT GAGGTTTATG ATACAGTGGT
CATTACACTT AAGAACATGG

1021 CTTCCCATCC TGTCAGTCTT CATGCTGTTG GTGTATCCTA
 CTGGAAAGCT TCTGAGGGAG
 1081 CTGAATATGA TGATCAGACC AGTCAAAGGG AGAAAAGAAGA
 TGATAAAGTC TTCCCTGGTG
 1141 GAAGCCATAC ATATGTCTGG CAGGTCCTGA AAGAGAATGG
 TCCAATGGCC TCTGACCCAC
 1201 TGTGCCTTAC CTACTCATAT CTTTCTCATG TGGACCTGGT
 AAAAGACTTG AATTCAGGCC
 1261 TCATTGGAGC CCTACTAGTA TGTAGAGAAG GGAGTCTGGC
 CAAGGAAAAG ACACAGACCT
 1321 TGCACAAATT TATACTACTT TTTGCTGTAT TTGATGAAGG
 GAAAAGTTGG CACTCAGAAA
 1381 CAAAGAACTC CTTGATGCAG GATAGGGATG CTGCATCTGC
 TCGGGCCTGG CCTAAAATGC
 1441 ACACAGTCAA TGGTTATGTA AACAGGTCTC TGCCAGGTCT
 GATTGGATGC CACAGGAAAT
 1501 CAGTCTATTG GCATGTGATT GGAATGGGCA CCACTCCTGA
 AGTGCACTCA ATATTCCTCG
 1561 AAGGTCACAC ATTTCTTGTG AGGAACCATC GCCAGGCGTC
 CTTGGAAATC TCGCAATAA
 1621 CTTTCCTTAC TGCTCAAACA CTCTTGATGG ACCTTGACAA
 GTTTCTACTG TTTTGTGATA
 1681 TCTCTTCCCA CCAACATGAT GGCATGGAAG CTTATGTCAA
 AGTAGACAGC TGTCAGAGG
 1741 AACCCCAACT ACGAATGAAA AATAATGAAG AAGCGGAAGA
 CTATGATGAT GATCTTACTG
 1801 ATTCTGAAAT GGATGTGGTC AGGTTTGATG ATGACAACTC
 TCCTTCCTTT ATCCAAATTC
 1861 GCTCAGTTGC CAAGAAGCAT CCTAAAACCTT GGGTACATTA
 CATTGCTGCT GAAGAGGAGG
 1921 ACTGGGACTA TGCTCCCTTA GTCCTCGCCC CCGATGACAG
 AAGTTATAAA AGTCAATATT
 1981 TGAACAATGG CCCTCAGCGG ATTGGTAGGA AGTACAAAAA
 AGTCCGATTT ATGGCATACA

2041 CAGATGAAAC CTTTAAGACT CGTGAAGCTA TTCAGCATGA
ATCAGGAATC TTGGGACCTT

2101 TACTTTATGG GGAAGTTGGA GACACACTGT TGATTATATT
TAAGAATCAA GCAAGCAGAC

2161 CATATAACAT CTACCCTCAC GGAATCACTG ATGTCCGTCC
TTTGTATTCA AGGAGATTAC

2221 CAAAAGGTGT AAAACATTTG AAGGATTTTC CAATTCTGCC
AGGAGAAATA TTCAAATATA

2281 AATGGACAGT GACTGTAGAA GATGGGCCAA CTAAATCAGA
TCCTCGGTGC CTGACCCGCT

2341 ATTACTCTAG TTTCGTTAAT ATGGAGAGAG ATCTAGCTTC
AGGACTCATT GGCCCTCTCC

2401 TCATCTGCTA CAAAGAATCT GTAGATCAAA GAGGAAACCA
GATAATGTCA GACAAGAGGA

2461 ATGTCATCCT GTTTTCTGTA TTTGATGAGA ACCGAAGCTG
GTACCTCACA GAGAATATAC

2521 AACGCTTTCT CCCCAATCCA GCTGGAGTGC AGCTTGAGGA
TCCAGAGTTC CAAGCCTCCA

2581 ACATCATGCA CAGCATCAAT GGCTATGTTT TTGATAGTTT
GCAGTTGTCA GTTTGTTTGC

2641 ATGAGGTGGC ATACTGGTAC ATTCTAAGCA TTGGAGCACA
GACTGACTTC CTTTCTGTCT

2701 TCTTCTCTGG ATATACCTTC AAACACAAAA TGGTCTATGA
AGACACACTC ACCCTATTCC

2761 CATTCTCAGG AGAAACTGTC TTCATGTCGA TGGAAAACCC
AGGTCTATGG ATTCTGGGGT

2821 GCCACAACCTC AGACTTTCGG AACAGAGGCA TGACCGCCTT
ACTGAAGGTT TCTAGTTGTG

2881 ACAAGAACAC TGGTGATTAT TACGAGGACA GTTATGAAGA
TATTTTCAGCA TACTTGCTGA

2941 GTAAAAACAA TGCCATTGAA CCAAGAAGCT TCTCTCAAAA
CCCACCAGTC TTGAAACGCC

3001 ATCAACGGGA AATAACTCGT ACTACTCTTC AGTCAGATCA
AGAGGAAATT GACTATGATG

3061 ATACCATATC AGTTGAAATG AAGAAGGAAG ATTTTGACAT
 TTATGATGAG GATGAAAATC
 3121 AGAGCCCCCG CAGCTTTCAA AAGAAAACAC GACACTATTT
 TATTGCTGCA GTGGAGAGGC
 3181 TCTGGGATTA TGGGATGAGT AGCTCCCCAC ATGTTCTAAG
 AAACAGGGCT CAGAGTGGCA
 3241 GTGTCCCTCA GTTCAAGAAA GTTGTTTTCC AGGAATTTAC
 TGATGGCTCC TTTACTCAGC
 3301 CCTTATACCG TGGAGAACTA AATGAACATT TGGGACTCCT
 GGGGCCATAT ATAAGAGCAG
 3361 AAGTTGAAGA TAATATCATG GTAACTTTCA GAAATCAGGC
 CTCTCGTCCC TATTCCTTCT
 3421 ATTCTAGCCT TATTTCTTAT GAGGAAGATC AGAGGCAAGG
 AGCAGAACCT AGAAAAAACT
 3481 TTGTCAAGCC TAATGAAACC AAAACTTACT TTTGGAAAGT
 GCAACATCAT ATGGCACCCA
 3541 CTAAAGATGA GTTTGACTGC AAAGCCTGGG CTTATTTCTC
 TGATGTTGAC CTGGAAAAAG
 3601 ATGTGCACTC AGGCCTGATT GGACCCCTTC TGGTCTGCCA
 CACTAACACA CTGAACCCTG
 3661 CTCATGGGAG ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT
 TTTCACCATC TTTGATGAGA
 3721 CCAAAAGCTG GTACTTCACT GAAAATATGG AAAGAAACTG
 CAGGGCTCCC TGCAATATCC
 3781 AGATGGAAGA TCCCACTTTT AAAGAGAATT ATCGCTTCCA
 TGCAATCAAT GGCTACATAA
 3841 TGGATACACT ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG
 GATTGATGG TATCTGCTCA
 3901 GCATGGGCAG CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTTCA
 TGGACATGTG TTTACTGTAC
 3961 GAAAAAAGA GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA
 TCCAGGTGTT TTTGAGACAG
 4021 TGGAAATGTT ACCATCCAAA GCTGGAATTT GGCGGGTGGA
 ATGCCTTATT GGCGAGCATC

4081 TACATGCTGG GATGAGCACA CTTTTCTGG TGTACAGCAA
 TAAGTGTGAG ACTCCCCTGG
 4141 GAATGGCTTC TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC
 TTCAGGACAA TATGGACAGT
 4201 GGGCCCCAAA GCTGGCCAGA CTTCATTATT CCGGATCAAT
 CAATGCCTGG AGCACCAAGG
 4261 AGCCCTTTTC TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACCAAT
 GATTATTCAC GGCATCAAGA
 4321 CCCAGGGTGC CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC
 TCAGTTTATC ATCATGTATA
 4381 GTCTTGATGG GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC
 CACTGGAACC TTAATGGTCT
 4441 TCTTTGGCAA TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT
 TTTTAACCCCT CCAATTATTG
 4501 CTCGATACAT CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCG
 CAGCACTCTT CGCATGGAGT
 4561 TGATGGGCTG TGATTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG
 AATGGAGAGT AAAGCAATAT
 4621 CAGATGCACA GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT
 GTTTGCCACC TGGTCTCCTT
 4681 CAAAAGCTCG ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG
 GAGACCTCAG GTGAATAATC
 4741 CAAAAGAGTG GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA
 AGTCACAGGA GTAACCTACTC
 4801 AGGGAGTAAA ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA
 GTTCCTCATC TCCAGCAGTC
 4861 AAGATGGCCA TCAGTGGACT CTCTTTTTTC AGAATGGCAA
 AGTAAAGGTT TTTCAGGGAA
 4921 ATCAAGACTC CTTCACACCT GTGGTGAACCT CTCTAGACCC
 ACCGTTACTG ACTCGCTACC
 4981 TTCGAATTCA CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT
 GAGGATGGAG GTTCTGGGCT
 5041 GCGAGGCACA GGACCTCTAC

*Подчеркнутые нуклеиновые кислоты кодируют сигнальный пептид

"FVIII с удаленным доменом В" может иметь полные или частичные делеции, раскрытые в патентах США № 6,316,226, 6,346,513, 7,041,635, 5,789,203, 6,060,447, 5,595,886, 6,228,620, 5,972,885, 6,048,720, 5,543,502, 5,610,278, 5,171,844, 5,112,950, 4,868,112 и 6,458,563. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность FVIII с удаленным доменом В по данному изобретению содержит любую из делеций, описанную в кол. 4, строка 4 до кол. 5, строка 28 и примеры 1-5 патента США № 6,316,226 (также в патенте США 6,346,513). В другом варианте реализации изобретения фактор VIII с удаленным доменом В является S743/Q1638 фактором VIII с удаленным доменом В (SQ BDD FVIII) (например, фактор VIII с делецией от аминокислоты 744 до аминокислоты 1637, например, фактор VIII, имеющий аминокислоты 1-743 и аминокислоты 1638-2332 из SEQ ID NO: 65, т.е. SEQ ID NO: 67). В некоторых вариантах реализации изобретения FVIII с удаленным доменом В по данному изобретению содержит делецию, описанную в кол. 2, строки 26-51 и примеры 5-8 патента США № 5,789,203 (также США 6,060,447, США 5,595,886 и США 6,228,620). В некоторых вариантах реализации изобретения FVIII с удаленным доменом В по данному изобретению содержит делецию, описанную в кол. 1, строки 25 до кол. 2, строка 40 патента США № 5,972,885; кол.6, строки 1-22 и пример 1 патента США № 6,048,720; кол. 2, строки 17-46 патента США № 5 543 502; кол. 4, строка 22 до кол. 5, строка 36 патента США № 5,171,844; кол. 2, строки 55-68, фигуре 2 и пример 1 патента США № 5,112,950; кол. 2, строка 2 до кол. 19, строка 21 и таблица 2 патента США № 4,868,112; кол. 2, строка 1 до кол. 3, строка 19, кол. 3, строка 40 до кол. 4,

строка 67, кол. 7, строка 43 до кол. 8, строка 26 и кол. 11, строка 5 до кол. 13, строка 39 патента США № 7,041,635; или кол. 4, строки 25-53, патента США № 6,458,563. В некоторых вариантах реализации изобретения FVIII с удаленным доменом В имеет делецию большей части домена В, но по-прежнему содержит аминоконцевые последовательности домена В, которые необходимы для протеолитического процессинга первичного продукта трансляции на две полипептидные цепи *in vivo*, как описано в WO 91/09122. В некоторых вариантах реализации изобретения FVIII с удаленным доменом В создан с удаленными аминокислотами 747-1638, т.е. практически полное удаление домена В. Hoebe R.C., et al., J. Biol. Chem. 265 (13): 7318-7323 (1990 год). FVIII с удаленным доменом В может также содержать делецию аминокислот 771-1666 или аминокислот 868-1562 из FVIII. Meulien P., et al., Protein Eng. 2(4): 301-6 (1988 год). Дополнительные делеции домена В, являющиеся частью настоящего изобретения, включают в себя: делеции аминокислот от 982 до 1562 или от 760 до 1639 (Toole et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A (1986 год) 83, 5939-5942)), от 797 до 1562 (Eaton, et al., Biochemistry (1986 год) 25:8343-8347)), от 741 до 1646 (Kaufman (опубликованная заявка PCT № WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver, et al., DNA(1987) 6:553-564)), от 741 до 1648 (Pasek (заявка PCT №88/00831)), или от 816 до 1598, или от 741 до 1648 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988 год) No 82:16-25, EP 295597))). В другом варианте реализации изобретения BDD FVIII включает в себя полипептид FVIII, содержащий фрагменты домена В, которые сохраняют один или более N-связанных сайтов гликозилирования, например остатки 757, 784, 828, 900, 963 или, в некоторых случаях, 943, которые соответствуют аминокислотной последовательности полноразмерной последовательности FVIII. Примеры фрагментов доменом В включают 226 аминокислот или 163 аминокислоты домена В, как описано в Miao, H.Z., et al., Blood 103(a): 3412-3419 (2004 год), Kasuda, A, et al., J. Thromb. Haemost. 6: 1352-1359 (2008 год), и Pipe, S.W., et al., J. Thromb. Haemost. 9: 2235-2242 (2011 год) (т.е. первые 226 аминокислот или 163 аминокислот домена В сохраняются). В еще одних вариантах реализации изобретения BDD FVIII дополнительно содержит точечную мутацию в остатке 309 (от Phe до Ser) для улучшения экспрессии белка BDD FVIII. См. Miao, H.Z., et al., Blood 103(a): 3412-3419 (2004 год). В еще одних вариантах реализации изобретения BDD FVIII включает в себя полипептид FVIII, содержащий часть домена В, но не содержащий один или более сайтов расщепления фурина (например, Arg1313 и Arg 1648). См. Pipe, S.W., et al., J. Thromb. Haemost. 9: 2235-2242 (2011 год). Каждая из вышеупомянутых делеций может быть сделана в любой последовательности FVIII.

В некоторых вариантах реализации изобретения FVIII имеет частичный домен В. В некоторых вариантах реализации изобретения белком FVIII с частичным доменом В является FVIII 198. FVIII 198 представляет собой частичный домен В, содержащий одноцепочечную FVIII_{FC} молекулу-226N6. Номер 226 означает N-конец 226 аминокислоты домена В FVIII, и N6 означает шесть сайтов N-гликозилирования в домене В.

В одном варианте реализации изобретения FVIII расщепляется сразу после аргинина - аминокислота 1648 (в полноразмерном факторе VIII или SEQ ID NO: 65), аминокислота 754 (в S743/Q1638 факторе VIII с удаленным доменом В или SEQ ID NO: 67), или соответствующий остаток аргинина (в других вариантах), что приводит к образованию тяжелой цепи и легкой цепи. В других вариантах реализации изобретения FVIII содержит тяжелую цепь и легкую цепь, которые связаны или соединены с помощью металллической ион-опосредованной нековалентной связи.

В другом варианте реализации изобретения FVIII представляет собой одноцепочечный FVIII, который не был расщеплен сразу после аргинина - аминокислота 1648 (в полноразмерном FVIII или SEQ ID NO: 65), аминокислота 754 (в S743/Q1638 FVIII с удаленным доменом В или SEQ ID NO: 67), или соответствующий остаток аргинина (в других вариантах). Одноцепочечный FVIII может содержать одну или более аминокислотных замен. В одном варианте реализации изобретения аминокислотная замена касается остатка, соответствующего остатку 1648, остатку 1645 или им обоим в полноразмерном полипептиде зрелого фактора VIII (SEQ ID NO: 65), или остатку 754, остатку 751, или им обоим в SQ BDD факторе VIII (SEQ ID NO: 67). Аминокислотной заменой может быть любая аминокислота, кроме аргинина, например, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан, валин, аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутаминовая кислота, глутамин, глицин, пролин, селеноцистеин, серин, тирозин, гистидин, орнитин, пирролизин или таурин.

FVIII дополнительно может быть расщеплен тромбином, а затем активирован как FVIII_a, выступая в качестве кофактора для активированного фактора IX (FIX_a). И активированный FIX вместе с активированным FVIII образует комплекс Хае и преобразует фактор X в активированный фактор X (FX_a). Для активации FVIII расщепляется тромбином после трех остатков аргинина - аминокислоты 372, 740 и 1689 (соответствующие аминокислотам 372, 740 и 795 в последовательности FVIII с удаленным доменом В) в результате расщепления образовывается FVIII_a, имеющий цепи A1 - 50 кДа, A2 - 43 кДа и A3-C1-C2 - 73 кДа. В одном варианте реализации изобретения белок FVIII, пригодный для настоящего изобретения, представляет собой неактивный FVIII. В другом варианте реализации изобретения белок FVIII представляет собой активированный FVIII.

Белок, имеющий полипептид FVIII, связанный или соединенный с белком ФВ может содержать последовательность по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную последовательности SEQ ID NO: 65 или 67, в котором последовательность имеет FVIII свер-

тывающую активность, например, активирующую фактор IX в качестве кофактора для преобразования фактора X в активированный фактор X (FXa).

В данном контексте "гибридные" или "химерные" полипептиды и белки включают в себя сочетание первой полипептидной цепи, например, белок FВ, слитый с последовательностью XTEN, имеющей менее 288 аминокислот, и первой константной областью ИГ или ее частью, и второй полипептидной цепи, например, белок FVIII, слитый со второй константной областью ИГ или ее частью, образуя, таким образом, гетеродимер. В одном варианте реализации изобретения первый полипептид и второй полипептид в гибриде соединены друг с другом посредством белок-белковых взаимодействий, таких как заряд-зарядные или гидрофобные взаимодействия. В другом варианте реализации изобретения первый полипептид содержит слитый белок FВ-XTEN-Fc, и второй полипептид содержит слитый белок FVIII-Fc, образуя гибридный гетеродимер, в котором XTEN содержит менее 288 аминокислот. В других вариантах реализации изобретения первый полипептид содержит слитый белок FВ-XTEN-Fc, и второй полипептид содержит слитый белок FVIII(X)-Fc, образуя гибридный гетеродимер, в котором XTEN содержит менее 288 аминокислот. Первый полипептид и второй полипептид может быть соединен посредством ковалентной связи, например, дисульфидной связи между первым фрагментом Fc и вторым фрагментом Fc. Первый полипептид и второй полипептид дополнительно могут быть соединены друг с другом посредством связывания между фрагментом FВ и белком FVIII.

Белок FVIII, пригодный к использованию в настоящем изобретении, может включать в себя FVIII, имеющий одну или более дополнительных последовательностей XTEN, которые не влияют на свертывающую активность FVIII. Такие последовательности XTEN могут быть слиты с С-концом или N-концом белка FVIII или вставляться между одним или более из двух аминокислотных остатков в белке FVIII, причем вставки не влияют на свертывающую активность или функцию FVIII. В одном варианте реализации изобретения вставки улучшают фармакокинетические свойства белка FVIII (например, период полувыведения). В другом варианте реализации изобретения вставки могут быть множественными, например, больше двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти вставок. Примеры сайтов встраивания включают, но не ограничиваются ими, сайты, перечисленные в таблицах 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или любые их сочетания.

Белок FVIII, связанный с одной или более последовательностями XTEN, может быть представлен в виде FVIII(X2) или FVIII_(a→b)-X-FVIII_(c→d), причем FVIII_(a→b) содержит, по существу состоит или состоит из первой части белка FVIII от аминокислотного остатка "a" до аминокислотного остатка "b"; X2 содержит, по существу состоит или состоит из одной или более последовательностей XTEN, FVIII_(c→d) содержит, по существу состоит или состоит из второй части белка FVIII от аминокислотного остатка "c" до аминокислотного остатка "d";

a является N-концевым аминокислотным остатком первой части белка FVIII,

b является С-концевым аминокислотным остатком первой части белка FVIII, но также является N-концевым аминокислотным остатком двух аминокислот сайта встраивания, в который вставляется последовательность XTEN,

c является N-концевым аминокислотным остатком второй части белка FVIII, но также является С-концевым аминокислотным остатком двух аминокислот сайта встраивания, в который вставляется последовательность XTEN, и

d является С-концевым аминокислотным остатком белка FVIII, и

при этом первая часть белка FVIII и вторая часть белка FVIII не совпадают друг с другом и вместе имеют достаточную длину, чтобы белок FVIII имел свертывающую активность FVIII.

В одном варианте реализации изобретения первая часть белка FVIII и вторая часть белка FVIII являются фрагментами SEQ ID NO: 65 (полноразмерная зрелая последовательность FVIII) или SEQ ID NO: 67 (FVIII с удаленным доменом В), например, N-концевая часть и С-концевая часть соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая часть белка FVIII содержит домен А1 и домен А2 белка FVIII. Вторая часть белка FVIII содержит домен А3, домен С1 и, в некоторых случаях, домен С2. В еще одних вариантах реализации изобретения первая часть белка FVIII содержит домен А1 и домен А2, и вторая часть белка FVIII содержит часть домена В, домен А3, домен С1 и, в некоторых случаях, домен С2. В еще одних вариантах реализации изобретения первая часть белка FVIII включает домен А1 домен А2 и часть домена В белка FVIII, а вторая часть белка FVIII содержит домен А3, домен С1, и, в некоторых случаях, домен С2. В еще одних вариантах реализации изобретения первая часть белка FVIII содержит домен А1, домен А2 и первую часть домена В белка FVIII. Вторая часть белка FVIII содержит вторую часть домена В, домен А3, домен С1 и, в некоторых случаях, домен С2. В некоторых вариантах реализации изобретения две аминокислоты ("b" и "c") могут представлять собой один или более сайтов встраивания аминокислотных остатков, приведенных в табл. 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15. Например, "b" может быть аминокислотным остатком, расположенным непосредственно выше сайта, в который одна или более последовательностей XTEN вставлены или связаны, и "c" может быть аминокислотным остатком, расположенным непосредственно ниже сайта, в который одна или более последовательностей XTEN вставлены или связаны. В некоторых вариантах реализации изобретения "a" является первой зре-

лой аминокислотной последовательностью белка FVIII, и "d" является последней аминокислотной последовательностью белка FVIII. Например, FVIII_(a→b) может быть аминокислотной последовательностью по меньшей мере на 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотам 1-745 из SEQ ID NO: 67 (аминокислотная последовательность FVIII с удаленным доменом В) или SEQ ID NO: 65 (полноразмерный FVIII), и FVIII_(c→d) может быть аминокислотами 746-1438 из SEQ ID NO: 67 или аминокислотами 1641-2332 из SEQ ID NO: 65, соответственно.

В некоторых аспектах сайт встраивания в белке FVIII расположен в пределах одного или более доменов белка FVIII, которыми являются N-конец, домен A1, домен A2, домен A3, домен В, домен C1, домен C2, С-конец или два или более их сочетания, или между двумя доменами белка FVIII, которыми являются домен A1 и кислая область a1, и кислая область a1 и домен A2, домен A2 и a2 кислая область, кислая область a2 и домен В, домен В и домен A3, и домен A3 и домен C1, домен C1 и домен C2 или любые их сочетания. Например, сайты встраивания, в которые последовательность XTEN может быть вставлена, выбрана из группы, состоящей из N-конца и домена A1, N-конца и домена A2, N-конца и домена A3, N-конца и домена В, N-конца и домена C1, N-конца и домена C2, N-конца и С-конца, доменов A1 и A2, доменов A1 и A3, доменов A1 и В, доменов A1 и C1, доменов A1 и C2, домена A1 и С-конца, доменов A2 и A3, доменов A2 и В, доменов A2 и C1, доменов A2 и C2, домена A2 и С-конца, доменов A3 и В, доменов A3 и C1, доменов A3 и C2, домена A3 и С-конца, доменов В и C1, доменов В и C2, домена В и С-конца, доменов C1 и C2, домена C1 и С-конца, домена C2, и С-конца, и двух или более их сочетаний. Не ограничивающие примеры сайтов встраивания перечислены в табл. 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15.

Белок FVIII, в котором последовательность XTEN вставляется непосредственно ниже одной или более аминокислот (например, один или более сайтов встраивания XTEN) в белке FVIII или связывается с С-концом или N-концом, сохраняет активность FVIII после связывания или вставки последовательности XTEN. Последовательность XTEN может быть вставлена в белок FVIII один или более одного раза, два раза, три раза, четыре раза, пять раз, или шесть раз таким образом, что вставки не влияют на активность FVIII (т.е. белок FVIII по-прежнему сохраняет коагуляционное свойство).

Белок FVIII, пригодный к использованию в настоящем изобретении, может быть связан с одним или более полипептидом XTEN на N-конце или на С-конце белка FVIII посредством необязательного линкера или вставлен непосредственно ниже одной или более аминокислот (например, один или более сайтов встраивания XTEN) в белке FVIII посредством одного или более необязательных линкеров. В одном варианте реализации изобретения два аминокислотных остатка, в которые вставляется последовательность XTEN, или аминокислотный остаток, с которым последовательность XTEN связывается, соответствуют двум или одному аминокислотному остатку из SEQ ID NO: 65 (полноразмерный зрелый FVIII), выбранный из группы, состоящей из остатков, представленных в табл. 7, табл. 8, табл. 9 и в табл. 10, и любых их сочетаний.

В других вариантах реализации изобретения по меньшей мере одна последовательность XTEN вставляется в любой один или более сайтов встраивания XTEN, описанный в данном документе, или любые их сочетания. В одном аспекте по меньшей мере одна последовательность XTEN встраивается в любой один или более сайтов встраивания XTEN, описанный в табл. 7.

Таблица 7

Типовые сайты встраивания XTEN

№	Точка встраивания XTEN*	Остаток встраивания	FVIII BDD нижележащая последовательность	Домен FVIII
1	0	(N-конец)	ATR	A1
2	3	R	RYY	A1
3	17	M	QSD	A1
4	18	Q	SDL	A1
5	22	G	ELP	A1
6	24	L	PVD	A1
7	26	V	DAR	A1
8	28	A	RFP	A1
9	32	P	RVP	A1
10	38	F	PFN	A1
11	40	F	NTS	A1
12	41	N	TSV	A1
13	60	N	IAK	A1
14	61	I	AKP	A1
15	65	R	PPW	A1
16	81	Y	DTV	A1
17	111	G	AEY	A1
18	116	D	QTS	A1
19	119	S	QRE	A1
20	120	Q	REK	A1

21	128	V	FPG	A1
22	129	F	PGG	A1
23	130	P	GGG	A1
24	182	G	SLA	A1
25	185	A	KEK	A1
26	188	K	TQT	A1
27	205	G	KSW	A1
28	210	S	ETK	A1
29	211	E	TKN	A1
30	216	L	MQD	A1
31	220	R	DAA	A1
32	222	A	ASA	A1
33	223	A	SAR	A1
34	224	S	ARA	A1
35	230	K	MHT	A1
36	243	P	GLI	A1
37	244	G	LIG	A1
38	250	R	KSV	A1
39	318	D	GME	A1
40	333	P	QLR	A1
42	334	Q	LRM	A1
43	336	R	MKN	a1
44	339	N	NEE	a1
45	345	D	YDD	a1
46	357	V	VRF	a1
47	367	S	FIQ	a1
48	370	S	RPY	a1
49	375	A	KKH	A2
50	376	K	KHP	A2
51	378	H	PKT	A2

52	399	V	LAP	A2
53	403	D	DRS	A2
54	405	R	SYK	A2
55	409	S	QYL	A2
56	416	P	QRI	A2
57	434	E	TFK	A2
58	438	T	REA	A2
59	441	A	IQH	A2
60	442	I	QHE	A2
61	463	I	IFK	A2
62	487	Y	SRR	A2
63	490	R	LPK	A2
64	492	P	KGV	A2
65	493	K	GVK	A2
66	494	G	VKH	A2
67	500	D	FPI	A2
68	506	G	EIF	A2
69	518	E	DGP	A2
70	556	K	ESV	A2
71	565	Q	IMS	A2
72	566	I	MSD	A2
73	598	P	AGV	A2
74	599	A	GVQ	A2
75	603	L	EDP	A2
76	616	S	ING	A2
77	686	G	LWI	A2
78	713	K	NTG	A2
79	719	Y	EDS	A2
80	730	L	LSK	A2
81	733	K	NNA	A2

82	745	N	PPV**	B
83	1640	P	PVL	B
84	1652	R	TTL	B
85	1656	Q	SDQ	A3
86	1685	N	QSP	A3
87	1711	M	SSS	A3
88	1713	S	SPH	A3
89	1720	N	RAQ	A3
90	1724	S	GSV	A3
91	1725	G	SVP	A3
92	1726	S	VPQ	A3
93	1741	G	SFT	A3
94	1744	T	QPL	A3
95	1749	R	GEL	A3
96	1773	V	TFR	A3
97	1792	Y	EED	A3
98	1793	E	EDQ	A3
99	1796	Q	RQG	A3
100	1798	Q	GAE	A3
101	1799	G	AEP	A3
102	1802	P	RKN	A3
103	1803	R	KNF	A3
104	1807	V	KPN	A3
105	1808	K	PNE	A3
106	1827	K	DEF	A3
107	1844	E	KDV	A3
108	1861	N	TLN	A3
109	1863	L	NPA	A3
110	1896	E	RNC	A3
111	1900	R	APC	A3

112	1904	N	IQM	A3
113	1905	I	QME	A3
114	1910	P	TFK	A3
115	1920	A	ING	A3
116	1937	D	QRI	A3
117	1981	G	VFE	A3
118	2019	N	KCQ	A3
119	2020	K	CQT	C1
120	2044	G	QWA	C1
121	2068	F	SWI	C1
122	2073	V	DLL	C1
123	2090	R	QKF	C1
124	2092	K	FSS	C1
125	2093	F	SSL	C1
126	2111	K	WQT	C1
127	2115	Y	RGN	C1
128	2120	T	GTL	C1
129	2125	V	FFG	C1
130	2171	L	NSC	C1
131	2173	S	CSM	C2
132	2188	A	QIT	C2
133	2223	V	NNP	C2
134	2224	N	NPK	C2
135	2227	K	EWL	C2
136	2268	G	HQW	C2
137	2277	N	GKV	C2
138	2278	G	KVK	C2
139	2290	F	TPV	C2
140	2332	Y	C-конец FVIII	CT

*Указывает на точку вставки XTEN, основываясь на количестве аминокислот зрелого полноразмерного FVIII человека, в котором вставка может быть или на N- или на C-концевой стороне указанной аминокислоты

В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более последовательность XTEN вставлены в пределах около шести аминокислот, вверх или вниз от аминокислот 32, 220, 224, 336, 339, 399, 416, 603, 1656, 1711, 1725, 1905 или 1910, что соответствует SEQ ID NO: 65 или любых их комбинаций.

Таблица 8

Типовые диапазоны встраивания XTEN

№	Точка встраивания XTEN	Остаток встраивания	FVIII BDD нижележащая последовательность	Домен FVIII	Расстояние от остатка встраивания *
9	32	P	RVP	A1	-3, +6
31	220	R	DAA	A1	-
34	224	S	ARA	A1	+5
43	336	R	MKN	a1	-1, +6
44	339	N	NEE	a1	-4, +5
52	399	V	LAP	A2	-6, +3
56	416	P	QRI	A2	+6
75	603	L	EDP	A2	-6, +6
85	1656	Q	SDQ	B	-3, +6
87	1711	M	SSS	A3	-6, +1
91	1725	G	SVP	A3	+6
113	1905	I	QME	A3	+6
114	1910	P	TFK	A3	-5, +6

*Расстояние от остатка встраивания означает относительное количество аминокислот, отдаленных от N-конца (отрицательные числа) или С-конца (положительные числа) указанного остатка встраивания (остаток "0"), в котором может происходить встраивание. Обозначение "-х" относится к сайту встраивания, который на х аминокислот отдален от N-концевой стороны указанного остатка встраивания. Аналогичным образом, обозначение "+х" относится к сайту встраивания, который на х аминокислот отдален от С-концевой стороны указанного остатка встраивания.

Например, "-1, +2" указывает на то, что вставка выполнена на N-конце или С-конце аминокислотных остатков, обозначенных -1, 0, +1 или +2.

В других вариантах реализации изобретения одна или более последовательность XTEN встраивается непосредственно ниже одной или более аминокислот, соответствующих полноразмерному зрелому FVIII человека, выбранных из группы, состоящей из одного или более сайтов встраивания в табл. 9.

Таблица 9

Типовые сайты встраивания или диапазоны XTEN

№	Диапазон точки встраивания XTEN*	Остаток встраивания	Домен FVIII
3	18-32	Q	A1
8	40	F	A1
18	211-224	E	A1
27	336-403	R	A1, A2
43	599	A	A2
47	745-1640	N	B
50	1656-1728	Q	B, a3, A3
57	1796-1804	R	A3
65	1900-1912	R	A3
81	2171-2332	L	C1, C2

*означает диапазон сайтов встраивания, пронумерованных согласно числу аминокислот зрелого FVIII человека

В еще одних вариантах реализации изобретения одна или более XTEN встраиваются в домены B FVIII. В одном примере, XTEN встраивается между аминокислот 740-1640, соответствующих SEQ ID NO: 65, в которой последовательность FVIII между аминокислотами 740-1640 в некоторых случаях отсутствует. В другом примере, XTEN встраивается между аминокислотами 741-1690, соответствующих

SEQ ID NO: 65, в которой последовательность FVIII между аминокислотами 740-1690 в некоторых случаях отсутствует. В других примерах, XTEN встраивается между аминокислотами 741-1648, соответствующих SEQ ID NO: 65, в которой последовательность FVIII между аминокислотами 741-1648 в некоторых случаях отсутствует. В еще одних примерах XTEN встраивается между аминокислотами 743-1638, соответствующих SEQ ID NO: 65, в которой последовательность FVIII между аминокислотами 743-1638 в некоторых случаях отсутствует. В еще одних примерах, XTEN встраивается между аминокислотами 745-1656, соответствующих SEQ ID NO: 65, в которой последовательность FVIII между аминокислотами 745-1656 в некоторых случаях отсутствует. В некоторых примерах, XTEN встраивается между аминокислотами 745-1657, соответствующих SEQ ID NO: 65, в которой последовательность FVIII между аминокислотами 745-1657 в некоторых случаях отсутствует. В отдельных примерах, XTEN встраивается между аминокислотами 745-1667, соответствующих SEQ ID NO: 65, в которой последовательность FVIII между аминокислотами 745-1667 в некоторых случаях отсутствует. В еще одних примерах, XTEN встраивается между аминокислотами 745-1686, соответствующих SEQ ID NO: 65, в которой последовательность FVIII между аминокислотами 745-1686 в некоторых случаях отсутствует. В некоторых других примерах, XTEN встраивается между аминокислотами 747-1642, соответствующих SEQ ID NO: 65, в которой последовательность FVIII между аминокислотами 747-1642 в некоторых случаях отсутствует. В еще одних примерах, XTEN встраивается между аминокислотами 751-1667, соответствующих SEQ ID NO: 65, в которой последовательность FVIII между аминокислотами 751-1667 в некоторых случаях отсутствует.

В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более XTEN встраивается в одну или более аминокислоту, расположенную непосредственно ниже аминокислоты сайта встраивания, из группы, состоящей из аминокислотных остатков в табл. 10.

Таблица 10

Сайты встраивания FVIII XTEN и обозначения конструкции

Номер конструкции	Домен	№ вышележащего остатка.*	№ нижележащего остатка.*	Вышележащая последовательность	Нижележащая последовательность
F8X-1	A1	3	4	ATR	RYY
F8X-2	A1	18	19	YMQ	SDL
F8X-3	A1	22	23	DLG	ELP

044115

F8X-4	A1	26	27	LPV	DAR
F8X-5	A1	40	41	FPF	NTS
F8X-6	A1	60	61	LFN	IAK
F8X-7	A1	116	117	YDD	QTS
F8X-8	A1	130	131	VFP	GGs
F8X-9	A1	188	189	KEK	TQT
F8X-10	A1	216	217	NSL	MQD
F8X-11	A1	230	231	WPK	MHT
F8X-12	A1	333	334	EEP	QLR
F8X-13	A2	375	376	SVA	KKH
F8X-14	A2	403	404	APD	DRS
F8X-15	A2	442	443	EAI	QHE
F8X-16	A2	490	491	RRL	PKG
F8X-17	A2	518	519	TVE	DGP
F8X-18	A2	599	600	NPA	GVQ
F8X-19	A2	713	714	CDK	NTG
F8X-20	BD	745	746	SQN	PPV
F8X-21	BD	745	746	SQN	PPV
F8X-22	BD**	745	746	SQN	PPV
F8X-23	A3	1720	1721	APT	KDE
F8X-24	A3	1796	1797	EDQ	RQG
F8X-25	A3	1802	1803	AEP	RKN
F8X-26	A3	1827	1828	PTK	DEF
F8X-27	A3	1861	1862	HTN	TLN
F8X-28	A3	1896	1897	NME	RNC
F8X-29	A3	1900	1901	NCR	APC
F8X-30	A3	1904	1905	PCN	IQM
F8X-31	A3	1937	1938	AQD	QRI
F8X-32	C1	2019	2020	YSN	KCQ
F8X-33	C1	2068	2069	EPF	SWI
F8X-34	C1	2111	2112	GKK	WQT
F8X-35	C1	2120	2121	NST	GTL
F8X-36	C2	2171	2172	CDL	NSC
F8X-37	C2	2188	2189	SDA	QIT

F8X-38	C2	2227	2228	NPK	EWL
F8X-39	C2	2277	2278	FQN	GKV
F8X-40	CT	2332	NA	DLY	NA
F8X-41	CT	2332	NA	DLY	NA
F8X-42	A1	3	4	ATR	ATR
pSD0001	A2	403	404		
pSD0002	A2	599	600		
pSD0021	N-конец	0	1		
pSD0022	A1	32	33		
pSD0023	A1	65	66		
pSD0024	A1	81	82		
pSD0025	A1	119	120		
pSD0026	A1	211	212		
pSD0027	A1	220	221		
pSD0028	A1	224	225		
pSD0029	A1	336	337		
pSD0030	A1	339	340		
pSD0031	A2	378	379		
pSD0032	A2	399	400		
pSD0033	A2	409	410		
pSD0034	A2	416	417		
pSD0035	A2	487	488		
pSD0036	A2	494	495		
pSD0037	A2	500	501		
pSD0038	A2	603	604		
pSD0039	A3	1656	1657		
pSD0040	A3	1711	1712		
pSD0041	A3	1725	1726		
pSD0042	A3	1749	1750		
pSD0043	A3	1905	1906		
pSD0044	A3	1910	1911		
pDS0062	A3	1900	1901		

*Означает количество аминокислот зрелого белка FVIII

В одном варианте реализации изобретения один или более сайтов встраивания XTEN расположены в пределах одной или более соприкасаемой с поверхностью, гибкой петлевой структурой белка FVIII (например, доступная для встраивания петля). Например, по меньшей мере одна последовательность XTEN может быть встроена в каждый домен "А" FVIII, содержащий по меньшей мере две "доступные для встраивания петли", в которые по меньшей мере один полипептид XTEN может быть встроен без устранения прокоагулирующей активности рекомбинантного белка, или способность рекомбинантных белков должна проявляться *in vivo* или *in vitro* в клетке хозяина. Доступные для встраивания петли являются областями, позволяющими встраивание по меньшей мере одной последовательности XTEN, характеризующиеся, среди прочих свойств, высокой доступностью поверхности или доступностью для растворителей и конформационной гибкостью. Домен А1 содержит доступную для встраивания петлю-1 (А1-1) область и доступную для встраивания петлю-2 (А1-2) область, домен А2 содержит доступную для встраивания петлю-1 (А2-1) область и доступную для встраивания петлю-2 (А2-2) область, домен А3 содержит доступную для встраивания петлю-1 (А3-1) область и доступную для встраивания петлю-2 (А3-2) область.

В одном аспекте первая доступная для встраивания петля в домене А1 FVIII (А1-1) располагается

между бета-тяжем 1 и бета-тяжем 2, и вторая доступная для встраивания петля в домене A2 FVIII (A1-2) располагается между бета-тяжем 11 и бета-тяжем 12. Первая доступная для встраивания петля в домене A2 FVIII (A2-1) располагается между бета-тяжем 22 и бета-тяжем 23, и вторая доступная для встраивания петля в домене A2 FVIII (A2-2) располагается между бета-тяжем 32 и бета-тяжем 33. Первая доступная для встраивания петля в домене A3 FVIII (A3-1) располагается между бета-тяжем 38 и бета-тяжем 39, и вторая доступная для встраивания петля в домене A3 FVIII (A3-2) располагается между бета-тяжем 45 и бета-тяжем 46. В некоторых аспектах гибкая с подвижной поверхностью структура, содержащая A1-1 соответствует области в нативном зрелом FVIII человека от около аминокислоты 15 до около аминокислоты 45 в SEQ ID NO: 65, например, от около аминокислоты 18 до около аминокислоты 41 в SEQ ID NO: 65. В других аспектах гибкая структура, содержащая A1-2, соответствует области в нативном зрелом FVIII человека от около аминокислоты 201 до около аминокислоты 232 в SEQ ID NO: 65, например, от около аминокислоты 218 до около аминокислоты 229 в SEQ ID NO: 65. В еще одних аспектах гибкая с подвижной поверхностью структура, содержащая A2-1, соответствует области в нативном зрелом FVIII человека от около аминокислоты 395 до около аминокислоты 421 в SEQ ID NO: 65, например, от около аминокислоты 397 до около аминокислоты 418 в SEQ ID NO: 65. В еще одних вариантах реализации изобретения гибкая с подвижной поверхностью структура, содержащая A2-2, соответствует области в нативном зрелом FVIII человека от около аминокислоты 577 до около аминокислоты 635 в SEQ ID NO: 65, например, от около аминокислоты 595 до около аминокислоты 607 в SEQ ID NO: 65. В некоторых аспектах гибкая с подвижной поверхностью структура, содержащая A3-1, соответствует области в нативном зрелом FVIII человека от около аминокислоты 1705 до около аминокислоты 1732 в SEQ ID NO: 65, например, от около аминокислоты 1711 до около аминокислоты 1725 в SEQ ID NO: 65. В еще одних аспектах гибкая с подвижной поверхностью структура, содержащая A3-2, соответствует области в нативном зрелом FVIII человека от около аминокислоты 1884 до около аминокислоты 1917 в SEQ ID NO: 65, например, от около аминокислоты 1899 до около аминокислоты 1911 в SEQ ID NO: 65.

В другом варианте реализации изобретения одна или более аминокислота, в которую встроена по меньшей мере одна последовательность XTEN, расположена в пределах домена a3, например, аминокислоты 1649-1689 соответствующие полноразмерному зрелому полипептиду FVIII. В некоторых примерах, XTEN встраивается между аминокислотами 1656-1657, соответствующих SEQ ID NO: 65 (полноразмерный зрелый FVIII). В конкретном варианте реализации изобретения белок FVIII, содержащий последовательность XTEN, встроена непосредственно ниже аминокислоты 1656, соответствующей SEQ ID NO: 65 дополнительно содержит делецию от аминокислоты 745 до аминокислоты 1656, соответствующую SEQ ID NO: 65.

В некоторых вариантах реализации изобретения один или более сайты встраивания для одного или более встраивания XTEN расположены непосредственно ниже одной или более аминокислот, соответствующих полноразмерному зрелому FVIII человека, выбранных из группы, состоящей из: (1) аминокислота 3, (2) аминокислота 18, (3) аминокислота 22, (4) аминокислота 26, (5) аминокислота 32, (6) аминокислота 40, (7) аминокислота 60, (8) аминокислота 65, (9) аминокислота 81, (10) аминокислота 116, (11) аминокислота 119, (12) аминокислота 130, (13) аминокислота 188, (14) аминокислота 211, (15) аминокислота 216, (16) аминокислота 220, (17) аминокислота 224, (18) аминокислота 230, (19) аминокислота 333, (20) аминокислота 336, (21) аминокислота 339, (22) аминокислота 375, (23) аминокислота 399, (24) аминокислота 403, (25) аминокислота 409, (26) аминокислота 416, (26) аминокислота 442, (28) аминокислота 487, (29) аминокислота 490, (30) аминокислота 494, (31) аминокислота 500, (32) аминокислота 518, (33) аминокислота 599, (34) аминокислота 603, (35) аминокислота 713, (36) аминокислота 745, (37) аминокислота 1656, (38) аминокислота 1711, (39) аминокислота 1720, (40) аминокислота 1725, (41) аминокислота 1749, (42) аминокислота 1796, (43) аминокислота 1802, (44) аминокислота 1827, (45) аминокислота 1861, (46) аминокислота 1896, (47) аминокислота 1900, (48) аминокислота 1904, (49) аминокислота 1905, (50) аминокислота 1910, (51) аминокислота 1937, (52) аминокислота 2019, (53) аминокислота 2068, (54) аминокислота 2111, (55) аминокислота 2120, (56) аминокислота 2171, (57) аминокислота 2188, (58) аминокислота 2227, (59) аминокислота 2277, и (60) два или более их сочетания.

В одном варианте реализации изобретения белок FVIII, пригодный для использования в настоящем изобретении, содержит две последовательности XTEN, первая последовательность XTEN встроена в первый сайт встраивания XTEN, и вторая XTEN встроена во второй сайт встраивания XTEN. Не ограничивающие примеры первого сайта встраивания XTEN и второго сайта встраивания XTEN перечислены в табл. 11.

Таблица 11

Типовые сайты встраивания для двух XTEN

Встраивание 1		Встраивание 2	
Сайт встраивания	Домен	Сайт встраивания	Домен
745	B	2332	CT
26	A1	403	A2
40	A1	403	A2
18	A1	403	A2
26	A1	599	A2
40	A1	599	A2
18	A1	599	A2
1720	A3	1900	A3
1725	A3	1900	A3
1711	A3	1905	A3
1720	A3	1905	A3
1725	A3	1905	A3
1656	A3	26	A1
1656	A3	18	A1
1656	A3	40	A1
1656	A3	399	A2
1656	A3	403	A2
1656	A3	1725	A3
1656	A3	1720	A3
1900	A3	18	A1
1900	A3	26	A1
1900	A3	40	A1
1905	A3	18	A1
1905	A3	40	A1
1905	A3	26	A1
1910	A3	26	A1
18	A1	399	A2
26	A1	399	A2
40	A1	399	A2
18	A1	403	A2
1656	A3	1900	A3
1656	A3	1905	A3
1711	A3	40	A1
1711	A3	26	A1
1720	A3	26	A1

1720	A3	40	A1
1720	A3	18	A1
1725	A3	26	A1
1725	A3	40	A1
1725	A3	18	A1
1720	A3	403	A2
1720	A3	399	A2
1711	A3	403	A2
1720	A3	403	A2
1725	A3	403	A2
1725	A3	399	A2
1711	A3	403	A2
1900	A3	399	A2
1900	A3	403	A2
1905	A3	403	A2
1905	A3	399	A2
1910	A3	403	A2

Две XTEN, встроенные или связанные с белком FVIII, могут быть одинаковыми или различными. В некоторых вариантах реализации изобретения белок FVIII, пригодный для использования в настоящем изобретении, содержит две последовательности XTEN, встроенные в белок FVIII, первую последовательность XTEN встроенную непосредственно ниже аминокислоты 745, соответствующей SEQ ID NO: 65, и вторую последовательность XTEN, встроенную непосредственно ниже аминокислоты 2332, соответствующей SEQ ID NO: 65 (С-конец). В другом варианте реализации изобретения первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 18, 26, 40, 1656 или 1720, соответствующей SEQ ID NO: 65, и вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 403, соответствующей SEQ ID NO: 65. В еще одних вариантах реализации изобретения первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 18, 26 или 40, соответствующей SEQ ID NO: 65, и вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 599, соответствующей SEQ ID NO: 65. В еще одних вариантах реализации изобретения первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1656, соответствующей SEQ ID NO: 65, и вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 18, 26, 40, 399, 403, 1725, 1720, 1900, 1905 или 2332, соответствующей SEQ ID NO: 65. В определенных вариантах реализации изобретения первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1900, соответствующей SEQ ID NO: 65, и вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 18, 26 или 40, соответствующей SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах реализации изобретения первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 18, 26 или 40, соответствующей SEQ ID NO: 65, и вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 399, соответствующей SEQ ID NO: 65. В других вариантах реализации изобретения первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1720, соответствующей SEQ ID NO: 65, и вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 18, 26 или 40, соответствующей SEQ ID NO: 65. В еще одних вариантах реализации изобретения первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1720, соответствующей SEQ ID NO: 65, и вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 18, соответствующей SEQ ID NO: 65. В конкретном варианте реализации изобретения белок FVIII, содержащий последовательность XTEN, первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 745, соответствующей SEQ ID NO: 65, и вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 2332, соответствующей SEQ ID NO: 65, в которой белок FVIII дополнительно содержит делецию от аминокислоты 745, соответствующую SEQ ID NO: 65 до аминокислоты 1685, соответствующей SEQ ID NO: 65, мутация или замена аминокислоты 1680, соответствующей SEQ ID NO: 65, например, Y1680F мутация или замена аминокислоты 1648, соответствующей SEQ ID NO: 65, например, R1648A или по меньшей мере две мутации или замены аминокислоты 1648, соответствующей SEQ ID NO: 65, например, R1648A, и аминокислота 1680, соответствующая SEQ ID NO: 65, например, Y1680F. В конкретном варианте реализации изобретения белок FVIII содержит две последовательности XTEN, первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1656, соответствующей SEQ ID NO: 65, и вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 2332, соответствующей SEQ ID NO: 65, в которой белок FVIII дополнительно содержит делецию от аминокислоты 745 до аминокислоты 1656, соответствующую SEQ ID NO: 65.

В определенных вариантах реализации изобретения белок FVIII содержит три последовательности XTEN, первая последовательность XTEN встроена в первый сайт встраивания XTEN, вторая последовательность XTEN встроена во второй сайт встраивания XTEN, и третья последовательность XTEN встроена в третий сайт встраивания XTEN. Первая, вторая или третья последовательности XTEN могут быть одинаковыми или различными. Первый, второй и третий сайты встраивания могут быть выбраны из группы, включающей любой из сайтов встраивания, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения белок FVIII, содержащий три последовательности XTEN, может дополнительно нести мутацию или замену, например, аминокислоту 1648, соответствующую SEQ ID NO: 65, например, R1648A. Например, не ограничивающие примеры первого, второго и третьего сайтов встраивания XTEN перечислены в табл. 12.

Таблица 12

Типовые сайты встраивания для трех XTEN

Встраивание 1		Встраивание 2		Встраивание 3	
Сайт встраивания	Домен	Сайт встраивания	Домен	Сайт встраивания	Домен
26	A1	403	A2	1656	A3
26	A1	403	A2	1720	A3
26	A1	403	A2	1900	A3
26	A1	1656	A3	1720	A3
26	A1	1656	A3	1900	A3
26	A1	1720	A3	1900	A3
403	A2	1656	A3	1720	A3
403	A2	1656	A3	1900	A3
403	A2	1720	A3	1900	A3
1656	A3	1720	A3	1900	A3
745	B	1900		2332	
18	A1	745	B	2332	CT
26	A1	745	B	2332	CT
40	A1	745	B	2332	CT
18	A1	745	B	2332	CT
40	A1	745	B	2332	CT
403	A2	745	B	2332	CT
399	A2	745	B	2332	CT
1725	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	745	B	2332	CT
1711	A3	745	B	2332	CT
1900	A3	745	B	2332	CT
1905	A3	745	B	2332	CT
1910	A3	745	B	2332	CT

В некоторых вариантах реализации изобретения белок FVIII содержит три последовательности XTEN, первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 26, соответствующей SEQ ID NO: 65, вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 403, соответствующей SEQ ID NO: 65, и третья последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1656, 1720 или 1900, соответствующей SEQ ID NO: 65. В других вариантах реализации изобретения первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 26, соответствующей SEQ ID NO: 65, вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1656, соответствующей SEQ ID NO: 65, и третья последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1720 или 1900, соответствующей SEQ ID NO: 65. В еще одних вари-

антах реализации изобретения первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 26, соответствующей SEQ ID NO: 65, вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1720, соответствующей SEQ ID NO: 65, и третья последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1900, соответствующей SEQ ID NO: 65. В еще одних вариантах реализации изобретения первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 403, соответствующей SEQ ID NO: 65, вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1656, соответствующей SEQ ID NO: 65, и третья последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1720 или 1900, соответствующей SEQ ID NO: 65. В других вариантах реализации изобретения первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 403 или 1656, соответствующей SEQ ID NO: 65, вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1720, соответствующей SEQ ID NO: 65, и третья последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1900, соответствующей SEQ ID NO: 65. В других вариантах реализации изобретения первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 18, 26, 40, 399, 403, 1711, 1720, 1725, 1900, 1905 или 1910, соответствующей SEQ ID NO: 65, вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 745, соответствующей SEQ ID NO: 65, и третья последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 2332, соответствующей SEQ ID NO: 65.

В других вариантах реализации изобретения белок FVIII содержит четыре последовательности XTEN, первая последовательность XTEN встроена в первый сайт встраивания XTEN, вторая последовательность XTEN встроена во второй сайт встраивания XTEN, третья последовательность XTEN встроена в третий сайт встраивания XTEN, и четвертая последовательность XTEN встроена в четвертый сайт встраивания XTEN. Первая, вторая, третья или четвертая последовательности XTEN могут быть одинаковыми, различными или их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения белок FVIII, содержащий четыре последовательности XTEN, может дополнительно нести мутацию или замену, например, аминокислоту 1648, соответствующую SEQ ID NO: 65, например, R1648A. Не ограничивающие примеры первого, второго, третьего и четвертого сайтов встраивания XTEN перечислены в табл. 12.

Таблица 13

Типовые сайты встраивания для четырех XTEN

Встраивание 1		Встраивание 2		Встраивание 3		Встраивание 4	
Сайт встраивания	Домен	Сайт встраивания	Домен	Сайт встраивания	Домен	Сайт встраивания	Домен
26	A1	403	A2	1656	a3	1720	A3
26	A1	403	A2	1656	a3	1900	A3
26	A1	403	A2	1720	A3	1900	A3
26	A1	1656	a3	1720	A3	1900	A3
403	A2	1656	a3	1720	A3	1900	A3
0040	A1	0403	A2	745	B	2332	CT
0040	A1	0403	A2	745	B	2332	CT
0018	A1	0409	A2	745	B	2332	CT
0040	A1	0409	A2	745	B	2332	CT
0040	A1	0409	A2	745	B	2332	CT

044115

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

0403	A2	1720	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	1900	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	1905	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	1910	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1656	a3	1720	A3	2332	CT
0403	A2	1656	a3	1900	A3	2332	CT
0403	A2	1720	A3	1900	A3	2332	CT
1656	a3	1720	A3	1900	A3	2332	CT
0018	A1	0403	A2	1656	a3	2332	CT
0018	A1	0403	A2	1720	A3	2332	CT
0018	A1	0403	A2	1900	A3	2332	CT
0018	A1	1656	a3	1720	A3	2332	CT
0018	A1	1656	a3	1900	A3	2332	CT
0018	A1	1720	A3	1900	A3	2332	CT
0018	A1	0403	A2	0745	B	2332	CT
0018	A1	0745	B	1720	A3	2332	CT
0018	A1	0745	B	1900	A3	2332	CT
0403	A2	0745	B	1720	A3	2332	CT
0403	A2	0745	B	1900	A3	2332	CT
0745	B	1720	A3	1900	A3	2332	CT
0188	A1	1900	A3	0745	B	2332	CT
0599		1900	A3	0745	B	2332	CT
2068		1900	A3	0745	B	2332	CT
2171		1900	A3	0745	B	2332	CT
2227		1900	A3	0745	B	2332	CT
2277		1900	A3	0745	B	2332	CT

В других вариантах реализации изобретения белок FVIII содержит пять последовательностей

XTEN, первая последовательность XTEN встроена в первый сайт встраивания XTEN, вторая последовательность XTEN встроена во второй сайт встраивания XTEN, третья последовательность XTEN встроена в третий сайт встраивания XTEN, четвертая последовательность XTEN встроена в четвертый сайт встраивания XTEN, пятая последовательность XTEN встроена в пятый сайт встраивания XTEN. Первая, вторая, третья, четвертая или пятая последовательности XTEN могут быть одинаковыми, различными, или их комбинации. Не ограничивающие примеры первого, второго, третьего, четвертого и пятого сайтов встраивания XTEN перечислены в табл. 14.

Таблица 14

Типовые сайты встраивания для пяти XTEN

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

В определенных вариантах реализации изобретения белок FVIII содержит шесть последовательностей XTEN, первая последовательность XTEN встроена в первый сайт встраивания XTEN, вторая последовательность XTEN встроена во второй сайт встраивания XTEN, третья последовательность XTEN встроена в третий сайт встраивания XTEN, четвертая последовательность XTEN встроена в четвертый сайт встраивания XTEN, пятая последовательность XTEN встроена в пятый сайт встраивания XTEN и шестая последовательность XTEN встроена в шестой сайт встраивания XTEN. Первая, вторая, третья, четвертая, пятая или шестая последовательности XTEN могут быть одинаковыми, различными, или их комбинации. Примеры шести сайтов встраивания XTEN включают, но не ограничиваются сайтами встраивания, перечисленных в табл. 15.

Таблица 15

Типовые XTEN сайты встраивания для шести XTEN

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

В конкретном примере первая последовательность XTEN встраивается между аминокислотами, соответствующими аминокислотам 26 и 27 последовательности SEQ ID NO: 65, и вторая последовательность XTEN встраивается между аминокислотами, соответствующими аминокислотам 1720 и 1721 последовательности SEQ ID NO: 65 (полноразмерный зрелый FVIII). В другом примере, первая XTEN встраивается между аминокислотами 403 и 404, соответствующих SEQ ID NO: 65, и вторая последовательность XTEN встраивается между аминокислотами, соответствующими аминокислотам 1720 и 1721 последовательности SEQ ID NO: 65. В некоторых примерах, первая XTEN встраивается между аминокислотами 1656 и 1657, соответствующих SEQ ID NO: 65, и вторая последовательность XTEN встраивается между аминокислотами, соответствующими аминокислотам 1720 и 1721 последовательности SEQ ID NO: 65. В других примерах, первая XTEN встраивается между аминокислотами 26 и 27, соответствующих SEQ ID NO: 65, вторая XTEN встраивается между аминокислотами 1656 и 1657, соответствующих SEQ ID NO: 65, и третья XTEN встраивается между аминокислотами 1720 и 1721, соответствующих SEQ ID NO: 65. В еще одних вариантах реализации изобретения первая XTEN встраивается между аминокислотами 403 и 404, соответствующих SEQ ID NO: 65, вторая XTEN встраивается между аминокислотами 1656 и 1657, соответствующих SEQ ID NO: 65, и третья XTEN встраивается между аминокислотами 1720 и 1721, соответствующих SEQ ID NO: 65. В еще одних вариантах реализации изобретения, первая XTEN встраивается между аминокислотами 403 и 404, соответствующих SEQ ID NO: 65, вторая XTEN встраивается между аминокислотами 1656 и 1657, соответствующих SEQ ID NO: 65, и третья XTEN встраивается между аминокислотами 1720 и 1721, соответствующих SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах реализации изобретения первая XTEN встраивается между аминокислотами 26 и 27, соответствующих SEQ ID NO: 65, вторая XTEN встраивается между аминокислотами 1720 и 1721, соответ-

вующих SEQ ID NO: 65, и третья XTEN встраивается между аминокислотами 1900 и 1901, соответствующих SEQ ID NO: 65. В некоторых вариантах реализации изобретения первая XTEN встраивается между аминокислотами 26 и 27, соответствующих SEQ ID NO: 65, вторая XTEN встраивается между аминокислотами 1656 и 1657, соответствующих SEQ ID NO: 65, третья XTEN встраивается между аминокислотами 1720 и 1721, соответствующих SEQ ID NO: 65, и четвертая XTEN встраивается между аминокислотами 1900 и 1901, соответствующих SEQ ID NO: 65.

В конкретных вариантах реализации изобретения последовательность XTEN встраивается между аминокислотами 745-746 полноразмерного фактора VIII или соответствующий сайт встраивания фактора VIII с удаленным доменом В.

В некоторых вариантах реализации изобретения, химерный белок данного изобретения содержит две полипептидные последовательности, первая полипептидная последовательность, содержащая аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 80%, 90%, 95% или 100% идентичную последовательности, выбранной из

FVIII-161 (SEQ ID NO: 69), FVIII-169 (SEQ ID NO: 70), FVIII-170 (SEQ ID NO: 71), FVIII-173 (SEQ ID NO: 72); FVIII-195 (SEQ ID NO: 73); FVIII-196 (SEQ ID NO: 74), FVIII-199 (SEQ ID NO: 75), FVIII-201 (SEQ ID NO: 76); FVIII-203 (SEQ ID NO: 77), FVIII-204 (SEQ ID NO: 78), FVIII-205 (SEQ ID NO: 79), FVIII-266 (SEQ ID NO: 80), FVIII-267 (SEQ ID NO: 81), FVIII-268 (SEQ ID NO: 82), FVIII-269 (SEQ ID NO: 83), FVIII-271 (SEQ ID NO: 84) или FVIII-272 (SEQ ID NO: 85),

и вторую полипептидную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на около 80%, 90%, 95% или 100% идентичную последовательности, выбранной из ФВ031 (SEQ ID NO: 86), ФВ034 (SEQ ID NO: 87), или ФВ-036.

II.D. Константная область ИГ или ее часть.

Химерный белок по данному изобретению также включает в себя две константные области ИГ или их части, первая константная область ИГ или ее часть слита с белком FVIII посредством необязательного линкера, и вторая константная область ИГ или ее часть слита с белком ФВ посредством последовательности XTEN, имеющей менее 288 аминокислот. Константная область ИГ или ее часть может улучшить фармакокинетические или фармакодинамические свойства химерного белка в комбинации с последовательностью XTEN и белком ФВ. В определенных вариантах реализации изобретения первая константная область ИГ или ее часть продлевает период полувыведения молекулы, слитой с константной областью ИГ или ее частью.

Константная область ИГ состоит из доменов, обозначенных как СН (постоянный тяжелый) домены (СН1, СН2 и т.д.). В зависимости от изотипа, (т.е. IgG, IgM, IgA, IgD или IgE), константная область может состоять из трех или четырех доменов СН. Некоторые изотипы (например, IgG) константные области также содержат шарнирную область. See Janeway et al., 2001 год, Immunobiology, Garland Publishing, Нью-Йорк, штат Нью-Йорк

Константная область ИГ или ее часть для получения химерного белка по данному изобретению может быть получена из нескольких различных источников. В некоторых вариантах реализации изобретения константную область ИГ или ее часть получают из ИГ человека. Однако предполагается, что константная область ИГ или ее часть может быть получена из ИГ других видов млекопитающих, включая, например, виды грызунов (например, мышь, крыса, кролик, морская свинка), или виды низших приматов (например, шимпанзе, макака). Кроме того, константная область ИГ или ее часть может быть получена из любого класса ИГ, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа ИГ, в том числе, IgG, IgG2, IgG3 и IgG4. В одном варианте реализации изобретения используется IgG1 человека.

Разнообразие последовательностей генов константной области ИГ (например, последовательности генов константной области человека) являются доступными в открытых для общественности источниках. Последовательности доменов константной области могут быть выбраны таким образом, чтобы они обладали определенной эффекторной функцией (или чтобы эффекторная функция отсутствовала) или определенной модификацией для снижения иммуногенности. Были опубликованы многие последовательности антител и генов, кодирующих антитела, и подходящие последовательности константной области ИГ (например, шарнирная, СН2 и/или СН3 последовательности или их части) могут быть получены из этих последовательностей с использованием методов, известных в данной области техники. Генетический материал, полученный с использованием любого из вышеописанных способов, затем может быть изменен или синтезирован для получения полипептидов по данному изобретению. Следует также иметь в виду, что рамки настоящего изобретения охватывают аллели, варианты и мутации последовательностей ДНК константной области.

Последовательности константной области ИГ или ее части могут быть клонированы, например, с помощью полимеразной цепной реакции и праймеров, которые выбраны для амплификации домена интереса. Для клонирования последовательности константной области ИГ или ее части из антитела мРНК может быть выделена из гибридомы, селезенки или лимфатических клеток, посредством обратной транс-

крипции транскрибирована в ДНК, и гены антител амплифицированы с помощью ПЦР. Методы ПЦР амплификации описаны подробно в патентах США № 4,683,195; 4,683,202; 4,800,159; 4,965,188; и, например, в "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" Innis et al., изд., Academic Press, Сан-Диего, штат Калифорния (1990 год); Ho et al., 1989 год. *Gene* 77:51; Horton et al., 1993. *Methods Enzymol.* 217:270). ПЦР может быть иницирована посредством консенсусных праймеров к константной области или более специфическими праймерами на основе опубликованных ДНК и аминокислотных последовательностей тяжелой и легкой цепи. Как было рассмотрено выше, ПЦР также может быть использована для выделения ДНК клонов, кодирующих легкие и тяжелые цепи антител. В этом случае библиотеки могут быть подвергнуты скринингу с помощью консенсусных праймеров или больших гомологичных зондов, таких как зонды константных областей мыши. Многочисленные наборы праймеров, пригодных для амплификации генов антител, известны в данной области техники (например, 5' праймеры на основе N-концевой последовательности очищенных антител (Benhar и Pastan. 1994 год. *Protein Engineering* 7:1509); быстрая амплификация концов кДНК (Ruberti, F. et al., 1994 год. *J. Immunol. Methods* 173:33); лидерные последовательности антител (Larrick et al., 1989 год *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160:1250). Клонирование последовательностей антител дополнительно описано в Newman et al., Патент США № 5,658,570, поданный 25 января 1995 года, которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

Константная область ИГ, используемая в данном документе, может включать все домены и шарнирную область или ее часть. В одном варианте реализации изобретения константная область ИГ или ее часть содержит домен СН2, домен СН3 и шарнирную область, т.е. фрагмент Fc или партнер по связыванию FcRn.

В данном контексте термин "фрагмент Fc" определяется как часть полипептида, который соответствует фрагменту Fc нативного ИГ, т.е. как образованный посредством димерной ассоциации соответствующих доменов Fc двух его тяжелых цепей. Нативный фрагмент Fc образует гомодимер с другим фрагментом Fc. В противоположность этому, термин "генетически слитый фрагмент Fc" или "одноцепочечный фрагмент Fc" (фрагмент scFc) в данном контексте означает синтетический димерный фрагмент Fc, состоящий из доменов Fc, генетически связанных в одной полипептидной цепи (т.е. закодированных в одной непрерывной генетической последовательности).

В одном варианте реализации изобретения "фрагмент Fc" означает часть одной тяжелой цепи ИГ, начинающуюся в шарнирной области непосредственно перед сайтом расщепления папаином (т.е. остаток 216 в IgG, если принять остаток 114 за первый остаток константной области тяжелой цепи) и заканчивающуюся С-концом антитела. Соответственно, полный домен Fc, содержит по меньшей мере шарнирный домен, домен СН2 и домен СН3.

Фрагмент Fc константной области ИГ, в зависимости от изотипа ИГ может включать домены СН2, СН3 и СН4, а также шарнирную область. Химерные белки, содержащие фрагмент Fc ИГ предоставляют несколько желательных свойств химерному белку, включая повышенную стабильность, увеличение периода полувыведения в сыворотке (см. Capon и соавт. 1989 год, *Nature* 337:525) а также связывание с рецепторами Fc, таким как неонатальный рецептор Fc (FcRn) (патент США № 6,086,875, 6,485,726, 6,030,613; WO 03/077834; US2003-0235536A1), которые включены в данный документ посредством ссылки.

Константная область ИГ или ее часть может быть партнером по связыванию FcRn. FcRn проявляет активность во взрослых эпителиальных тканях и экспрессируется в просвете кишечника, дыхательных путях, назальных поверхностях, вагинальных поверхностях, толстой кишке и ректальных поверхностях (патент США № 6,485,726). Партнер по связыванию FcRn является частью ИГ, которая связывается с FcRn.

Рецептор FcRn был выделен из нескольких видов млекопитающих, включая человека. Последовательности FcRn человека, FcRn обезьяны, FcRn крысы, и FcRn мыши известны (Story et al., 1994, *J. Exp. Med.* 180:2377). Рецептор FcRn связывает IgG (но не другие классы ИГ, такие как IgA, IgM, IgD и IgE) при относительно низком значении pH, активно транспортирует IgG трансцеллюлярно от просвета к серозной оболочке, и затем высвобождает IgG при относительно высоком значении pH, которое характерно для интерстициальных жидкостей. Он экспрессируется в зрелой эпителиальной ткани (патенты США № 6,086,875, 6,485,726, 6,030,613; WO 03/077834; US2003-0235536 A1), включая легочный и кишечный эпителий (Israel et al., 1997 год, *Immunology* 92:69) проксимальный почечный тубулярный эпителий (Kobayashi et al., 2002 год, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282:F358), а также назальный эпителий, поверхности влагалища и поверхности желчных протоков.

Партнеры по связыванию FcRn, пригодные к использованию в данном изобретении, включают молекулы, которые могут специфически связываются с рецептором FcRn, включая цельный IgG, фрагмент Fc из IgG и другие фрагменты, которые имеют полную область связывания рецептора FcRn. Область участка Fc IgG, которая связывается с рецептором FcRn была описана на основе рентгеновской кристаллографии (Burmeister et al., 1994 год, *Nature* 372:379). Основная площадь контакта Fc с FcRn находится рядом с местом соединения доменов СН2 и СН3. Все контакты Fc-FcRn находятся в пределах одной тяжелой цепи IgG. Партнеры по связыванию FcRn включают цельный IgG, фрагмент Fc из IgG и другие фрагменты IgG, которые имеют полную область связывания FcRn. Основные контактные сайты включают аминокислотные остатки 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 и 314 домена СН2 и аминокис-

лотные остатки 385-387, 428 и 433-436 домена СН3. Все ссылки на нумерацию аминокислот иммуноглобулинов или фрагментов иммуноглобулинов, или областей иммуноглобулинов основаны на Kabat et al., 1991 год, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Департамент общественного здравоохранения США, Бетесда, штат Мэриленд.

Фрагмент Fc или партнер по связыванию FcRn, связанные с FcRn, могут эффективно перемещаться через эпителиальные барьеры посредством FcRn, таким образом, обеспечивая неинвазивные способы для системного введения желаемой терапевтической молекулы. Кроме того, слитые белки, содержащие фрагмент Fc или партнер по связыванию FcRn, подвергаются эндоцитозу клетками, экспрессирующими FcRn. Но вместо того, чтобы быть помеченными для деградации, эти слитые белки вновь возвращаются обратно в кровоток, тем самым увеличивая *in vivo* период полувыведения этих белков. В определенных вариантах реализации изобретения частями константных областей ИГ являются фрагмент Fc или партнер по связыванию FcRn, которые обычно ассоциируются с помощью дисульфидных связей и других неспецифических взаимодействий с другим фрагментом Fc или другим партнером по связыванию FcRn с образованием димеров и мультимеров высокого порядка.

Два рецептора FcRn могут связывать с одной молекулой Fc.

Кристаллографические данные свидетельствуют о том, что каждая молекула FcRn связывается с одним полипептидом в гомодимере Fc. В одном варианте реализации изобретения связывание партнера по связыванию FcRn, например, фрагмента Fc IgG с биологически активной молекулой обеспечивает средство доставки биологически активной молекулы перорально, буккально, сублингвально, ректально, вагинально, в форме аэрозоля назально или ингаляционно через легочный путь, или через глаза. В другом варианте реализации изобретения химерный белок может быть введен инвазивным способом, например, подкожно, внутривенно.

Партнер по связыванию FcRn представляет собой молекулу или ее часть, которая может специфически связываться с рецептором FcRn с последующей активной транспортировкой посредством рецептора FcRn фрагмента Fc. Специфически связанные означает две молекулы, образующие комплекс, проявляющий относительную стабильность в физиологических условиях. Специфическое связывание характеризуется высокой аффинностью и низкой или средней связывающей способностью, что отличается от неспецифического связывания, которое обычно имеет низкую аффинность и умеренную или высокую связывающую способность. Как правило, связывание считается специфическим, когда константа аффинности KA выше, чем 10^6 M^{-1} , или выше чем 10^8 M^{-1} . При необходимости, неспецифическое связывание может быть уменьшено без существенного влияния на специфическое связывание варьированием условий связывания. Соответствующие условия связывания, такие как концентрация молекул, ионная сила раствора, температуры, время, требуемое для связывания, концентрация блокирующего агента (например, сывороточный альбумин, молочный казеин) и т.д., могут быть оптимизированы специалистом в данной области техники с использованием обычных методов.

В некоторых вариантах реализации изобретения химерный белок по настоящему изобретению содержит один или более укороченных фрагментов Fc, которые, тем не менее, являются достаточными для придания рецептору Fc (FcR) связывающих свойств фрагменту Fc. Например, часть фрагмента Fc, который связывается с FcRn (т.е. связывающая часть FcRn) содержит от около 282-438 аминокислот IgG1, нумерация EU (первичные контактные сайты являются аминокислотами 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311, 314 домена СН2 и аминокислотные остатки 385-387, 428, 433-436 домена СН3. Таким образом, фрагмент Fc по настоящему изобретению может содержать или включать в себя связывающую часть FcRn. Связывающая часть FcRn может быть получена из тяжелых цепей любого изотипа, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В одном варианте реализации изобретения используется связывающая часть FcRn из антитела изотипа IgG1 человека. В другом варианте реализации изобретения используется связывающая часть FcRn из антитела изотипа IgG4 человека.

В другом варианте реализации изобретения "фрагмент Fc" включает в себя аминокислотную последовательность домена Fc или полученный из домена Fc. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент Fc содержит по меньшей мере один(ну): шарнирную область (например, верхнюю, среднюю, и/или нижнюю шарнирную область), домен СН1 (около 216-230 аминокислот фрагмента Fc антитела в соответствии с нумерацией EU), домен СН2 (около 231-340 аминокислот фрагмента Fc антитела в соответствии с нумерацией EU), домен СН3 (около 341-438 аминокислот фрагмента Fc антитела в соответствии с нумерацией EU), домен СН4 или вариант, часть, или его фрагмент. В других вариантах реализации изобретения фрагмент Fc содержит полный домен Fc (т.е. шарнирный домен, домен СН2, и домен СН3) В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент Fc содержит, по существу состоит или состоит из шарнирного домена (или его части), слитого с доменом СН3 (или его частью), шарнирного домена (или его части), слитого с доменом СН2 (или его частью), домена СН2 (или его части), слитого с доменом СН3 (или его частью), домена СН2 (или его части), слитого как с шарнирным доменом (или его частью), так и с доменом СН3 (или его частью). В еще одних вариантах реализации изобретения домен Fc не имеет по меньшей мере части домена СН2 (например, целого или части домена СН2). В конкретном варианте реализации изобретения фрагмент Fc содержит или состоит из аминокислот, соответствующих номерам EU 221-447.

Фрагменты Fc, обозначенные как F, F1 или F2 в данном документе, могут быть получены из нескольких различных источников. В одном варианте реализации изобретения полипептид фрагмента Fc получают из ИГ человека. Однако предполагается, что фрагмент Fc может быть получен из ИГ других видов млекопитающих, включая, например, виды грызунов (например, мышь, крыса, кролик, морская свинка), или виды низших приматов (например, шимпанзе, макака). Кроме того, полипептид доменов Fc или его частей может быть получена из любого класса ИГ, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа ИГ, в том числе, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В другом варианте реализации изобретения используется изотип IgG1 человека.

В определенных вариантах реализации изобретения вариант Fc предоставляет изменение по меньшей мере одной эффекторной функции, которой наделен фрагмент Fc, содержащий указанный домен Fc дикого типа (например, улучшение или ухудшение способности фрагмента Fc к связыванию с рецепторами Fc (например FcγRI, FcγRII или FcγRIII) или белки комплемента (например C1q) или чтобы вызвать антитело-зависимую цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз и комплемент-зависимую цитотоксичность (CDCC)). В других вариантах реализации изобретения вариант Fc содержит сконструированный остаток цистеина.

В фрагментах Fc настоящего изобретения могут использоваться принятые в данной области техники варианты Fc с известной способностью вызывать изменения (например, улучшение или ухудшение) эффекторной функции и/или FcR или FcRn связывания. В частности, связывающая молекула по данному изобретению может иметь, например, изменение (например, замену) одной или более аминокислотных позиций, описанных в международных публикациях

PCT WO88/07089A1, WO96/14339A1,

WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2, WO00/32767A1, WO00/42072A2, WO02/44215A2, WO02/060919A2, WO03/074569A2, WO04/016750A2, WO04/029207A2, WO04/035752A2, WO04/063351A2, WO04/074455A2, WO04/099249A2, WO05/040217A2, WO04/044859, WO05/070963A1, WO05/077981A2, WO05/092925A2, WO05/123780A2, WO06/019447A1, WO06/047350A2 и WO06/085967A2; публикациях патентов США № US2007/0231329, US2007/0231329, US2007/0237765, US2007/0237766, US2007/0237767, US2007/0243188, US20070248603, US20070286859, US20080057056;

или патентах США 5,648,260; 5,739,277; 5,834,250; 5,869,046; 6,096,871; 6,121,022; 6,194,551; 6,242,195; 6,277,375; 6,528,624; 6,538,124; 6,737,056; 6,821,505; 6,998,253; 7,083,784; 7,404,956 и 7,317,091, каждый из которых включен в настоящее описание посредством ссылки. В одном варианте реализации изобретения специфическое изменение (например, специфическую замену одной или более аминокислот, описанных в данной области техники) может быть сделано в одной или более описанных аминокислотных позициях. В другом варианте реализации изобретения различные изменения в одной или более из описанных аминокислотных позиций (например, различные замены одной или более аминокислотной позиции, описанной в данной области техники), могут быть сделаны.

Фрагмент Fc или партнер по связыванию FcRn IgG может быть изменен в соответствии с хорошо известными процедурами, такими как сайт-направленный мутагенез и тому подобное, чтобы получить модифицированный IgG или фрагменты Fc, или их части, которые будут связываться с FcRn. Такие модификации включают модификации удаленных от FcRn сайтов контакта, а также модификации в сайтах контакта, которые сохраняют или даже усиливают связывание с FcRn. Например, следующие остатки одной аминокислоты в Fc IgG1 человека (Fcγ1) могут быть заменены без существенной потери аффинности связывания Fc с FcRn:

P238A, S239A, K246A,

K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, P331A, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A, и K447A,

где, например, P238A представляет замену пролина дикого типа на аланина в положении номер 238. В качестве примера, конкретный вариант реализации изобретения включает в себя мутацию N297A, уда-

ляющую высококонсервативный сайт N-гликозилирования. В дополнение к аланину другие аминокислоты могут быть заменены на аминокислоты дикого типа в положениях, указанных выше. Мутации могут быть внесены в Fc по одной, приводя к образованию более ста фрагментов Fc, отличных от нативного Fc. Кроме того, комбинации из двух, трех или более этих отдельных мутаций могут быть введены вместе, приводя к образованию еще сотен фрагментов Fc. Более того, один из фрагментов Fc конструкции по данному изобретению может быть мутирован, и другой фрагмент Fc конструкции не мутирован вообще, или они оба могут быть мутированы, но иметь различные мутации.

Некоторые из указанных выше мутаций могут придавать новые функциональные возможности фрагменту Fc или партнеру по связыванию FcRn. Например, один вариант реализации изобретения включает в себя мутацию N297A, удаляющую высококонсервативный сайт N-гликозилирования. Эффектом этой мутации является снижение иммуногенности, тем самым увеличивается период полувыведения из крови фрагмента Fc, и делает фрагмент Fc неспособным к связыванию с FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, и FcγRIIIA, без ущерба для аффинности FcRn (Routledge et al., 1995, Transplantation 60:847; Friend et al., 1999, Transplantation 68:1632; Shields et al., 1995, J. Biol. Chem. 276:6591). В качестве еще одного примера новых функциональных возможностей, возникающих из-за мутаций, описанных выше, аффинность к FcRn может быть увеличена сверх уровня дикого типа в некоторых случаях. Эта повышенная аффинность может соответствовать увеличенной скорости ассоциации, уменьшенной скорости диссоциации или как увеличенной скорости ассоциации, так и уменьшенной скорости диссоциации. Примеры мутаций, которые, как полагают, придают повышенную аффинность к FcRn, включают, но не ограничиваются ими, T256A, T307A, E380A и N434A (Shields et al., 2001 год, J. Biol. Chem. 276:6591).

Кроме того, по меньшей мере три гамма-рецепторы Fc человека, по-видимому, распознают сайт связывания на IgG в нижней шарнирной области, который, как правило, соответствует аминокислотам 234-237. Таким образом, еще один пример новых функциональных возможностей и потенциального снижения иммуногенности может возникнуть из-за мутаций в этой области, как, например, путем замены аминокислот 233-236 IgG1 человека "ELLG" в соответствующую последовательность из IgG2 "PVA" (с удалением одной аминокислоты). Как это было показано, что FcγRI, FcγRII, и FcγRIII, которые опосредуют различные эффекторные функции, не будут связываться с IgG1, когда введены такие мутации. Ward и Ghetie 1995 год, Therapeutic Immunology 2:77 и Armour et al., 1999 год, Eur. J. Immunol. 29:2613.

В одном варианте реализации изобретения константной областью ИГ или ее частью, например, фрагмент Fc, является полипептид, включающий последовательность PKNSSMISNTP (SEQ ID NO: 89 или SEQ ID NO: 3 патента США № 5,739,277) и в некоторых случаях дополнительно включающий в себя последовательность, выбранную из HQLGTQ (SEQ ID NO: 90), HQLNSDQK (SEQ ID NO: 91), HQLNSDQK (SEQ ID NO: 92), или VISSLGQ (SEQ ID NO: 93) (или SEQ ID NO: 11, 1, 2 и 31, соответственно из патента США № 5,739,277).

В другом варианте реализации изобретения константная область иммуноглобулина или ее часть содержит аминокислотную последовательность в шарнирной области или ее части, которая образует одну или более дисульфидных связей с другой константной областью иммуноглобулина или ее частью. Дисульфидная связи константной области иммуноглобулина или ее части соединяет первый полипептид, содержащий FVIII и второй полипептид, содержащий фрагмент FВ, таким образом, что эндогенный FВ не заменяет фрагмент FВ и не связывается с FVIII. Таким образом, дисульфидная связь между первой константной областью иммуноглобулина или ее частью и константной областью второго иммуноглобулина или ее частью предотвращает взаимодействие между эндогенным FВ и белком FVIII. Ингибирование взаимодействия между FВ и белком FVIII позволяет в два раза увеличить лимит периода полувыведения химерного белка. Шарнирная область или ее часть может быть дополнительно связана с одним или более доменами CH1, CH2, CH3, их фрагментами, а также любыми их сочетаниями. В конкретном варианте реализации изобретения константной областью ИГ или ее частью является шарнирная область и домен CH2.

В некоторых вариантах реализации изобретения константная область ИГ или ее часть является гми-гликозилированной. Например, химерный белок, содержащий два фрагмента Fc или партнера по связыванию FcRn, может содержать первый гликозилированный фрагмент Fc (например, гликозилированную область CH2), или партнер по связыванию FcRn и второй агликозилированный фрагмент Fc (например, агликозилированная область CH2) или партнер по связыванию FcRn. В одном варианте реализации изобретения линкер может быть размещен между гликозилированными и агликозилированными фрагментами Fc. В другом варианте реализации изобретения фрагмент Fc или связывающий партнер FcRn полностью гликозилируется, т.е. все фрагменты Fc гликозилированы. В других вариантах реализации изобретения фрагмент Fc может быть агликозилированным, т.е. ни один из фрагментов Fc не гликозилирован.

В некоторых вариантах реализации изобретения химерный белок по данному изобретению содержит аминокислотную замену в константной области ИГ или ее части (например, вариант Fc), которая изменяет антиген-независимые эффекторные функции константной области ИГ, в частности, период полувыведения белка из крови.

Такие белки демонстрируют увеличенную или сниженную способность к связыванию с FcRn по сравнению с белками, в которых отсутствуют эти замены и, следовательно, имеют увеличенный или

уменьшенный период полувыведения в сыворотке крови, соответственно. Предполагается, что варианты Fc с улучшенной аффинностью к FcRn, имеют более продолжительный период полувыведения в сыворотке, и такие молекулы имеют полезное применение в способах лечения млекопитающих, когда желательным является продолжительный период полувыведения вводимого полипептида, например, для лечения хронического заболевания или расстройства (см., например, патенты США 7,348,004, 7,404,956 и 7,862,820). В отличие от этого, ожидается, что варианты Fc со сниженной аффинностью связывания с FcRn, имеют более короткие периоды полувыведения, и такие молекулы могут быть также использованы, например, для введения млекопитающему, когда сокращенное время пребывания в кровотоке может быть более предпочтительным, например, для диагностической визуализации в естественных условиях или в ситуациях, когда начальный полипептид имеет токсические побочные эффекты, если он присутствует в кровотоке в течение продолжительного периода времени. Также менее вероятной является способность вариантов Fc со сниженной аффинностью связывания с FcRn преодолевать плацентарный барьер и, таким образом, они также являются полезными при лечении заболеваний или расстройств у беременных женщин. Кроме того, другие применения, в которых сниженная аффинность связывания с FcRn может быть необходимой, включают те применения, в которых необходима локализация в головном мозге, почках и/или печени. В одном типовом варианте реализации изобретения химерный белок по данному проявляет сниженную способность к прохождению через эпителий почечных клубочков из сосудистой системы. В другом варианте реализации изобретения химерный белок по данному изобретению проявляет сниженную способность к прохождению через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) из головного мозга в сосудистую систему. В одном варианте реализации изобретения белок с модифицированной способностью к связыванию с FcRn содержит по меньшей мере один фрагмент Fc или партнер по связыванию FcRn (например, один или два фрагмента Fc или партнера по связыванию FcRn), имеющий одну или более аминокислотных замен в пределах "связывающей петли FcRn" константной области ИГ. Связывающая петля FcRn состоит из аминокислотных остатков 280-299 (в соответствии с нумерацией EU) дикого типа, полноразмерного фрагмента Fc. В других вариантах реализации изобретения константная область ИГ или ее часть в химерном белке по данному изобретению, имеющая модифицированную аффинность связывания с FcRn содержит по меньшей мере один фрагмент Fc или связывающий партнер FcRn, имеющий одну или более аминокислотных замен в пределах 15 Å "зоны контакта" FcRn. В данном контексте термин 15 Å FcRn "зона контакта" включает остатки, занимающие следующие позиции в полноразмерном фрагменте Fc дикого типа: 243-261, 275-280, 282-293, 302-319, 336-348, 367, 369, 372-389, 391, 393, 408, 424, 425-440 (нумерация EU). В других вариантах реализации изобретения константная область ИГ или ее часть по данному изобретению, имеющая модифицированную аффинность связывания с FcRn содержит по меньшей мере один фрагмент Fc или связывающий партнер FcRn, имеющий одну или более аминокислотных замен, соответствующих любой из следующих позиций EU: 256, 277-281, 283-288, 303-309, 313, 338, 342, 376, 381, 384, 385, 387, 434 (например, N434A или N434K), и 438. Типичные замены аминокислот, которые модифицируют связывающую активность с FcRn, описаны в международной публикации PCT № 05/047327, которая в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

Фрагмент Fc или партнер по связыванию FcRn, используемый по данному изобретению, может также содержать известную в данной области техники аминокислотную замену, которая изменяет уровень гликозилирование химерного белка. Например, фрагмент Fc или партнер по связыванию FcRn химерного белка, связанный с фрагментом Fv или белком FvIII, может содержать фрагмент Fc, имеющий мутацию, что приводит к снижению уровня гликозилирования (например, N- или O-связанное гликозилирование) или может содержать модифицированную гликоформу фрагмента Fc дикого типа (например, низкий уровень фукозы или фукозо-свободного гликана).

В одном варианте реализации изобретения непротессированный химерный белок по данному изобретению может содержать генетически слитый фрагмент Fc (например, фрагмент scFc), имеющих в его составе две или более константные области ИГ или ее части, независимо выбираемыми из константной области ИГ или ее части, описанной в данном документе. В одном варианте реализации изобретения фрагменты Fc димерных фрагментов Fc являются одним и тем же. В другом варианте реализации изобретения по меньшей мере два фрагмента Fc являются различными. Например, фрагмент Fc или партнер по связыванию FcRn белков по данному изобретению содержат одинаковое количество аминокислотных остатков, или они могут отличаться по длине одного или более аминокислотных остатков (например, около 5 аминокислотных остатков (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков), около 10 остатков, около 15 остатков, около 20 остатков, около 30 остатков, около 40 остатков или около 50 остатков). В еще одних вариантах реализации изобретения фрагмент Fc или партнер по связыванию FcRn по данному изобретению могут отличаться по одной или более позиции в аминокислотной последовательности. Например, по меньшей мере, два из фрагмента Fc или партнера по связыванию FcRn могут отличаться по около 5 аминокислотным позициям (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотным позициям), около 10 позициям, около 15 позициям, около 20 позициям, около 30 позициям, около 40 позициям или около 50 позициям).

П.Е. Линкеры.

Химерный белок по данному изобретению дополнительно содержит один или более линкеров. Одним типом линкеров является расщепляемый линкер, который может быть расщеплен с помощью различных протеаз при введении субъекту в естественных условиях, например, в сайте коагуляции. В одном варианте реализации изобретения расщепляемый линкер позволяет отщепить фрагмент, например, белок ФВ, от последовательности ХТЕН, следовательно, от химерного белка в месте коагуляционного каскада, позволяя тем самым активированному FVIII (FVIIIa) проявлять свою FVIIIa активность. Другой тип линкера представляет собой процессируемый линкер, который содержит внутриклеточный сайт расщепления и, таким образом, может быть расщеплен с помощью процессингового внутриклеточного фермента в клетке-хозяине, что делает удобным процесс экспрессии полипептида и образование химерного белка.

Один или более линкеров могут находиться между любыми двумя белками в химерном белке. В одном варианте реализации изобретения химерный белок содержит первый полипептид, содержащий (I) белок FVIII и (II) первую константную область ИГ или ее часть и второй полипептид, содержащий (III) белок ФВ, (IV) линкер (например, расщепляемый линкер), (V) последовательность ХТЕН, и (VI) вторую константную область ИГ или ее часть. В другом варианте реализации изобретения химерный белок содержит первый полипептид, содержащий (I) белок FVIII и (II) первую константную область ИГ или ее часть и второй полипептид, содержащий (III) белок ФВ, (IV) последовательность ХТЕН, (V) линкер (например, расщепляемый линкер) и (VI) вторую константную область ИГ или ее часть. В других вариантах реализации изобретения химерный белок содержит первый полипептид, содержащий (I) белок FVIII и (II) первую константную область ИГ или ее часть и второй полипептид, содержащий (III) белок ФВ, (IV) первый линкер (например, расщепляемый линкер), (V) последовательность ХТЕН, (VI) второй линкер (например, расщепляемый линкер) и (VII) вторую константную область ИГ или ее часть. В определенных вариантах реализации изобретения первый полипептид дополнительно содержит линкер, например, расщепляемый линкер между белком FVIII и первой константной областью ИГ.

В некоторых вариантах реализации изобретения химерный белок содержит одну цепь, содержащую (I) белок FVIII, (II) первую константную область ИГ или ее часть, (III) линкер (например, процессируемый линкер), (IV) белок ФВ, (V) последовательность ХТЕН и (VI) вторую константную область ИГ или ее часть. В других вариантах реализации изобретения химерный белок содержит одну цепь, содержащую (I) белок FVIII, (II) первую константную область ИГ или ее часть, (III) первый линкер (например, процессируемый линкер), (IV) белок ФВ, (V) второй линкер (например, расщепляемый линкер), (VI) последовательность ХТЕН и (VII) вторую константную область ИГ или ее часть. Процессируемый линкер может быть процессирован после того, как химерный белок экспрессируется в клетке-хозяине; таким образом, химерный белок, продуцируемый в клетке-хозяине, может быть в окончательной форме, состоящей из двух или трех полипептидных цепей.

Линкер, пригодный к использованию в настоящем изобретении, может содержать органическую молекулу. В одном варианте реализации изобретения линкер содержит полимер, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ) или гидроксипропилкрахмал (ГПК). В другом варианте реализации изобретения линкер содержит аминокислотную последовательность. Линкер может содержать по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 или 2000 аминокислот. Линкер может содержать 1-5 аминокислот, 1-10 аминокислот, 1-20 аминокислот, 10-50 аминокислот, 50-100 аминокислот, 100-200 аминокислот, 200-300 аминокислот, 300-400 аминокислот, 400-500 аминокислот, 500-600 аминокислот, 600-700 аминокислот, 700-800 аминокислот, 800-900 аминокислот или 900-1000 аминокислот. В одном варианте реализации изобретения линкер содержит последовательность ХТЕН. Дополнительные примеры последовательностей ХТЕН могут быть использованы по данному изобретению и раскрыты в патентных публикациях США № 2010/0239554 A1, 2010/0323956 A1, 2011/0046060 A1, 2011/0046061 A1, 2011/0077199 A1 или 2011/0172146 A1, или международных патентных публикациях № WO 2010091122 A1, WO 2010144502 A2, WO 2010144508 A1, WO 2011028228 A1, WO 2011028229 A1, или WO 2011028344 A2. В другом варианте реализации изобретения линкер является последовательностью PAS.

В одном варианте реализации изобретения линкер является полимером, например, полиэтиленгликолем (ПЭГ) или гидроксипропилкрахмалом (ГПК). В другом варианте реализации изобретения линкер является аминокислотной последовательностью. Линкер может содержать по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 или 2000 аминокислот. Линкер может содержать 1-5 аминокислот, 1-10 аминокислот, 1-20 аминокислот, 10-50 аминокислот, 50-100 аминокислот, 100-200 аминокислот, 200-300 аминокислот, 300-400 аминокислот, 400-500 аминокислот, 500-600 аминокислот, 600-700 аминокислот, 700-800 аминокислот, 800-900 аминокислот или 900-1000 аминокислот.

Примеры линкеров хорошо известны в данной области техники. В одном варианте реализации изобретения линкер содержит последовательность G_n. Линкер может содержать последовательность (GA)_n. Линкер может содержать последовательность (GGS)_n. В других вариантах реализации изобретения линкер содержит (GGGS)_n (SEQ ID NO: 101). В еще одних вариантах реализации изобретения линкер содержит последовательность (GGS)_n(GGGS)_n (SEQ ID NO: 95). В этих случаях n может быть целым числом

от 1 до 100. В других случаях n может быть целым числом от 1 до 20, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. Примеры линкеров включают, но не ограничиваются ими, GGG, SGGSGGS (SEQ ID NO: 96),

GGSGSGSGSGSGSGG (SEQ ID NO: 97), GGS SGGSGSGSGSGSGGS (SEQ ID NO: 98),

GGSGSGSGSGSGSGSGGS (SEQ ID NO: 99), или GGGSGSGSGSGSGGS (SEQ ID NO:

100).

Линкер не устраняет или не уменьшает активность белка ФВ или свертывающую активность фактора VIII. В некоторых случаях линкер повышает активность белка ФВ или свертывающую активность белка фактора VIII, например, за счет дополнительного уменьшения эффекта стерического несоответствия и делает белок ФВ или часть фактора VIII более доступными для их целевого сайта связывания.

В одном варианте реализации изобретения линкер, полезный для химерного белка, имеет длину 15-25 аминокислот. В другом варианте реализации изобретения линкер, полезный для химерного белка, имеет длину 15-20 аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер для химерного белка имеет длину 10-25 аминокислот. В другом варианте реализации изобретения линкер для химерного белка имеет длину 15 аминокислот. В еще одних вариантах реализации изобретения линкер для химерного белка является (GGGGS)_n (SEQ ID NO: 94) где G представляет собой глицин, S представляет собой серию и N представляет собой целое число от 1 до 20.

II. F. Сайты расщепления

Расщепляемые линкеры могут включать в себя фрагмент, способный отщепляться либо химически (например, гидролиз эфирной связи), ферментативно (т.е. включение последовательности для расщепления протеазой) или фотолитически (например, хромофор, такой как 3-амино-3-(2-нитрофенил) пропионовая кислота (ANP)) для того, чтобы освободить одну молекулу от другой.

В одном варианте реализации изобретения расщепляемый линкер содержит один или более расщепляемых сайтов на N-конце или C-конце, или обоих. В другом варианте реализации расщепляемый линкер по существу состоит или состоит из одного или более расщепляемых сайтов. В других вариантах реализации изобретения линкер содержит гетерологические линкерные аминокислотные последовательности, описанные в данном документе, или полимеры, и один или более расщепляемых сайтов.

В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый линкер содержит один или более сайтов расщепления, которые могут быть расщеплены в клетке-хозяине (т.е. внутриклеточные процессинговые сайты). Неограничивающие примеры сайтов расщепления включают: RRRR (SEQ ID NO: 102), RKRRKR (SEQ ID NO: 103) и RRRRS (SEQ ID NO: 104).

В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый линкер содержит область a1 FVIII, область a2 FVIII, область a3 FVIII, сайт расщепления тромбином, который содержит X-V-P-R (SEQ ID NO: 105) и мотив взаимодействия с экзосайтом PAR1, в котором X представляет собой алифатическую аминокислоту или любые их комбинации, содержит область a2, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или на 100% идентичную последовательности от Glu720 до Arg740, соответствующего полноразмерного FVIII, в котором область a2 способна расщепляться тромбином. В конкретном варианте реализации изобретения расщепляемый линкер, полезный по данному изобретению, содержит две области a2, содержащие ISDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 106).

В других вариантах реализации изобретения расщепляемый линкер по данному изобретению содержит область a1, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или на 100% идентичную последовательности от Met337 до Arg372, соответствующего полноразмерного FVIII, в котором область a1 способна расщепляться тромбином. В конкретном варианте реализации изобретения область a1, содержит ISMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSV (SEQ ID NO: 107).

В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый линкер по данному изобретению содержит область a3, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере около на 80%, около на 85%, около на 90%, около на 95% или на 100% идентичную последовательности от Glu1649 до Arg1689, соответствующего полноразмерного FVIII, в котором область a3 способна расщепляться тромбином. В конкретном варианте реализации изобретения расщепляемый линкер, полезный по данному изобретению, содержит две области a3, содержащие

ISDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 108).

В других вариантах реализации изобретения расщепляемый линкер содержит сайт расщепления тромбином, содержащий X-V-P-R (SEQ ID NO: 105) и мотив взаимодействия с экзосайтом PAR1, в котором мотив взаимодействия с экзосайтом PAR1 содержит S-F-L-L-R-N (SEQ ID NO: 109). Мотив взаимодействия с экзосайтом PAR1 может дополнительно содержать аминокислотную последовательность, выбранную из

P,

P-N, P-N-D, P-N-D-K (SEQ ID NO: 110), P-N-D-K-Y (SEQ ID NO: 111), P-N-D-K-Y-E (SEQ ID NO: 112), P-N-D-K-Y-E-P (SEQ ID NO: 113), P-N-D-K-Y-E-P-F (SEQ ID NO: 114), P-N-D-K-Y-E-P-F-W (SEQ ID NO: 115), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E (SEQ ID NO: 116), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D (SEQ ID NO: 117), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D-E (SEQ ID NO: 118), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D-E-E (SEQ ID NO: 119), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D-E-E-S (SEQ ID NO: 120)

или любых их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения алифатическая аминокислота выбирается из глицина, аланина, валина, лейцина или изолейцина.

В других вариантах реализации изобретения расщепляемый линкер содержит один или более сайтов расщепления, которые расщепляются посредством протеазы, после того, как химерный белок, содержащий расщепляемый линкер, вводят субъекту. В одном варианте реализации изобретения сайт расщепления поддается расщеплению протеазой, выбранной из группы, содержащей фактор XIa, фактор XIIa, калликреин, фактор VIIa, фактор IXa, фактор Xa, фактор IIa (тромбин), эластазу 2, MMP-12, MMP-13, MMP-17 и MMP-20. В другом варианте реализации изобретения сайт расщепления выбирается из группы, содержащей сайт расщепления FXIa (например, KLTR↓AET (SEQ ID NO: 121)), сайт расщепления FXIa (например, DFTR↓VVG (SEQ ID NO: 122)), сайт расщепления FXIIa (например, TMTR↓IVGG (SEQ ID NO: 123)), сайт расщепления калликреином (например, SPFR↓STGG (SEQ ID NO: 124)), сайт расщепления FVIIa (например, LQVR↓IVGG (SEQ ID NO: 125)), сайт расщепления FIXa (например, PLGR↓IVGG (SEQ ID NO: 126)), сайт расщепления FXa (например, IEGR↓TVGG (SEQ ID NO: 127)), сайт расщепления FIIa (тромбином) сайт расщепления (например, LTPR↓SLLV (SEQ ID NO: 128)), сайт расщепления эластазой 2 (например, LGPV↓SGVP (SEQ ID NO: 129)), сайт расщепления гранзимом B (например, VAGD↓SLEE (SEQ ID NO: 130)), сайт расщепления MMP-12 (например, GPAG↓LGGA (SEQ ID NO: 131)), сайт расщепления MMP-13 (например, GPAG↓LRGA (SEQ ID NO: 132)), сайт расщепления MMP-17 (например, APLG↓LRLR (SEQ ID NO: 133)), сайт расщепления MMP-20 (например, PALP↓LVAQ (SEQ ID NO: 134)), сайт расщепления TEV (например, ENLYFQ↓G (SEQ ID NO: 135)), сайт расщепления энтерокиназой (например, DDDK↓IVGG (SEQ ID NO: 136)), сайт расщепления (PRE-SCISSIION™) протеазой 3C (например, LEVLFQ↓GP (SEQ ID NO: 137)), и сайт расщепления сортазой A (например, LPKT↓GSES) (SEQ ID NO: 138). В некоторых вариантах реализации изобретения сайт расщепления FXIa включает, но не ограничивается ими, например, TQSFNDFTR (SEQ ID NO: 1) или SVSQTSKLTR (SEQ ID NO: 3).

Неограничивающие примеры сайтов расщепления тромбином включают, например,

DFLAEGGGVR (SEQ ID

NO: 4), TTKIKPR (SEQ ID NO: 5), LVPRG (SEQ ID NO: 6),

DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 88), или IEPRSFS (SEQ ID

NO: 194)

и последовательность, содержащую, по существу состоящую из или состоящую из ALRPR (SEQ ID NO: 7) (например, ALRPRVVGGA (SEQ ID NO: 145)). В типовых вариантах реализации изобретения сайтом расщепления является последовательность TLDPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEEK (SEQ ID NO: 146). В другом варианте реализации изобретения сайт расщепления содержит

DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 88)

или ее фрагмент. В одном конкретном варианте реализации изобретения сайт расщепления содержит IEPRSFS (SEQ ID NO: 194). В другом варианте реализации изобретения сайт расщепления содержит EPRSFS (SEQ ID NO: 195), причем сайт расщепления не представляет собой полноразмерную область a2 белка FVIII. В еще одном варианте реализации изобретения сайт расщепления содержит IEPR (SEQ ID NO: 200). В другом варианте реализации изобретения сайт расщепления содержит IEPR (SEQ ID NO: 200), причем сайт расщепления не представляет собой полноразмерную область a2 белка FVIII или не содержит полноразмерную область a2 FVIII. В других вариантах реализации изобретения сайт расщепления содержит

DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 88), KNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 139), NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 140), TGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 141), GDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 142), DYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 143), YYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 144), YEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 176), EDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 177), DSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 178), SYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 179), YEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 180), EDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 181), DISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 182), ISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 183), SAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 184), AYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 185), YLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 186), LLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 187), LSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 188), SKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 189), KNNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 190), NNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 191), NAIIEPRSFS (SEQ ID NO: 192), AIEPRSFS (SEQ ID NO: 193), или IEPRSFS (SEQ ID NO: 194).

В других вариантах реализации изобретения сайт расщепления содержит

DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 88), KNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 139), NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 140), TGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 141), GDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 142), DYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 143), YYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 144), YEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 176), EDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 177), DSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 178), SYEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 179), YEDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 180), EDISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 181), DISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 182), ISAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 183), SAYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 184), AYLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 185), YLLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 186), LLSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 187), LSKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 188), SKNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 189), KNNNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 190), NNAIEPRSFS (SEQ ID NO: 191), NAIIEPRSFS (SEQ ID NO: 192), AIEPRSFS (SEQ ID NO: 193), или IEPRSFS (SEQ ID NO: 194),

причем сайт расщепления не представляет собой полноразмерную область а2 белка FVIII. В определенных вариантах реализации изобретения сайт расщепления поддается расщеплению в тесте на гидролиз тромбином, как предложено в настоящем документе или известно в данной области техники.

III. Полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева.

Также по данному изобретению приводится полинуклеотид, кодирующий химерный белок по данному изобретению. В одном варианте реализации изобретения первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь могут быть закодированы с помощью одной полинуклеотидной цепи. В другом варианте реализации изобретения первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь кодируются двумя различными полинуклеотидными, например, первой нуклеотидной последовательностью и второй нуклеотидной последовательностью. В другом варианте реализации изобретения первая нуклеотидная последовательность и вторая нуклеотидная последовательности являются двумя различными полинуклеотидами (например, различные векторы).

Изобретение включает в себя полинуклеотид, кодирующий одну полипептидную цепь (например, FVIII(X2)-F1-L3-F2-L2-X1-L1-V), в котором FVIII(X2), содержит белок FVIII, в котором последователь-

ность XTEN встраивается в один или более сайтов встраивания, F1 содержит первую константную область ИГ или ее часть, например, первый фрагмент Fc, L1 содержит первый линкер, V содержит белок ФВ, X1 содержит последовательность XTEN, имеющую длину менее 288 аминокислот, L2 содержит второй линкер, L3 содержит третий линкер, и F2 содержит вторую константную область ИГ или ее часть, например, второй фрагмент Fc. Изобретение также включает в себя два полинуклеотида, первая полинуклеотидная последовательность кодирует первый полипептид, который содержит белок FVIII, слитый с первой константной областью ИГ или ее частью, и вторая полинуклеотидная последовательность кодирует второй полипептид, который содержит белок ФВ, последовательность XTEN, имеющую длину менее 288 аминокислот, и вторую константную область ИГ или ее часть. В некоторых вариантах реализации изобретения химерный белок, содержащий две полипептидные цепи или три полипептидные цепи, может быть кодирован с помощью одной полинуклеотидной цепи, а затем процессирован в две или три (или более) полипептидные цепи. В еще одних вариантах реализации изобретения химерный белок, содержащий эти полипептидные цепи, может быть кодирован с помощью двух или трех полинуклеотидных цепей.

В других вариантах реализации изобретения набор полинуклеотидов дополнительно содержит дополнительную нуклеотидную цепь (например, вторую нуклеотидную цепь, когда химерный полипептид кодируется первой полинуклеотидной цепью или третьей нуклеотидной цепью, когда химерный белок кодируется двумя полинуклеотидными цепями), которая кодирует белок конвертазу. Белок конвертаза может быть выбран из группы, состоящей из пропротеинконвертазы субтилизин/кексин типа 5 (PCSK5 или PC5), пропротеинконвертазы субтилизин/кексин типа 7 (PCSK7 или PC5), дрожжевого Kex 2, пропротеинконвертазы субтилизин/кексин типа 3 (PACE или PCSK3) и двух или более их сочетаний. В некоторых вариантах реализации изобретения белком конвертазой является PACE, PC5 или PC7. В типовом варианте реализации изобретения белком конвертазой является PC5 или PC7. См. международную заявку № PCT/US 2011/043568.

В данном контексте экспрессионный вектор означает любую конструкцию нуклеиновой кислоты, которая содержит элементы, необходимые для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей последовательности, или в случае РНК-вирусного вектора, необходимые элементы для репликации и трансляции при интродукции в соответствующую клетку-хозяина. Экспрессионные векторы могут включать в себя плазмиды, фагмиды, вирусы и их производные.

Экспрессионные векторы по данному изобретению будут включать в себя полинуклеотиды, кодирующие химерный белок, описанный в данном документе. В одном варианте реализации изобретения одна или более кодирующих последовательностей для первого полипептида, содержащего белок FVIII и первую константную область ИГ, для второго полипептида, содержащего белок ФВ, последовательность XTEN, имеющую менее 288 аминокислот и вторую константную область ИГ или ее часть, или для обоих полипептидов функционально связаны с последовательностью, контролирующей экспрессию. В данном контексте две последовательности нуклеиновой кислоты функционально связаны, когда они ковалентно связаны таким образом, чтобы обеспечить сохранность функциональных возможностей каждого компонента последовательности нуклеиновой кислоты. О кодирующей последовательности и последовательности контроля экспрессии гена говорят, что они функционально связаны, если они ковалентно связаны таким образом, чтобы экспрессия или транскрипция и/или трансляция кодирующей последовательности находились под влиянием или контролем последовательности контроля экспрессии гена. О двух последовательностях ДНК говорят, что они функционально связаны, если индукция промотора на 5'-конце последовательности экспрессии гена приводит к транскрипции кодирующей последовательности, и если природа связи между двумя последовательностями ДНК (1) не приводит к мутации сдвига рамки считывания, (2) не мешает способности области промотора направлять транскрипцию кодирующей последовательности или (3) не мешает соответствующему РНК-транскрипту транслироваться в белок. Таким образом, последовательность экспрессии гена будет функционально связана с кодирующей последовательностью нуклеиновой кислоты, если последовательность экспрессии гена способна осуществлять транскрипцию последовательности, кодирующую последовательность нуклеиновой кислоты таким образом, чтобы полученный в результате транскрипт транслировался в желаемый белок или полипептид.

В данном контексте, последовательностью контроля экспрессии гена является любая регуляторная нуклеотидная последовательность, например, последовательность промотора или комбинация промотор-энхансер, содействующая эффективной транскрипции и трансляции кодирующей нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана. Последовательность контроля экспрессии гена, может быть, например, промотором млекопитающих или вирусным промотором, таким как конститутивный или индуцируемый промотор. Конститутивные промоторы млекопитающих включают, но не ограничиваются ими, промоторы для следующих генов: гипоксантин фосфорибозилтрансферазы (HPRT), аденозиндезаминазы, пируват-киназы, промотор бета-актина, и другие конститутивные промоторы. Типичные вирусные промоторы, которые функционируют конститутивно в эукариотических клетках, включают, например, промоторы из цитомегаловируса (CMV), вируса обезьян (например, SV40), вирус папилломы, аденовируса, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус саркомы Рауса, цитомегаловирус, длинные терминальные повторы (LTR) вирус лейкоза Молони и другие ретровирусы, и промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса. Другие конститутивные промоторы известны специалистам в данной области

техники. Промоторы, пригодные в качестве последовательностей экспрессии гена по данному изобретению, также включают в себя индуцируемые промоторы. Индуцируемые промоторы экспрессируются в присутствии индуцирующего агента. Например, промотор металлотионеина индуцирует активацию транскрипции и трансляции в присутствии некоторых ионов металлов. Другие индуцируемые промоторы известны обычным специалистам в данной области техники.

В целом, последовательность контроля экспрессии гена по мере необходимости должна включать в себя 5'-нетранскрибируемую и 5'-нетранслируемую последовательности, участвующие в инициации транскрипции и трансляции соответственно, такие как ТАТА-бокс, кэпирующая последовательность, последовательность СААТ и т.п. В частности, такие 5'-нетранскрибированные последовательности включают промоторную область, которая включает в себя последовательность промотора для транскрипционного контроля над функционально связанной кодирующей нуклеиновой кислотой. По желанию, в некоторых случаях, последовательность экспрессии гена включает в себя последовательности энхансера или вышележащие активаторные последовательности.

Вирусный вектор включает, но не ограничивается, последовательности нуклеиновых кислот из следующих вирусов: ретровирусы, такие как вирус Молони мышинного лейкоза, вирус саркомы мышей Харви, вирус опухоли молочной железы мышей и вирус саркомы Рауса; аденовирусы, аденоассоциированный вирус; вирусы SV40 типа; полиомавирусы; вирусы Эпштейна-Барр; вирусы папилломы; вирус герпеса; вирус коровьей оспы; вирус полиомиелита; и РНК-содержащий вирус, такой как ретровирус. Можно легко использовать и другие векторы, хорошо известные в данной области техники. Некоторые вирусные векторы основаны на нецитопатических эукариотических вирусах, в которых второстепенные гены были заменены на гены интереса. Нечитопатические вирусы включают ретровирусы, жизненный цикл которых включает в себя обратную транскрипцию геномной вирусной РНК в ДНК с последующей провирусной интеграцией в ДНК клетки-хозяина. Ретровирусы были одобрены для исследований генной терапии человека. Наиболее полезными являются дефектные по репликации ретровирусы (т.е. способные направлять синтез необходимых белков, но не способные синтезировать инфекционную частицу). Такие генетически измененные ретровирусные экспрессионные векторы имеют полезность для высокоэффективной трансдукции генов *in vivo*. Стандартные протоколы для получения ретровирусов, дефектных по репликации, (включая этапы введения экзогенного генетического материала в плазмиду, трансфекцию пакующей клеточной линии плазмидой, получения рекомбинантных ретровирусов посредством пакующей клеточной линии, сбор вирусных частиц из тканевой культуральной среды и инфицирование клеток-мишеней вирусными частицами) представлены в Krieglert, M., *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, W.H. Freeman Co., Нью-Йорк (1990 год) и Murry, E. J., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7, Humana Press, Inc., Клифтон, штат Нью-Джерси (1991 год).

В одном варианте реализации изобретения вирусом является аденоассоциированный вирус, вирус двухцепочечной ДНК. Аденоассоциированный вирус может быть сконструирован таким образом, чтобы быть дефектным по репликации и способным инфицировать широкий диапазон типов клеток и видов. Кроме того, он имеет такие преимущества, как термостабильность и липидная устойчивость к растворению; высокие частоты трансдукции в клетках различных линий, включая гемопозитические клетки; и отсутствие ингибирования суперинфекции, таким образом, что позволяет осуществлять несколько серий трансдукции. Как сообщается, аденоассоциированный вирус может сайт-специфически интегрироваться в клеточную ДНК человека, тем самым сводя к минимуму возможность инсерционного мутагенеза и изменчивости экспрессионной характеристики встроенного гена ретровирусной инфекции. Кроме того, аденоассоциированные вирусные инфекции дикого типа были проведены в культуре ткани более 100 пассажей в отсутствие селективного давления, подразумевая, что геномная интеграция аденоассоциированного вируса является относительно стабильным событием. Аденоассоциированный вирус может также функционировать как внехромосомный фактор.

Другие векторы включают плазмидные векторы. Плазмидные векторы широко описаны в данной области техники и хорошо известны специалистам в данной области техники. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 год. В последние несколько лет было обнаружено, что плазмидные векторы являются особенно предпочтительным для доставки генов в клетки *in vivo* из-за их неспособности интегрироваться и реплицироваться внутри генома хозяина. Тем не менее, эти плазмиды имеют промотор, совместимый с клеткой-хозяином, могут экспрессировать пептид из гена, функционально закодированного в плазмиде. Некоторые часто используемые плазмиды, доступные от коммерческих поставщиков, включают pBR322, pUC18, pUC19, различные pcDNA плазмиды, PRC/CMV, различные PCMV плазмиды, pSV40 и pBlueScript. Дополнительные примеры конкретных плазмид включают pcDNA3.1, номер по каталогу V79020; pcDNA3.1/hygro, номер по каталогу V87020; pcDNA4/Мус-His, номер по каталогу V86320; и pBudCE4.1, номер по каталогу V53220, все из Инвитроджен (Карлсбад, штат Калифорния). Другие плазмиды хорошо известны обычным специалистам в данной области техники. Кроме того, плазмиды могут быть специально разработаны с использованием стандартных методов молекулярной биологии, чтобы удалить и/или добавить специфические фрагменты ДНК.

В одной системе экспрессии на основе насекомых, которая может быть использована для получения

белков по данному изобретению, *Autographa californica* вирус ядерного гипергидроза (AcNPV) используется в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов. Вирус растет в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодированная последовательность может быть клонирована во второстепенных областях (например, ген полигедрона) вируса и помещена под контроль промотора AcNPV (например, промотор полигедрона). Успешное введение кодирующей последовательности приведет к инактивации гена полигедрона и образования нескрапленного рекомбинантного вируса (т.е. у вируса отсутствует белковый слой, кодируемый геном полигедрона). Эти рекомбинантные вирусы затем используются для инфицирования клеток *Spodoptera frugiperda*, в которых экспрессируется вставленный ген. (см., например, Smith et al. (1983 год) *J Virol* 46:584; патент США № 4,215,051). Дополнительные примеры этих систем экспрессии можно найти в Ausubel et al., ред. (1989 год) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience.

Еще одной системой, которая может быть использована для экспрессии белков по данному изобретению, является система экспрессии гена глутаминсинтетазы, также упоминается как "система экспрессии GS" (Lonza Biologics PLC, Беркшир Великобритания). Эта система экспрессии подробно описана в патенте США №5,981,216.

В клетках-хозяевах млекопитающих может быть использован ряд систем экспрессии, основанных на вирусах. В тех случаях, когда используют аденовирус в качестве экспрессионного вектора экспрессии, кодирующая последовательность может быть лигирована с контрольным за транскрипцией/трансляцией комплексом аденовируса, например, поздним промотором и трехкомпонентной лидерной последовательностью. Этот химерный ген затем может быть встроен в геном аденовируса с помощью рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Встраивание во второстепенную область вирусного генома (например, область E1 или E3) приводит к получению рекомбинантного вируса, который является жизнеспособным и способен экспрессировать пептид у инфицированных хозяев. (См., например, Logan & Shenk (1984 год) *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3655). В альтернативном варианте 7.5 K промотор вируса осповакцины может быть использован. (См., например, Mackett et al. (1982 год) *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7415; Mackett et al. (1984 год) *J Virol* 49:857; Panicali et al. (1982 год) *Proc Natl Acad Sci USA* 79:4927).

Для повышения эффективности продуцирования полинуклеотиды могут быть созданы, чтобы кодировать множество белковых единиц по данному изобретению, разделенных ферментативными сайтами расщепления. Полученный полипептид может быть расщеплен (например, путем обработки с соответствующим ферментом) для того, чтобы восстановить полипептидные единицы. Это может увеличить выход полипептидов, управляемых одним промотором. При использовании в соответствующих вирусных системах экспрессии, трансляция каждого полипептида, кодируемого мРНК, направлена внутрь транскрипта; например, с помощью участка внутренней посадки рибосомы, IRES. Таким образом, полицистронная конструкция направляет транскрипцию одной большой полицистронной мРНК, которая, в свою очередь, направляет трансляцию нескольких, отдельных полипептидов. Этот подход исключает продуцирование и ферментативную обработку полипротеинов и может значительно увеличить выход полипептидов, управляемых одним промотором.

Векторы, используемые в трансформации, как правило, содержат селективный маркер, используемый для идентификации трансформантов. В бактериальных системах это может включать в себя ген устойчивости к антибиотику, такой как ампициллин или канамицин. Селективные маркеры для использования в культивируемых клетках млекопитающих включают гены, которые придают устойчивость к лекарственным средствам, таким как неомицин, гигромицин и метотрексат. Селективный маркер может быть амплифицируемым селективным маркером. Одним амплифицируемым селективным маркером является ген дигидрофолатредуктазы (DHFR). Simonsen C C et al. (1983 год) *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2495-9. Селективные маркеры были проверены Thilly (1986 год) *Mammalian Cell Technology*, Butterworth Publishers, Стоунхэм, штат Массачусетс, и выбор селективных маркеров находится в компетенции среднего специалиста в данной области техники.

Селективные маркеры могут быть введены в клетку посредством отдельной плазмиды одновременно с геном интереса, или же они могут быть введены посредством одной и той же плазмиды. Если на одной и той же плазмиде селектируемый маркер и ген интереса могут находиться под контролем различных промоторов или одного и того же промотора, поздняя расстановка продуцирует бицистронное сообщение. Конструкции такого типа известны в данной области техники (например, патент США № 4,713,339).

Экспрессионные векторы могут кодировать метки, которые позволяют произвести легкую очистку рекомбинантно продуцируемого белка. Примеры включают, но не ограничиваются ими, вектор pUR278 (Ruther et al. (1983 год) *EMBO J* 2:1791), в котором кодирующие последовательности для экспрессируемого белка могут быть лигированы в вектор в рамке с кодирующей областью *lac z*, так чтобы продуцировался меченый слитый белок; векторы pGEX могут быть использованы для экспрессии белков по данному изобретению с использованием глутатион S-трансферазы (GST) в качестве метки. Обычно эти белки растворимы и могут быть легко очищены от клеток посредством адсорбции на глутатион-агарозных микроносителях с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы включают в себя сайты расщепления (тромбин или фактор Ха протеазы или PPOTEA3A PRESSION™

(Pharmacia, Пипак, штат Нью-Джерси)) для легкого удаления метки после очистки.

Экспрессионный вектор или векторы затем трансфицируются или котрансфицируются в подходящую клетку-мишень, которая будет экспрессировать полипептиды. Способы трансфекции, известные в данной области техники, включают, но не ограничиваются ими, осаждение фосфатом кальция (Wigler et al. (1978 год) Cell 14:725), электропорация (Neumann et al. (1982 год) EMBO J 1:841) и реагенты на основе липосом. Разнообразие векторных систем экспрессии в клетке хозяине могут быть использованы для экспрессии белков, описанных в данном документе, включая как прокариотические и эукариотические клетки. К ним относятся, но не ограничиваются ими, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli*) трансформированные с помощью рекомбинантных экспрессионных векторов ДНК бактериофага или плазмидной ДНК, содержащих соответствующую кодирующую последовательность; дрожжи или мицелиальные грибы, трансформированные с помощью рекомбинантных экспрессионных векторов дрожжевых или мицелиальных грибов, содержащих соответствующую кодирующую последовательность; системы клеток насекомых, инфицированные рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, бакуловирус), содержащих соответствующую кодирующую последовательность; системы клеток растений, инфицированные рекомбинантными вирусными экспрессионными векторами (например, вирус мозаики цветной капусты или вирус мозаики табака) или трансформированные с помощью рекомбинантных плазмидных экспрессионных векторов (например, Ti плазида), содержащих соответствующую кодирующую последовательность; или системы клеток животных, в том числе клетки млекопитающих (например, HEK293, CHO, Cos, HeLa, HKB11 и BHK клетки).

В одном варианте реализации изобретения клетка-хозяин является эукариотической клеткой. В данном контексте эукариотическая клетка относится к любой животной или растительной клетке, имеющей точно определенное ядро. Эукариотические клетки животных включают клетки позвоночных, например, млекопитающих и клетки беспозвоночных, например, насекомых. Эукариотические клетки растений, в частности, могут включать дрожжевые клетки, но не ограничиваться ими. Эукариотическая клетка отличается от прокариотической клетки, например, бактерии.

В некоторых вариантах реализации изобретения эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего. Клетка млекопитающего представляет собою любую клетку, происходящую от млекопитающего. Клетки млекопитающих, в частности, могут включать клеточные линии млекопитающих, но не ограничиваться ими. В одном варианте реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой человеческую клетку. В другом варианте реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку HEK293, которая является линией эмбриональных клеток человеческой почки. Клетки HEK293, доступны в виде CRL-1533 из Американской коллекции типов культур, Манассас, штат Вирджиния, а также в виде 293-Н клеток, каталожный № 11631-017 или 293-F клеток, каталожный № 11625-019 от Инвитроджен (Карлсбат, штат Калифорния). В некоторых вариантах реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой PER.C6® клетку, которая является линией клеток, происходящей из сетчатки. PER.C6® клетки доступны от Круселл (Лейден, Нидерланды). В других вариантах реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку из линии клеток яичника китайского хомячка (CHO). Клетки CHO доступны из Американской коллекции типов культур, Манассас, штат Вирджиния, (например, CHO-K1; CCL-61). В еще одних вариантах реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку из линии клеток почки новорожденного сирийского хомячка (BHK). Клетки BHK доступны из Американской коллекции типов культур, Манассас, штат Вирджиния, (например, CRL-1632). В некоторых вариантах реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой HKB11 клетку, которая является гибридной клеточной линией от клеток линии HEK293 и линии В-клеток человека. Mei et al., Mol. Biotechnol. 34(2): 165-78 (2006 год).

В одном варианте реализации изобретения плазмиду, содержащую FVIII (X2)-Fc слитую кодирующую последовательность, белок FB-L1-X1-L2-Fc кодирующую последовательность или обе эти последовательности и селективный маркер, например, устойчивость к зеоцину, трансфицировали в клетки HEK293 для продуцирования химерного белка.

В другом варианте реализации изобретения плазмиду, содержащую FVIII-Fc слитую кодирующую последовательность, белок FB-L1-X-L2-Fc кодирующую последовательность или обе эти последовательности и селективный маркер, например, устойчивость к зеоцину, трансфицировали в клетки HEK293 для продуцирования химерного белка.

В некоторых вариантах реализации изобретения первую плазмиду, содержащую FVIII(X2)-Fc слитую кодирующую последовательность и первый селективный маркер, например, устойчивость к зеоцину, и вторую плазмиду, содержащую белок FB-L1-X1-L2-Fc кодирующую последовательность и второй селективный маркер, например, ген устойчивости к неомицину и третью плазмиду, содержащую кодирующую последовательность белка конвертазы и третий селективный маркер, например, ген устойчивости к гигромицину, трансфицировали в клетки HEK293 для получения химерного белка. Первая и вторая плазмиды могут быть введены в равных количествах (например, молярное соотношение 1:1), или они могут быть введены в неравных количествах.

В еще одних вариантах реализации изобретения первую плазмиду, содержащую FVIII-Fc слитую

кодирующую последовательность и первый селективный маркер, например, устойчивость к зеоцину, и вторую плазмиду, содержащую белок ФВ-L1-X-L2-Fc кодирующую последовательность и второй селективный маркер например, ген устойчивости к неомицину и третью плазмиду, содержащую кодирующую последовательность белка конвертазы и третий селективный маркер, например, ген устойчивости к гигромицину, трансфицировали в клетки НЕК293 для получения химерного белка. Первая и вторая плазмиды могут быть введены в равных количествах (например, молярное соотношение 1:1), или они могут быть введены в неравных количествах.

В еще одних вариантах реализации изобретения первую плазмиду, содержащую FVIII(X2)-Fc слитую кодирующую последовательность и первый селективный маркер, например, устойчивость к зеоцину, и вторую плазмиду, содержащую белок ФВ-L1-X1-L2-Fc слитую кодирующую последовательность и второй селективный маркер, например, ген устойчивости к неомицину и третью плазмиду, содержащую кодирующую последовательность белка конвертазы и третий селективный маркер, например, ген устойчивости к гигромицину, трансфицировали в клетки НЕК293 для получения химерного белка. Первая и вторая плазмиды могут быть введены в равных количествах (например, молярное соотношение 1:1), или они могут быть введены в неравных количествах.

В некоторых вариантах реализации изобретения первую плазмиду, содержащую FVIII (с или без XTEN)-F1-L3-F2-L2-X-L1-V кодирующую последовательность и первый селективный маркер, например, устойчивость к зеоцину, и вторую плазмиду, содержащую кодирующую последовательность белка конвертазы и второй селективный маркер, например, ген устойчивости к гигромицину, трансфицировали в клетки НЕК293 для получения химерного белка. Промоторы для кодирующей последовательности FVIII(X)-F1 и кодирующей последовательности V-L2-X-L1-F2 могут быть различными или они могут быть одинаковыми.

В еще одних вариантах реализации изобретения трансфицированные клетки являются стабильно трансфицированными. Эти клетки могут быть отобраны и поддерживаться в виде стабильной клеточной линии с использованием стандартных методов, известных специалистам в данной области.

Клетки-хозяева, содержащие конструкции ДНК белка, выращивают в подходящей питательной среде. Используемый в данном документе термин "соответствующая питательная среда" означает среду, содержащую питательные вещества, необходимые для роста клеток. Питательные вещества, необходимые для роста клеток могут включать в себя источник углерода, источник азота, незаменимые аминокислоты, витамины, минералы и факторы роста. В некоторых случаях, среда может содержать один или более факторов выбора. В некоторых случаях, среда может содержать бычью сыворотку или эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС). В одном варианте реализации изобретения среда практически не содержит IgG. Питательная среда, как правило, выбирается для клеток, содержащих конструкцию ДНК, через, например, отбор по чувствительности к лекарственному препарату или недостаток необходимого питательного вещества, которое дополняется через селективируемый маркер на конструкции ДНК или ко-трансфицируется с конструкцией ДНК. Культивируемые клетки млекопитающих обычно выращивают в коммерчески доступной среде, содержащей сыворотку, или бессывороточной среде (например, MEM, DMEM, DMEM/F12). В одном варианте реализации изобретения средой является CD293 (Инвитроджен, Карлсбат, Калифорния). В другом варианте реализации изобретения средой является CD17 (Инвитроджен, Карлсбат, Калифорния). Выбор среды, подходящей для конкретной используемой клеточной линии, определяется уровнем средних специалистов в данной области техники.

Для того, чтобы коэкспрессировать две полипептидные цепи химерного белка, клетки-хозяева культивируют в условиях, которые позволяют экспрессию обеих цепей. В контексте данного документа, культивирование означает поддержание живых клеток *in vitro* по меньшей мере на протяжении определенного времени. Поддержание может включать в себя, хотя и не обязательно, увеличение популяции живых клеток. Например, клетки, поддерживаемые в культуре, могут быть статическими в популяции, но по-прежнему жизнеспособными и способны производить желаемый продукт, например, рекомбинантный белок или рекомбинантный слитый белок. Подходящие условия для культивирования эукариотических клеток хорошо известны в данной области техники и включают в себя надлежащий выбор питательных сред, добавки к питательным средам, температуру, pH, насыщение кислородом и тому подобное. Для коммерческих целей, культивирование может включать в себя использование любого из различных типов систем промышленного масштаба, в том числе встряхиваемые колбы, вращающиеся флаконы, биореакторы с полыми волокнами, биореакторы с механическим перемешиванием, аэрильные биореакторы, волновые биореакторы и другие.

Условия культивирования клеток также подбираются таким образом, чтобы позволить фрагменту ФВ соединиться с белком FVIII. Условия, обеспечивающие экспрессию фрагмента ФВ и/или белка FVIII могут включать в себя наличие источника витамина К. Например, в одном варианте реализации изобретения стабильно трансфицированные клетки НЕК293 культивируются в среде CD293 (Инвитроджен, Карлсбат, Калифорния) или среде OptiCHO (Инвитроджен, Карлсбат, Калифорния) с добавлением 4 мМ глутамин.

В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу экспрессии, изготовления или производства химерного белка настоящего изобретения, который включает а) трансфекцию клетки-хозяина,

содержащей полинуклеотид, кодирующий химерный белок и b) культивирование клетки-хозяина в культуральной среде, в условиях, подходящих для экспрессии химерного белка, причем химерный белок является экспрессированным.

В дополнительных вариантах реализации изобретения в среду секретируется белковый продукт, содержащий белок FVIII, связанный с первой константной областью ИГ или ее частью и/или белок ФВ, слитый со второй константной областью ИГ или ее частью с помощью последовательности ХТЕН. Среда отделяется от клеток, концентрируется, фильтруется, а затем пропускается через две или три колонки для аффинной хроматографии, например, колонку белка А и одну или две анионообменные колонки.

В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к химерному белку, полученному способами, описанными в данном документе.

Производство *in vitro* позволяет выход на промышленные масштабы для получения большого количества желаемых измененных полипептидов данного изобретения. Методики культивирования клеток млекопитающих в условиях культивирования тканей известны в данной области техники и включают в себя гомогенную суспензионную культуру, например, в аэролитном реакторе или в реакторе непрерывного действия с мешалкой, или иммобилизированной или инкапсулированной культуре клеток, например, в полых волокнах, микрокапсулах, на агарозных микрогранулах или керамических картриджах. Хроматография включает в себя, например, аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, гель-фильтрацию, хроматографию с обращенной фазой и адсорбционную хроматографию (Strategies for Protein Purification and Characterization:

IV. Фармацевтическая композиция.

Композиции, содержащие химерный белок настоящего изобретения могут содержать подходящий фармацевтически приемлемый носитель. Например, они могут содержать наполнители и/или вспомогательные вещества, которые облегчают переработку активных соединений в препараты, предназначенные для доставки к месту действия.

Фармацевтическая композиция может быть приготовлена для парентерального введения (т.е. внутривенно, подкожно или внутримышечно) путем болюсной инъекции. Лекарственные формы для инъекции могут быть представлены в единичной лекарственной форме, например, в ампулах или в многодозовых контейнерах с добавленным консервантом. Композиции могут принимать формы суспензий, растворов или эмульсий в масляных или водных жидких носителях, и содержать вспомогательные агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. В альтернативном варианте, активный ингредиент может быть в форме порошка для разбавления с подходящим носителем, например, апиогенной водой.

Подходящие для парентерального введения лекарственные формы также включают водные растворы активных соединений в водорастворимой форме, например, водорастворимые соли. Кроме того, могут быть введены суспензии активных соединений в виде подходящих масляных суспензий для инъекций. Подходящие липофильные растворители и носители включают жирные масла, например, кунжутное масло или синтетические сложные эфиры жирных кислот, например, этилолеат или триглицериды. Водные суспензии для инъекций могут содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, в том числе, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит и декстран. В некоторых случаях, суспензия может также содержать стабилизаторы. Для инкапсулирования молекул изобретения с целью доставки в клетки или интерстициальные пространства также могут быть использованы липосомы. Примерные фармацевтически приемлемые носители представляют собой физиологически совместимые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие всасывание агенты, воду, физиологический раствор, физиологический раствор с фосфатным буфером, декстрозу, глицерин, этанол и тому подобные. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция содержит изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. В других вариантах реализации изобретения композиции содержат фармацевтически приемлемые вещества, такие как смачивающие агенты или небольшие количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульсифицирующие агенты, консерванты или буферы, которые увеличивают срок хранения или эффективность активных ингредиентов.

Композиции данного изобретения могут быть представлены в различных формах, включая, например, жидкости (например, инъекционные и нерастворимые растворы), дисперсии, суспензии, полутвердые и твердые лекарственные формы. Выбор предпочтительной формы зависит от способа введения и терапевтического применения.

Композиция может быть сформулирована в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Стерильные инъекционные растворы могут быть получены путем объединения активного ингредиента в необходимом количестве в подходящем растворителе с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по необходимости, с последующей стерилизующей фильтрацией. В общем, дисперсии получают введением активного ингредиента в стерильный растворитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае использования стерильных порошков для изготовления стерильных инъекционных растворов предпочтительными

способами приготовления являются вакуумная сушка и лиофилизация, в результате которых образуется порошкообразное вещество активного ингредиента, а также любой необходимый дополнительный ингредиент из раствора, предварительно стерилизованного путем фильтрации. Надлежащая текучесть раствора может поддерживаться, например, посредством покрытия оболочкой, такой как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии, а также использованием поверхностно-активных веществ. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может осуществляться путем включения в композицию вещества, которое задерживает абсорбцию, например, солей моностеарата и желатина.

Активный ингредиент может быть приготовлен с лекарственной формой или устройством, которые имеют контролируемое высвобождение. Примеры таких лекарственных форм и устройств включают имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Могут использоваться биоразрушаемые, биосовместимые полимеры, например, этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы получения таких лекарственных форм и устройств известны в данной области техники. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, изд., Marcel Dekker, Inc., Нью-Йорк, 1978.

Инъекционные лекарственные формы пролонгированного действия могут быть изготовлены путем формирования микроинкапсулированных матриц лекарственного средства в поддающихся биологическому разложению полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения лекарственного средства и полимера, а также природы применяемого полимера, скоростью высвобождения лекарственного средства можно управлять. Другими типичными поддающимися биологическому разложению полимерами являются полиортоэфир и полиангидриды. Инъекционные лекарственные формы пролонгированного действия также могут быть получены включением лекарственного средства в липосомы или микроэмульсии.

Дополнительные активные соединения могут быть введены в состав композиций. В одном варианте реализации изобретения химерный белок изобретения приготовлен с другим фактором свертывания крови или его вариантом, фрагментом, аналогом или производным. Так, например, фактор свертывания крови включает, не ограничиваясь, фактор V, фактор VII, фактор VIII, фактор IX, фактор X, фактор XI, фактор XII, фактор XIII, протромбин, фибриноген, фактор фон Виллебранда или рекомбинантный растворимый тканевый фактор (rsTF) или активированные формы любого из предыдущих факторов. Фактор свертывания крови гемостатического средства также может включать антифибринолитические лекарственные средства, например, аминокaproновую кислоту, транексамовую кислоту.

Схемы дозирования могут быть подобраны для обеспечения оптимального желаемого ответа. Так, например, может быть введена одноразовая доза, в динамике могут быть введены несколько отдельных доз, или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена, как указывается при остроте терапевтической ситуации. Преимущественным является формулировать парентеральные композиции в одноразовой дозированной форме для простоты введения и однородности дозы. См., например, *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Pub. Co., Истон, штат Пенсильвания, 1980 год).

В дополнение к активным соединениям, жидкая лекарственная форма может содержать инертные разбавители такие как вода, этиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла, глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и жирнокислотные эфиры сорбитана.

Не ограничивающие изобретение примеры подходящих фармацевтических носителей описаны также в *Remington's Pharmaceutical Sciences* E. W. Martin. Некоторые примеры наполнителей включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропилен, гликоль, воду, этанол и тому подобные. Композиция может также содержать pH буферизующие реагенты и увлажняющие или эмульгирующие агенты.

Для перорального введения фармацевтическая композиция может принимать форму таблеток или капсул, полученных обычными способами. Композиция также может быть приготовлена в виде жидкости, например, сиропа или суспензии. Жидкость может содержать суспендирующие агенты (например, сироп сорбита, производные целлюлозы или гидрогенизированные пищевые жиры), эмульгирующие агенты (лецитин или аравийскую камедь), неводные носители (например, миндальное масло, жирные сложные эфиры, этиловый спирт или фракционированные растительные масла) и консерванты (например, метил или пропил-п-гидроксибензоаты или сорбиновую кислоту). Препараты могут также включать ароматизаторы, красители и подсластители. В альтернативном варианте, композиция может быть представлена в виде сухого продукта для разведения водой или другим подходящим носителем.

Для буккального введения, в соответствии с обычными протоколами, композиция может принимать форму таблеток или пастилок.

Для введения путем ингаляции, соединения, используемые в соответствии с настоящим изобретением, обычно доставляются в виде распыленного аэрозоля с или без вспомогательных веществ или в виде аэрозольного спрея из аэрозольной упаковки или распылителя, в некоторых случаях, с газом-вытеснителем, например, дихлордифторметаном, трихлорфторметаном, дихлортетрафторметаном, диок-

сидом углерода или другим подходящим газом. В случае аэрозоля под давлением, единица дозы может быть определена с помощью клапана для доставки дозированного количества. Для использования в ингаляторе или инсуффляторе могут быть сформулированы капсулы и картриджи из, например, желатина с содержанием порошкообразной смеси соединения и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал.

Фармацевтическая композиция также может быть приготовлена для ректального введения в виде суппозитория или удерживающей клизмы, например, содержащих обычные суппозиторные основы, такие как масло какао или другие глицериды.

В одном варианте реализации изобретения фармацевтическая композиция содержит химерный белок, полинуклеотид, кодирующий химерный белок, вектор, содержащий полинуклеотид, или клетку-хозяина, содержащую вектор и фармацевтически приемлемый носитель. Белок FVIII в химерном белке имеет более продолжительный период полувыведения по сравнению с белком FVIII дикого типа или соответствующим белком FVIII без фрагмента ФВ. В одном варианте реализации изобретения, в котором период полувыведения химерного белка по меньшей мере в около 1,5 раза, по меньшей мере в около 2 раза, по меньшей мере в около 2,5 раза, по меньшей мере в около 3 раза, по меньшей мере в около 4 раза, по меньшей мере в около 5 раз, по меньшей мере в около 6 раз, по меньшей мере в около 7 раз, по меньшей мере в около 8 раз, по меньшей мере в около 9 раз, по меньшей мере в около 10 раз, по меньшей мере в около 11 раз или по меньшей мере в около 12 раз более продолжителен чем таковой у белка FVIII дикого типа. В другом варианте реализации изобретения период полувыведения Фактора VIII составляет по меньшей мере около 17 ч, по меньшей мере около 18 ч, по меньшей мере около 19 ч, по меньшей мере около 20 ч, по меньшей мере около 21 ч, по меньшей мере около 22 ч, по меньшей мере около 23 ч, по меньшей мере около 24 ч, по меньшей мере около 25 ч, по меньшей мере около 26 ч, по меньшей мере около 27 ч, по меньшей мере около 28 ч, по меньшей мере около 29 ч, по меньшей мере около 30 ч, по меньшей мере около 31 ч, по меньшей мере около 32 ч, по меньшей мере около 33 ч, по меньшей мере около 34 ч, по меньшей мере около 35 ч, по меньшей мере около 36 ч, по меньшей мере около 48 ч, по меньшей мере около 60 ч, по меньшей мере около 72 ч, по меньшей мере около 84 ч, по меньшей мере около 96 ч или по меньшей мере около 108 ч.

В некоторых вариантах реализации изобретения композиция вводится путем, выбранным из группы, состоящей из местного введения, интраокулярного введения, парентерального введения, интратекального введения, субдурального введения и перорального введения. Парентеральное введение может быть внутривенным или подкожным введением.

В других вариантах реализации изобретения композиция используется для лечения геморрагического заболевания или состояния, у пациента, имеющего для этого показания. Геморрагическое заболевание или состояние выбрано из группы, состоящей из кровотечения, вызванного нарушением свертываемости крови, гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения полости рта, кровоизлияния, мышечного кровоизлияния, кровоизлияния полости рта, травмы, травмы головы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома костей, кровотечения центральной нервной системы, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве, кровотечения во влагалище подвздошно-поясничной мышцы и их любых комбинациях. В других вариантах реализации изобретения субъект планирует перенести операцию. В еще одних вариантах реализации изобретения лечение является профилактическим или по требованию.

V. Генная терапия.

Химерный белок настоящего изобретения может быть получен *in vivo* в организме млекопитающего, например, человеческого пациента, с использованием подходов генной терапии, а также может быть терапевтически полезным для лечения геморрагического заболевания или расстройства, выбранного из группы, состоящей из кровотечения, вызванного нарушением свертываемости крови, гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения полости рта, кровоизлияния, мышечного кровоизлияния, кровоизлияния полости рта, травмы, травмы головы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома костей, кровотечения центральной нервной системы, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве и кровотечения во влагалище подвздошно-поясничной мышцы. В одном варианте реализации изобретения геморрагическое заболевание или расстройство является гемофилией. В другом варианте реализации изобретения геморрагическое заболевание или расстройство является гемофилией А. Это включает в себя введение подходящей химерной, функционально связанной с подходящими регуляторными последовательностями нуклеиновой кислоты, кодирующей белок. В определенном варианте реализации изобретения эти последовательности входят в состав вирусного вектора. Подходящие для такой генной терапии вирусные векторы включают аденовирусные векторы, лентивирусные векторы, бакуловирусные векторы, векторы на основе вируса Эпштейна-Барра, паповавирусные векторы, векторы на основе вируса коровьей оспы, векторы на основе вируса простого герпеса и векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV). Вирусный вектор может быть вирусным вектором с дефектной репликацией. В других вариантах реализации изобретения аденовирусный вектор имеет делецию в его

Е1 гене или Е3 гене. Когда используется аденовирусный вектор, млекопитающее может не подвергаться воздействию нуклеиновой кислоты, кодирующей селективируемый маркерный ген. В других вариантах реализации изобретения последовательности включены в невирусный вектор, известный специалистам в данной области техники.

VI. Способы использования химерного белка.

Настоящее изобретение относится к способу использования химерного белка, описанного в настоящем документе, для предотвращения или ингибирования связывания эндогенного ФВ с белком FVIII. Настоящее изобретение относится к способу использования химерного белка, имеющего белок FVIII связанный с XTEN и константную область ИГ или его часть.

Один аспект настоящего изобретения относится к предотвращению или ингибированию взаимодействия FVIII с эндогенным ФВ путем блокирования или экранирования сайта связывания ФВ на FVIII от эндогенного ФВ и в то же время продлевая период полувыведения химерного белка с использованием последовательности XTEN в комбинации с константной областью ИГ или его части, что также может увеличителем периода полувыведения. В одном варианте реализации изобретение относится к способу конструирования белка FVIII, имеющего более длительный период полувыведения, чем FVIII дикого типа. Химерный белок, который является пригодным для использования в способе, включает любой один или более химерный белок, описанный в настоящем документе.

Другой вариант реализации настоящего изобретения включает в себя способ введения субъекту, имеющему для этого показания, химерного белка, содержащего белок FVIII, имеющий более продолжительный период полувыведения, чем такой у дикого типа FVIII, причем способ включает введение химерного белка, описанного в настоящем документе, субъекту.

В одном варианте реализации изобретение относится к способу использования последовательности XTEN и константной области ИГ или его части для продления периода полувыведения химерного белка, содержащего белок FVIII и белок ФВ, что предотвращает или ингибирует взаимодействие эндогенного ФВ с белком FVIII. Белок FVIII связан с последовательностью XTEN (например, FVIII(X)) и затем связан или соединен с белком ФВ, слитым с XTEN и константной областью ИГ или его частью, является экранированным или защищенным от пути клиренса ФВ и поэтому имеет сниженный клиренс по сравнению с белком FVIII, не связанным с белком ФВ. Таким образом экранированный белок FVIII имеет максимальное продление периода полувыведения по сравнению с белком FVIII, не связанным или соединенным с последовательностью XTEN и белком ФВ. В некоторых вариантах реализации изобретения белок FVIII, соединенный с или защищенный белком ФВ и связанный с последовательностью XTEN, не очищается через рецептор клиренса ФВ. В некоторых вариантах реализации изобретения белок FVIII, соединенный с или защищенный белком ФВ и связанный с последовательностью XTEN, выводится из системы медленнее, чем белок FVIII, не соединенный с или защищенный белком ФВ и связанный с последовательностью XTEN.

В одном аспекте химерный белок, содержащий белок FVIII, связанный с последовательностью XTEN, или белок FVIII, связанный или соединенный с белком ФВ, связанным с XTEN, имеет пониженный клиренс из кровотока, так как белок ФВ не содержит сайт связывания с рецептором клиренса ФВ. Белок ФВ предотвращает или ингибирует клиренс FVIII, связанного или соединенного с белком ФВ, из системы через путь клиренса ФВ. Пригодные для настоящего изобретения белки ФВ могут также обеспечить, по меньшей мере одно или более ФВ-подобных FVIII свойств защиты, которые обеспечиваются эндогенными ФВ. В некоторых вариантах реализации изобретения белок ФВ или последовательность XTEN могут также скрывать один или более сайт связывания с рецептором клиренса FVIII, таким образом, предотвращая клиренс FVIII через свой собственный путь клиренса.

В некоторых вариантах реализации изобретения предотвращение или ингибирование связывания белка FVIII с эндогенным ФВ через белок ФВ или последовательность XTEN может происходить *in vitro* или *in vivo*.

Также предложен способ продления периода полувыведения химерного белка, включающий введение химерного белка, описанного в настоящем документе, субъекту, имеющему для этого показания. Период полувыведения неактивированного FVIII, связанного или соединенного с полноразмерным ФВ, составляет около 12-14 ч в плазме крови. При БФВ типа 3, при которой ФВ практически отсутствует в кровотоке, период полувыведения FVIII составляет всего около шести часов, что у таких пациентов приводит к появлению симптомов от легкой до умеренной гемофилии А из-за снижения концентрации FVIII. Период полувыведения химерного белка настоящего изобретения, связанного или соединенного с фрагментом ФВ или последовательностью XTEN, может стать по меньшей мере в около 1,5 раза, 1,6 раза, 1,7 раза, 1,8 раза, 1,9 раза, 2,0 раза, 2,1 раза, в 2,2 раза, 2,3 раза, 2,4 раза, 2,6 раза, 2,7 раза, 2,8 раза, 2,9 раза, 3,0 раза, 3,1 раза, 3,2 раза, 3,3 раза, 3,4 раза, 3,5 раза, 3,6 раза, 3,7 раза, 3,8 раза, 3,9 раза, или в 4,0 раза более продолжительным, чем период полувыведения неактивированного FVIII, связанного или соединенного с полноразмерным ФВ.

В одном варианте реализации изобретения химерный белок, содержащий первый полипептид, содержащий белок FVIII и первую константную область ИГ или ее часть, и второй полипептид, содержащий белок ФВ, XTEN, содержащий менее 288 аминокислот, а также константную область ИГ или его

часть, обладает периодом полувыведения по меньшей мере в около 2 раза, 2,5 раза, 3,0 раза, 3,5 раза, 4,0 раза, 4,5 раза, 5,0 раза, 5,5 раза, 6,0 раза, 7 раз, 8 раз, 9 раз или в 10 раз более продолжительным, чем соответствующий химерный белок, содержащий такой же первый полипептид и второй полипептид без последовательности XTEN или FVIII дикого типа. В другом варианте реализации изобретения химерный белок, содержащий первый полипептид, содержащий белок FVIII и первую константную область ИГ или его часть, и второй полипептид, содержащий белок ФВ, XTEN, содержащий менее 288 аминокислот, и константную область ИГ или его часть, обладает периодом полувыведения в около 2-5 раз, около 3-10 раз, около 5-15 раз, около 10-20 раз, около 15-25 раз, около 20-30 раз, около 25-35 раз, около 30-40 раз, около 35-45 раз более продолжительным, чем соответствующий химерный белок, содержащий такой же первый полипептид и второй полипептид без последовательности XTEN или FVIII дикого типа. В конкретном варианте реализации изобретения, период полувыведения химерного белка данного изобретения становится, по меньшей мере в около 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 раз более продолжительным, чем период полувыведения FVIII дикого типа в мышцах с двойным нокаутом по FVIII и ФВ.

В определенных вариантах реализации изобретения химерный белок демонстрирует период полувыведения около 40 ч у мышей.

В некоторых вариантах реализации изобретения период полувыведения химерного белка является более продолжительным, чем период полувыведения FVIII, соединенного с эндогенным ФВ. В других вариантах реализации изобретения период полувыведения химерного белка является, по меньшей мере в около 1,5 раза, в 2 раза, в 2,5 раза, в 3,5 раза, в 3,6 раза, в 3,7 раза, в 3,8 раза, в 3,9 раза, в 4,0 раза, в 4,5 раза или в 5,0 раза большим чем период полувыведения FVIII дикого типа или белка FVIII, связанного с эндогенным ФВ.

В некоторых вариантах реализации изобретения в результате реализации изобретения период полувыведения химерного белка является продленным по сравнению с белком FVIII без белка ФВ или FVIII дикого типа. Период полувыведения химерного белка изобретения является по меньшей мере в около 1,5 раза, по меньшей мере в около 2 раза, по меньшей мере в около 2,5 раза, по меньшей мере в около 3 раза, по меньшей мере в около 4 раза, по меньшей мере в около 5 раз, по меньшей мере в около 6 раз, по меньшей мере в около 7 раз, по меньшей мере в около 8 раз, по меньшей мере в около 9 раз, по меньшей мере в около 10 раз, по меньшей мере в около 11 раз или по меньшей мере в около 12 раз более продолжительным, чем период полувыведения химерного белка без белка ФВ или FVIII дикого типа. В одном варианте реализации изобретения период полувыведения FVIII является в от около 1,5 раза до около 20 раз, в от около 1,5 раза до около 15 раз или в от около 1,5 раза до около 10 раз более продолжительным, чем период полувыведения FVIII дикого типа. В другом варианте реализации изобретения период полувыведения FVIII продлевается в от около 2 раз до 10 раз, от около 2 раз до около 9 раз, от около 2 раз до около 8 раз, от около 2 раз до около 7 раз, от около 2 раз до около 6 раз, от около 2 раз до около 5 раз, от около 2 раз до около 4 раз, от около 2 раз до около 3 раз, от около 2,5 раз до около 10 раз, от около 2,5 раз до около 9 раз, от около 2,5 раз до около 8 раз, от около 2,5 раз до около 7 раз, от около 2,5 раз до около 6 раз, от около 2,5 раз до около 5 раз, от около 2,5 раз до около 4 раз, от около 2,5 раз до около 3 раз, от около 3 раз до около 10 раз, от около 3 раз до около 9 раз, от около 3 раз до около 8 раз, от около 3 раз до 7 раз, от около 3 раз до около 6 раз, от около 3 раз до около 5 раз, от около 3 раз до около 4 раз, от около 4 раз до около 6 раз, от около 5 раз до около 7 раз или от около 6 раз до около 8 раз по сравнению с FVIII дикого типа или белка FVIII без белка ФВ. В других вариантах реализации изобретения период полувыведения химерного белка изобретения составляет, по меньшей мере около 17 ч, по меньшей мере около 18 ч, по меньшей мере около 19 ч, по меньшей мере около 20 ч, по меньшей мере около 21 ч, по меньшей мере около 22 ч, по меньшей мере около 23 ч, по меньшей мере около 24 ч, по меньшей мере около 25 ч, по меньшей мере около 26 ч, по меньшей мере около 27 ч, по меньшей мере около 28 ч, по меньшей мере около 29 ч, по меньшей мере около 30 ч, по меньшей мере около 31 ч, по меньшей мере около 32 ч, по меньшей мере около 33 ч, по меньшей мере около 34 ч, по меньшей мере около 35 ч, по меньшей мере около 36 ч, по меньшей мере около 40 ч, по меньшей мере около 48 ч, по меньшей мере около 60 ч, по меньшей мере около 72 ч, по меньшей мере около 84 ч, по меньшей мере около 96 ч или по меньшей мере около 108 ч. В еще других вариантах реализации изобретения период полувыведения химерного белка изобретения составляет от около 15 ч до около двух недель, от около 16 ч до около одной недели, от около 17 ч до около одной недели, от около 18 ч до около одной недели, от около 19 ч до около одной недели, от около 20 ч до около одной недели, от около 21 ч до около одной недели, от около 22 ч до около одной недели, от около 23 ч до около одной недели, от около 24 ч до около одной недели, от около 36 ч до около одной недели, от около 48 ч до около одной недели, от около 60 ч до около одной недели, от около 24 ч до около шести дней, от около 24 ч до около пяти дней, от около 24 ч до около четырех дней, от около 24 ч до около трех дней, или от около 24 ч до около двух дней.

В некоторых вариантах реализации изобретения средний период полувыведения химерного белка изобретения на субъект составляет около 15 ч, около 16 ч, около 17 ч, около 18 ч, около 19 ч, около 20 ч, около 21 ч, около 22 ч, около 23 ч, около 24 ч (1 день), около 25 ч, около 26 ч, около 27 ч, около 28 ч, около 29 ч, около 30 ч, около 31 ч, около 32 ч, около 33 ч, около 34 ч, около 35 ч, около 36 ч, около 40 ч, около 44 ч, около 48 ч (2 дня), около 54 ч, около 60 ч, около 72 ч (3 дня), около 84 ч, около 96 ч (4 дня),

около 108 ч, около 120 ч (5 дней), около шести дней, около семи дней (одну неделю), около восьми дней, около девяти дней, около 10 дней, около 11 дней, около 12 дней, около 13 дней или около 14 дней.

В дополнение, изобретение обеспечивает способ лечения или профилактики геморрагического заболевания или расстройства, включающий введение эффективного количества химерного белка. В одном варианте реализации изобретения геморрагическое заболевание или расстройство выбрано из группы, состоящей из кровотечения, вызванного нарушением свертываемости крови, гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения полости рта, кровоизлияния, мышечного кровоизлияния, кровоизлияния полости рта, травмы, травмы головы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома костей, кровотечения центральной нервной системы, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве и кровотечения во влагалище подвздошно-поясничной мышцы. В конкретном варианте реализации изобретения геморрагическое заболевание или расстройство является гемофилией А.

Химерный белок, содержащий последовательность ХТЕН и константную область ИГ или ее часть в комбинации с белком ФВ, описанным в настоящем документе, который предотвращает или ингибирует взаимодействие белка FVIII с эндогенным ФВ, полученным при помощи данного изобретения, имеет множество применений, как будет признано специалистом в данной области техники, в том числе, но не ограничиваясь способами лечения субъекта, имеющего гемостатическое расстройство и способами лечения субъекта, нуждающегося в общем кровоостанавливающем средстве. В одном варианте реализации изобретение относится к способу лечения субъекта, имеющего гемостатическое расстройство, включающему введение эффективного количества химерного белка.

Часть белка фактора FVIII в химерном белке лечит или предотвращает гемостатическое расстройство, выступая в качестве кофактора к фактору IX на отрицательно заряженной поверхности фосфолипида, тем самым формируя комплекс Ха_{se}. Связывание активированных факторов свертывания крови на фосфолипидной поверхности локализует этот процесс в местах повреждения сосудов. На фосфолипидной поверхности, фактор VIIa увеличивает максимальную скорость активации фактора X под действием фактора IXa в около 200000 раз, что приводит ко второму большому импульсу образования тромбина.

Химерный белок изобретения может быть использован для лечения любого гемостатического расстройства. Гемостатические расстройства, которые можно лечить с помощью введения химерного белка изобретения включают в себя, но без ограничений, гемофилию А, а также дефициты или структурные аномалии, относящиеся к фактору VIII. В одном варианте реализации изобретения гемостатическое расстройство является гемофилией А.

Химерный белок изобретения может быть использован в профилактических целях для лечения субъекта с гемостатическим расстройством. Химерный белок изобретения может быть использован для лечения острого эпизода кровотечения у субъекта с гемостатическим расстройством. В другом варианте реализации изобретения гемостатическое расстройство может быть результатом дефектного фактора свертывания крови, например, фактора фон Виллебранда. В одном варианте реализации изобретения гемостатическое расстройство представляет собой наследственное расстройство. В другом варианте реализации изобретения гемостатическое расстройство представляет собой приобретенное расстройство. Приобретенное расстройство может возникнуть в результате лежащего в основе вторичного заболевания или состояния. Состоянием, не связанным с заболеванием может быть, в качестве примера, но не в качестве ограничения, рак, аутоиммунное заболевание или беременность. Приобретенное расстройство может возникнуть в результате старости или от лекарств для лечения, лежащего в основе вторичного расстройства (например, химиотерапии рака).

Изобретение также относится к способам лечения субъекта, который не имеет врожденного гемостатического расстройства, но имеет вторичное заболевание или состояние, приводящее к приобретению гемостатического расстройства, например, из-за развития анти-FVIII антитела или хирургического вмешательства. Таким образом, изобретение относится к способу лечения субъекта, нуждающегося в общем кровоостанавливающем средстве, включающем введение терапевтически эффективного количества химерного белка, полученного настоящими способами.

Настоящее изобретение также относится к способам снижения иммуногенности FVIII или индукции меньшей иммуногенности против FVIII, включающим введение эффективного количества химерных белков описанных в данном документе, или полинуклеотидов, кодирующие то же самое.

В одном варианте реализации изобретения субъект, нуждающийся в общем кровоостанавливающем средстве, подвергается хирургическому вмешательству или собирается перенести хирургическое вмешательство. Химерный белок изобретения может быть введен до, во время или после операции в качестве профилактического курса лечения. Химерный белок изобретения может быть введен до, во время или после операции для контроля эпизода острого кровотечения.

Химерный белок изобретения может быть использован для лечения субъекта, имеющего эпизод острого кровотечения и не имеющего гемостатического расстройства. Эпизод острого кровотечения может возникнуть в результате тяжелой травмы, например, операции, автомобильной аварии, раны, рваной раны в результате ружейного выстрела или любого другого травматического события, приводящего к неконтролируемому кровотечению. Не ограничивающие примеры эпизодов кровотечения включают на-

рушение свертываемости крови, гемартроз, мышечное кровотечение, кровотечение полости рта, кровоизлияние, мышечное кровоизлияние, кровоизлияние полости рта, травму, травму головы, желудочно-кишечное кровотечение, внутричерепное кровоизлияние, внутрибрюшное кровоизлияние, внутригрудное кровоизлияние, перелом костей, кровотечение центральной нервной системы, кровотечение в заглоточном пространстве, кровотечение в забрюшинном пространстве, кровотечение во влагалище подвздошно-поясничной мышцы и их любые комбинации.

В профилактическом применении одна или более композиций, содержащих химерный белок настоящего изобретения, или их смесь, вводятся пациенту, который еще не находится в болезненном состоянии для повышения сопротивляемости пациента или уменьшения симптомов, связанных с заболеванием или расстройством. Такое количество определяется как "профилактически эффективная доза". В терапевтических целях иногда требуются относительно высокие дозы (например, от около 1 до 400 мг/кг полипептида на дозу, при дозах от 5 до 25 мг, являются более широко используемыми для радиоиммунных конъюгатов и более высокие дозы для полипептидов, модифицированных цитотоксическим лекарственным веществом) через относительно короткие промежутки времени до снижения прогрессирования заболевания или его прекращения, и до тех пор, пока пациент не показывает частичное или полное облегчение симптомов заболевания. После этого пациенту может вводиться профилактический режим.

В некоторых вариантах реализации изобретения химерный белок или композицию данного изобретения используют для лечения при необходимости, которое включает лечение острого эпизода кровотечения, гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения из полости рта, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцах, внутриротового кровотечения, травмы, травмы головы (черепно-мозговой травмы), желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома костей, кровотечения в центральной нервной системе, кровоизлияния в заглоточном пространстве, кровоизлияния в забрюшинном пространстве или кровотечения во влагалище подвздошно-поясничной мышцы. Субъект может, нуждается в хирургической профилактике, периоперационном ведении или уходе для хирургического вмешательства. Такие операции включают в себя, например, небольшие операции, обширное хирургическое вмешательство, удаление зуба, миндалин, паховое грыжесечение, синовэктомию, полную замену коленного сустава, трепанацию черепа, остеосинтез, травматологию, внутричерепную хирургию, внутрибрюшную хирургию, внутригрудную хирургию или операции по протезированию сустава.

В одном варианте реализации изобретения химерный белок настоящего изобретения вводят внутривенно, подкожно, внутримышечно или через любую поверхность слизистой оболочки, например, орально, сублингвально, трансбуккально, назально, ректально, вагинально или ингаляционным путем. Химерный белок, содержащий фрагмент FВ и белка FVIII настоящего изобретения, может быть внедрен внутрь или связан с биополимерной твердой подложкой, которая позволяет медленное выделение химерного белка к месту кровотечения или внедрение в биндаж/перевязку. Доза химерного белка будет варьировать в зависимости от субъекта и от конкретного способа введения. Дозы могут варьировать от 0,1 до 100000 мкг/кг веса тела. В одном варианте реализации изобретения диапазон дозирования составляет 0,1-1000 мкг/кг. В другом варианте реализации изобретения диапазон дозирования составляет 0,1-500 мкг/кг. Белок можно вводить непрерывно или через определенные промежутки времени. *In vitro* тесты могут быть использованы для определения оптимальных диапазонов доз и/или графиков для введения. *In vitro* тесты, которые измеряют активность фактора свертывания крови, известны в данной области, например, STA-CLOT VIIa-rTF клоттинговый тест или ROTEM клоттинговый тест. Кроме того, эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-эффект, полученных на животных моделях, например, собаке, больной гемофилией (Mount со соавт. 2002, Blood 99(8):2670).

Теперь, детально описав настоящее изобретение, то же самое будет более четко понято при ссылке на следующие примеры, которые при сем включены только с целью иллюстрации и не предназначены для ограничения данного изобретения. Все патенты, публикации и статьи, упомянутые в данном документе, являются прямо и конкретно включенными в настоящий документ в качестве ссылки.

Примеры

Во всех примерах были использованы следующие материалы и методы, если не указано другое.

Материалы и методы.

В основном, если не указано другое, на практике настоящего изобретения используются обычные методы химии, биофизики, молекулярной биологии, технологии рекомбинантной ДНК, иммунологии (в частности, например, технология антитела), и стандартные методы электрофореза. См., например,

Sambrook, Fritsch and

Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989 год); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996 год); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Изд., Irl Pr (1996 год); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow *co соавт.*, CS.H.L. Press, Pub. (1999 год); и Current Protocols in Molecular Biology, изд. Ausubel *co соавт.*, John Wiley & Sons (1992 год).

Пример 1. Гетеродимеры FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc.

Настоящее изобретение относится к получению химерной молекулы FVIII, соединенной с доменом D'D3 белка фактора фон Виллебранда (ФВ) через Fc-домен IgG. Прикрепленный домен D'D3 предотвращает взаимодействие FVIII с эндогенными ФВ мультимерами. Эта молекула служит платформой для включения других технологий продления полужизни с целью улучшения фармакокинетики химерного белка. Последовательности XTEN были включены в домен В FVIII и между D'D3 и регионом Fc для увеличения периода полувыведения гетеродимера FVIII/ФВ.

Сайт расщепления тромбином между D'D3 и Fc обеспечивает высвобождение домена D'D3 после активации молекулы FVIII тромбином.

Пример 2. Плазмидная конструкция гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc/D'D3-Fc Клонирование тройной мутации ФВ050- ИНН в ФВ031.

Тройная мутация ИНН в Fc препятствует взаимодействию с FcRn, таким образом, молекула, содержащая Fc, не используется повторно по пути FcRn. Три мутации в Fc являются I253 A, H310A, H435A.

ФВ050 был создан путем замены региона Fc плазмиды ФВ031 с Fc-фрагментом, содержащим тройную мутацию ИНН между сайтами рестрикции RsRII и Not I.

Клонирование ФВ057- Клонирование ФВ-Fc с 144 AE XTEN +35 а.к. расщепляемого тромбином линкера.

Олигонуклеотиды.

ESC 155-Олигонуклеотид для 144 AE XTEN в ФВ034-rev

CCCCGCCACCGGATCCCCGCCACCGGATCCCCGCCACCGGATCCCCGCC
ACCGGAACCTCCACCGCCGCTCGAGGCACCTTCTTCAGTGCTGGTGGGCGAGCCCCG
TGGTGACCCTTCCTC

ESC 155-Олигонуклеотид для 144 AE XTEN- GS линкер в ФВ034-rev

GGGAAGAGGAAGACTGACGGTCCGCCAGGAGTTCTGGAGCTGGGCACGG
TGGGCATGTGTGAGTTTTGTGCGCTCCGCTGCCCGGGGGACCAGGGATCCCCGCC
ACCGGATCCCCGCCACCGGATCCCCGCCACCGGATCCCCGCC

ESC 157-Олигонуклеотид для 144 AE XTEN в ФВ031-Fwd

GTGAAGCCTGCCAGGAGCCGATATCGGGCGCGCCAACATCAGAGAGCGCCA
CCCCTGAAAGTGGTCCCGGGAGCGAGCCAGC

Для получения 144 AE-XTEN + 35 а.к. GS линкера с сайтом расщепления тромбином была дважды проведена ПЦР.

Первая реакция ПЦР проводилась с использованием кодирующей ДНК 144- AE XTEN в качестве матрицы и пары праймеров ESC157/ ESC155. Полученный в результате этой реакции ПЦР-продукт длиной около 550 п. н. использовался в качестве матрицы для второй ПЦР-реакции, и был амплифицирован с помощью пары праймеров ESC 157/156. Эта реакция дала продукт длиной ~ 700 п. н. Этот ПЦР-продукт длиной 700 п. н. и плазида ФВ034 затем обрабатывались с EcoRV-HF и RsRII. Каркас плазмиды от расщепленного.

ФВ034 затем использовался для лигирования 700 п. н. ПЦР-продукта.

Клонирование тройной мутации ФВ058- ИНН в ФВ034.

Тройная мутация ИНН в Fc препятствует взаимодействию с FcRn, таким образом, молекула, содержащая Fc, не используется повторно по пути FcRn. Три мутации в Fc являются I253 A, H310A, H435 A.

ФВ058 был создан путем замены региона Fc плазмиды ФВ034 с Fc-фрагментом, содержащим тройную мутацию ИНН между сайтами рестрикции RsRII и Not I.

Клонирование FVIII-263- FVIII 205 с тройной мутацией ИНН.

Тройная мутация ИНН в Fc препятствует взаимодействию с FcRn, таким образом, молекула, содержащая Fc, не используется повторно по пути FcRn. Три мутации в Fc являются I253 A, H310A, H435A.

FVIII-263 был создан путем замены региона Fc плазмиды FVIII 205 с Fc-фрагментом, содержащим

тройную мутацию ИНН между сайтами рестрикции RsRII и Not I.

Клонирование FVIII-282- FVIII-Fc с 144 AE XTEN в домене В.

ESC 158-Олигонуклеотид для 144 AE XTEN в домене В-fwd

AAGAAGCTTCTCTCAAAACGGCGCGCCAACATCAGAGAGCGCCACCCCTGAAAGTG

GTCCCGGGAGCGAGCCAGCCACATCTGGGTCGGAACGCCAGGC

ESC 159-Олигонуклеотид для 144 AE XTEN в домене В-rev

GGTATCATCATAATCGATTTCCTCTTGATCTGACTGAAGAGTAGTACGAGTTATTTTC

AGCTTGATGGCGTTTCAAGACTGGTGGGCTCGAGGCACCTTCTTCAGTGCTGGTGGG

CGAGCCCGCTGGTGACCCTTCCTCAGTGGACGTAGG

Первая реакция ПНР проводилась с использованием кодирующей ДНК 144-AE XTEN в качестве матрицы и пары праймеров ESC158/ESC159. Из этой реакции получается ПЦР-продукт длиной около 550 п. н., а плазмида FVIII 169 затем обрабатывается с ASCii и ClaI. Плазмидный каркас от расщепленного FVIII 169 затем используется для лигирования 550 п. н. продукта ПЦР для получения FVIII 282.

Клонирование FVIII-283- FVIII169 с тройной мутацией ИНН.

Тройная мутация ИНН в Fc препятствует взаимодействию с FcRn, таким образом, молекула, содержащая Fc, не используется повторно по пути FcRn. Три мутации в Fc являются I253 A, H310A, H435A.

FVIII-283 был создан путем замены региона Fc плазмиды FVIII 169 с Fc-фрагментом, содержащим тройную мутацию ИНН между сайтами рестрикции RsRII и Not I.

Пример 3. Получение FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc в клетках HEK293.

Фиг. 2. Схематическое изображение, иллюстрирующее экспрессию конструктора FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc. С использованием Полиэтиленимина (ПЭИ) была сделана контрансфекция трех плазмид в клетках HEK293. Первая плазмида получает экспрессию FVIII-XTEN-Fc, вторая плазмида экспрессирует D1D2D'D3-XTEN-Fc, и третья плазмида экспрессирует PACE/фурин, который требуется для ферментативного удаления пропептида, то есть, домена D1D2 из D1D2D'D3-XTEN-Fc. Продукты этой трехплазмидной системы экспрессии включают гетеродимер FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc, гомодимер D'D3-XTEN-Fc и следы гемизиготного выглядящих видов FVIII-XTEN-Fc.

Пример 4. Очистка гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc.

С целью очистки гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc для первой концентрации кондиционированной среды в 10 раз, используется стадия тангенциальной поточной фильтрации (ТПФ). Продукты в фильтрате затем дополнительно очищаются с использованием аффинной хроматографии с последующей обессоливающей колонкой. Чистота молекулы является приемлемой по эксклюзионной ВЭЖХ и дополнительно подтверждается с помощью Вестерн-блоттинга. Специфическая активность молекулы сопоставима с доменом В удаленного FVIII, как измеряется с помощью анализа активности FVIII (пример 5) и измерения ОП280.

Пример 5. Специфическая активность гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc.

Активность гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc измеряется с помощью хромогенного анализа FVIII и анализа активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) FVIII. Специфическая хромогенная активность и специфическая активность АЧТВ SQ BDD-FVIII, rFVIII169/ФВ034 и rFVIII169/ФВ057 изложены в табл. 16. По сравнению с SQ BDD-FVIII, мы наблюдали сопоставимые специфические хромогенные виды деятельности и 60 % сокращение специфической активности АЧТВ для rFVIII169/ФВ034 и rFVIII169/ФВ057.

Таблица 16

Специфическая активность гетеродимерных вариантов

FVIII	SQ BDD-FVIII	rFVIII169/ФВ034	rFVIII160/ФВ057
Специфическая хромогенная активность (МЕ/пмоль)	0,9 – 2,0	1,1-1,2	0,8-1,6
Специфическая активность АЧТВ (МЕ/пмоль)	0,75-1,7	0,4	0,3-0,6

Хромогенный анализ FVIII.

Активность FVIII измерялась с использованием набора COATEST SP FVIII из DiaPharma (продукция

#: K824086), все инкубирования были выполнены на 37°C пластинчатом нагревателе при встряхивании.

Восьмой Международный Стандарт Свертывания Крови Фактора VIII:С ВОЗ, Концентрат, с кодовым именем 07/350 используется в качестве анализа стандарта, диапазон стандарта был от 100 мМЕ/мл до 0,78 мМЕ/мл. Контроль объединенного анализа нормальной человеческой плазмы и тестируемые образцы (разведенные буфером 1X Coatest) добавляются в 2НВ 96-луночные плашки Immulon в двух повторях (25 мкл/лунка). Свежеприготовленная смесь IXa/FX/Фосфолипид (50 мкл), 25 мкл 25 мМ CaCl₂, и 50 мкл субстрата FXa последовательно добавлялись в каждую лунку с 5-минутной инкубацией между каждым добавлением. После инкубирования с субстратом, для окончания цветной реакции добавлялись 25 мкл 20% уксусной кислоты, поглощение OD₄₀₅ измерялось с помощью прибора SpectraMax плюс (Молекуляр Девайсес). Данные анализировались с помощью программного обеспечения SoftMax Pro (версия 5.2). Нижний предел количественного определения (НПКО) составляет 7,8 мМЕ/мл.

Анализ АЧТВ FVIII.

Анализ АЧТВ FVIII осуществлялся на анализаторе коагуляции Sysmex CA-1500 следующим образом: Сначала 50 мкл вручную разбавленных образцов, стандартов и Контролей в АЧТВ буфере (50 мМ Трис, 100 мМ NaCl, 1% ЧСА, pH 7,4) добавлялись прибором в реакционную кювету, с последующим добавлением 50 мкл FVIII-дефицитной плазмы (Джордж Кинг Био-Медикал, продукт #: 0800). После инкубации при температуре 37°C в течение 1 мин, 50 мкл реагента АЧТВ (активированный реагент цефалопластина Actin® FSL - Дейд Беринг, ссылка # B4219-2) добавлялись к реакционной смеси, и инкубировались при 37°C в течение 4-х мин. Впоследствии, добавлялись 50 мкл 20 мМ CaCl₂ (Дейд Беринг, ссылка # ORFO37), и реакционная кювета немедленно переносилась в одну из четырех позиций канала спектрофотометра для измерения количества преломленного света в смеси, которое, с помощью программного алгоритма прибора, конвертировалось в возникновение свертываемости. Зафиксированное время свертывания крови было отрезком времени от добавления CaCl₂ до наступления образования сгустка. Анализ стандарта генерируется путем разбавления Восьмого Международного Стандарта FVIII ВОЗ в буфере АЧТВ в диапазоне от 100 мМЕ/мл до 0,78 мМЕ/мл. Калибровочная кривая была построена как время свертывания крови (в секундах) в виде Y-оси в сравнении с логарифмом (база 10) активности FVIII (мМЕ/мл) в виде X-оси в MS Excel, активность отдельных образцов рассчитывалась с использованием формулы для линейной регрессии этой калибровочной кривой. На основе проведения анализа, нижний предел количественного определения (НПКО) составлял 7,8 мМЕ/мл.

Пример 6. Аддитивный эффект вставок XTEN на продление периода полувыведения гетеродимера.

Вставки XTEN были включены в гетеродимеры для продления периода полувыведения. Вставка одной аминокислоты (а.к.) 288 AE-XTEN в домене В FVIII приводит к периоду полувыведения гетеродимера длительностью 16,7 ч у мышей с гемофилией А, как демонстрируется rFVIII169/ФВ031 на фиг. 3. Для дальнейшего улучшения периода полувыведения гетеродимера, вторая вставка XTEN длиной 144 а.к. или 288 а.к. была включена в FVIII169/ФВ031 как в домен А1 FVIII, так и непосредственно вниз по течению фрагмента D'D3, соответственно, варианты гетеродимера были названы FVIII205/ФВ031 и FVIII169/ФВ034.

Периоды полувыведения rFVIII169/ФВ031, rFVIII205/ФВ031 и rFVIII169/ФВ034 оценивались на FVIII-дефицитных (HemA) мышках путем однократного внутривенного введения тестируемых молекул в дозе 200 МЕ/кг. Образцы плазмы собирались в определенных временных точках, как показано на фиг. 3, FVIII активность образцов определялась с помощью хромогенного анализа FVIII, параметры ФК рассчитывались с использованием программы WinNonlin-Phoenix и перечислены в табл. 17.

Как показано на фиг. 3 и табл. 17, добавление второй вставки XTEN как в домен А1 FVIII, так и вниз по течению D'D3 дополнительно улучшает период полувыведения гетеродимера на 29,45 или 31,10, соответственно. Кроме того, обе вставки XTEN демонстрировали более чем 2-х кратное улучшение клиренса и AUC.

Таблица 17

Параметр ФК гетеродимеров мышей HemA

FVIII	Вставки XTEN		T _{1/2} (ч)	MRT (ч)	Cl (мл/ч/кг)	Vss (мл/кг)	AUC_D (кг*ч/мл)
	Встраивание 1	Встраивание 2					
rFVIII169/ФВ031	B*-AE288		16,65	18,44	3,57	85,72	0,28
rFVIII205/ФВ031	B*-AE288	A1-AE144	29,45	36,02	1,76	63,56	0,57
rFVIII169/ФВ034	B*-AE288	D'D3-AE288	31,10	34,57	1,73	59,77	0,58

Пример 7. 144 а.к. AE-XTEN предоставляет лучший период полувыведения чем 288 а.к. AE-XTEN при вставке между доменами D'D3 и Fc.

Другой гетеродимер-FVIII169/ФВ057 был сконструирован в попытке определения оптимальной

длины вставки XTEN в цепи D'D3-XTEN-Fc, в которой длина вставки XTEN была уменьшена с 288 а.к. до 144 а.к. Как показано на фиг. 4, по сравнению с rFVIII169/ФВ034, период полувыведения rFVIII169/ФВ057 был увеличен с 31 ч до 42 ч. Улучшенный клиренс и AUC также наблюдаются для rFVIII169/ФВ057, данные приведены в табл. 18. Таким образом, при вставке между D'D3 и доменом Fc гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc, 144 а.к. вставка AE-XTEN является более оптимальной, чем AE-288 а.к. XTEN.

Таблица 18

Параметры ФК rFVIII169/ФВ034 и rFVIII169/ФВ057 в мышах HemA

FVIII	T_{1/2} (ч)	MRT (ч)	Cl (мл/ч/кг)	Vss (мл/кг)	AUC_D (кг*ч/мл)
rFVIII169/ФВ034	31,10	34,57	1,73	59,77	0,58
rFVIII169/ФВ057	42,23	53,24	0,97	51,44	1,03

Пример 8. Домен Fc продлевает период полувыведения гетеродимера.

Домены Fc продлевают период полувыведения их слитых белков путем FcRn-опосредованного пути рециркуляции. С целью подтверждения необходимости домена Fc для продолжения периода полувыведения гетеродимера, Fc-домены дикого типа были заменены тройным мутантом (I253A/H310A/H435A; ИНН) в rFVIII205/ФВ031 с образованием rFVIII263/ФВ050, полное устранение связывания FcRn было подтверждено с помощью анализа Поверхностного Плазмонного Резонанса (Биакор) для rFVIII263/ФВ050. Период полувыведения FVIII263/ФВ050 оценивался у мышей HemA по сравнению с rFVIII205/ФВ031. Как показано на фиг. 5 и в табл. 19, улучшенная скорость клиренса, также как и уменьшенный период полувыведения и AUC, наблюдались для rFVIII263/ФВ050. Этот результат демонстрировал, что в дополнение к обеспечению ковалентного связывания FVIII и D'D3, домены Fc также являются необходимыми для улучшения периода полувыведения гетеродимера.

Таблица 19

Параметры ФК rFVIII205/ФВ031 и rFVIII263/ФВ040 в мышах HemA

FVIII	Мутация в домене Fc	T_{1/2} (ч)	MRT (ч)	Cl (мл/ч/кг)	Vss (мл/кг)	AUC_D (кг*ч/мл)
rFVIII205/ФВ031	Отсутствие	29,45	36,02	1,76	63,56	0,57
rFVIII263/ФВ050	ИНН	22,96	26,15	2,36	61,69	0,42

Пример 9. Мгновенная эффективность гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc на модели кровотечения хвоста мышей HemA.

Мгновенная эффективность лидирующих кандидатов гетеродимеров оценивалась с использованием модели кровотечения хвоста мышей HemA.

Самцы мышей HemA в возрасте 8-12 недель рандомизировались на 4 лечебные группы и подвергались одному внутривенному введению SQ BDD-FVIII, rFVIII169/ФВ034, rFVIII169/ФВ057 или раствора наполнителя, соответственно. В целях имитирования эпизодического лечения FVIII (для воссоздания 50-100% от нормального уровня плазматического FVIII), выбранная доза лечения FVIII составляет 75 МЕ/кг, как измерено активностью АЧТВ FVIII. При такой величине дозы, все тестируемые варианты FVIII будут воспроизводить ~70% от нормальной активности мышинового плазматического FVIII, по истечении 5 мин после введения дозы.

Объем потери крови каждого отдельного животного в исследовании отображен на графике, на фиг. 6. Значительное снижение объема потери крови наблюдалось для всех групп лечения FVIII по сравнению с животными, которые обрабатывались наполнителем. В пределах трех групп лечения FVIII, не было обнаружено статистически значимых отличий в снижении потери крови, предполагая что молекулы гетеродимеров могут потенциально быть такими же эффективными как SQ BDD-FVIII для лечения при необходимости.

Объем потери крови каждого отдельного животного в исследовании отображен на графике, на фиг. 6. Значительное снижение объема потери крови наблюдалось для всех групп лечения FVIII по сравнению с животными, которые обрабатывались наполнителем. В пределах трех групп лечения FVIII, не было обнаружено статистически значимых отличий в снижении потери крови, предполагая что молекулы гетеродимеров могут потенциально быть такими же эффективными как SQ BDD-FVIII для лечения при необходимости.

Кроме того, мыши HemA обрабатывались более низкой дозой (37,5 МЕ/кг) rBDD-FVIII или FVIII169/ФВ034, результаты проиллюстрированы на фиг. 6В. Как и при дозе 75 МЕ/кг, rFVIII169/ФВ034 обеспечивали такую же защиту для мышей HemA после повреждения хвоста, что и BDD-FVIII, показывая тем самым, что молекула по-прежнему является эффективной для лечения тяжелых эпизодов кровотечений при ~35% от нормального циркулирующего мышинового уровня FVIII в мышах HemA.

Процедура повреждения хвоста проводилась следующим образом.

Кратко, мыши анестезировались с помощью коктейля 50 мг/кг кетамина/0,5 мг/кг дексмететомидина до начала повреждения хвоста и помещались на электрическую грелку 37°C, чтобы помочь поддерживать температуру тела. Хвосты мышей затем погружались в 37°C физиологический раствор в течение 10 мин, с целью расширения боковой вены. После того, как вена расширялась, через хвостовую вену вводились варианты FVIII или раствор наполнителя, а по истечении 5 мин после введения дозы, дистальные 5 мм хвоста отрезались с использованием скальпеля с прямым краем #11. Пролитая кровь собиралась в 13 мл 37°C физиологического раствора в течение 30 мин, а объем кровопотери определялся изменением веса трубки для сбора крови: объем потери крови=(конечный вес трубки для сбора крови - начальный вес +0,10) мл. Статистический анализ проводился с использованием t-критерия (критерий Манна-Уитни) и одним из способов дисперсионного анализа (критерий Краскела-Уоллиса, апостериорный: критерий множественного сравнения Данна).

Пример 10. Профилактическая эффективность гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc на модели кровотечения разрезанной хвостовой вены мыши HemA.

Профилактическая эффективность FVIII169/ФВ057 была проверена на модели разрезанной хвостовой вены (tail vein transection - TVT) мыши HemA. TVT модель индуцирует кровотечение путем повреждения боковой вены хвоста мыши, такое повреждение имитирует спонтанные эпизоды кровотечения у пациентов с гемофилией (нарушением свертываемости крови).

Самцы мышей HemA в возрасте 8-10 недель рандомизировались в 4 лечебные группы, и обрабатывались либо FVIII169/ФВ057 за 72 ч до повреждения хвостовой вены, или SQ BDD-FVIII за 24 ч или 48 ч до повреждения. Животные, которые обрабатывались наполнителем, использовались в качестве отрицательного контроля. На графике, на фиг. 7 отображены случаи повторного кровотечения или эвтаназии из-за чрезмерной потери крови в течение 24 ч после повреждения.

Как проиллюстрировано на фиг. 7, в отличие от мышей, которых обрабатывали SQ BDD-FVIII за 48 ч до TVT, у которых после повреждения наблюдалась лишь ограниченная защита, мыши, получавшие rFVIII169/ФВ057 за 72 ч до повреждения хвоста имели аналогичную защиту от повторного кровотечения и выживаемость по сравнению с мышами, получавшими SQ BDD-FVIII лечение за 24 ч до TVT, что означает, что rFVIII169/ФВ057 может обеспечить, по меньшей мере в 3 раза или более (например, в 4 раза) длительную защиту мышей HemA в модели TVT. Таким образом, FVIII169/ФВ057 может значительно снизить частоту лечения текущей профилактики FVIII.

Подобным образом мыши HemA обрабатывались гетеродимерами FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc: rFVIII169/ФВ034 и rFVIII169/ФВ057 за 24 ч или 96 ч до повреждения хвостовой вены. Данные о лечении повторного кровотечения и выживаемости были сопоставлены с данными лечения BDD-FVIII за 24 или 48 ч до повреждения и наполнителя. В то время как повторное кровотечение у мышей, получавших rBDD-FVIII, в течение 24 ч до повреждения хвостовой вены, было похоже на такое у мышей, лечившихся носителем, данные о повторном кровотечении мышей, лечившихся гетеродимерами за 24 ч до повреждения, являются значительно лучшими, чем в группе лечения наполнителем. Кроме того, данные повторного кровотечения мышей, лечившихся гетеродимерами, за 96 ч до повреждения были сопоставимы с мышами, получавшими rBDD-FVIII за 24 ч до повреждения. Что касается коэффициента выживаемости через 24 ч после повреждения TVT, в отличие от потребности менее чем 50% коэффициента выживаемости мышей, лечившихся rBDD-FVIII, более чем 90% мышей выжили после повреждения TVT с лечением гетеродимерами FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc, когда молекулы FVIII вводились за 24 ч до повреждения. Кроме того, выживаемость у мышей, получавших гетеродимеры FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc за 96 ч до повреждения хвостовой вены была лучше (в случае rFVIII169/ФВ034) или сопоставимой (в случае rFVIII169/ФВ057) по сравнению с мышами, получавшими лечение rBDD-FVIII за 24 ч до повреждения. Данные о повторном кровотечении и выживаемости указывали на 4-кратную эффективность пролонгации лечения гетеродимером FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc в сравнении с лечением rBDD-FVIII.

Модель разрезанной хвостовой вены мышей HemA.

Процедура разреза хвостовой вены хвоста проводилась следующим образом. Мышей анестезировали коктейлем, содержащим 50 мг/кг кетамина, 0,125 мг/кг дексмететомидина и 0,1 мг/кг бупренекса. При адекватной глубине наркоза, боковую хвостовую вену мышей разрезали хирургическим скальпелем с прямым краем номер 11 в области, где диаметр хвоста составляет примерно 2,7 мм. Для обеспечения четкого наблюдения за раной, пролитая кровь смывалась теплым физиологическим раствором. Обработанные мыши затем один раз размещались в чистой клетке с подстилкой из белой бумаги на ближайшие 24 ч. Вплоть до 12 ч после повреждения хвоста, у мышей наблюдалось повторное кровотечение хвоста и физическая активность. Умиравшие мыши немедленно подвергались эвтаназии, а окончательное наблюдение проводили через 24 ч после повреждения хвоста. Для имитации ситуации кровотечения у пациентов с гемофилией и обеспечения полного восстановления животного от анестезии, 1 мг/кг раствора атипамезола предоставлялся для отмены эффекта дексмететомидина в начале процедуры рассечения хвостовой вены. С целью ночного обезболивания в конце 12-часового периода наблюдения вводилась дополнительная доза 0,1 мг/кг бупренекса. Кривая выживаемости времени до повторного кровотечения и

времени до эвтаназии генерировалась для анализа данных, а для статистической оценки использовался логранговый (Кокса-Мантеля) критерий.

Пример 11. Приготовление FVIII169/ФВ059 и других конструкторов Клонирование pSYN FVIII 310.

Синтетический ДНК-фрагмент фланкированный сайтом BamH1 на N-конце и сайтом Cla1 на C-конце был коммерчески изготовлен. Эта синтетическая ДНК использовалась для замены региона BamH1 на Cla1 в конструкторе pSYN FVIII 169 (SEQ ID NO: 155). И синтетическая ДНК и ДНК pSYN FVIII 169 были дважды расщеплены с использованием BamH1 и Cla1, расщепленная синтетическая ДНК встраивалась в расщепленный pSYN FVIII 169 для создания pSYN FVIII 310 (SEQ ID NO:168; табл. 20).

Клонирование pSYN FVIII 312.

Синтетический ДНК-фрагмент фланкированный сайтом BamH1 на N-конце и сайтом Afe 1 на C-конце был коммерчески изготовлен. Эта синтетическая ДНК использовалась для замены BamH1 на регион Afe1 в конструкторе pSYN FVIII 169 (SEQ ID NO: 155). И синтетическая ДНК и ДНК pSYN FVIII 169 были дважды расщеплены с использованием BamH1 и Afe1, расщепленная синтетическая ДНК встраивалась в расщепленный pSYN FVIII 169 для создания pSYN FVIII 312 (SEQ ID NO: 169; табл. 20). pSYN FVIII 312A (SEQ ID NO: 2; табл. 20) был создан из pSYN FVIII312 с целью удаления сайта AscI, кодирующего разрыв аминокислотных остатков на стыке FVIII и XTEN.

Таблица 20

Синтетические конструкторы FVIII

Конструктор	Последовательность белка
pSYN FVIII 169	<u>PRFSQNGAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP</u> <u>ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA</u> <u>TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS</u> <u>TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP</u> <u>GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT</u> <u>STEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASSPP</u> VLKRHQAEITR (SEQ ID NO: 167) <i>(Подчеркнуты = остатки XTEN; не подчеркнуты = остатки FVIII)</i>
pSYN FVIII 310	<u>PRSFAGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT</u> <u>GSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES</u> <u>GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE</u> <u>GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS</u> <u>EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE</u> <u>PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASSEITR</u> (SEQ ID NO: 168) <i>(Подчеркнуты = остатки XTEN; не подчеркнуты = остатки FVIII)</i>
pSYN FVIII 312	<u>PRFSQNGAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP</u> <u>ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA</u> <u>TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS</u> <u>TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP</u> <u>GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT</u> <u>STEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASSEI</u>

	TR (SEQ ID NO: 169) <i>(Подчеркнуты = остатки XTEN; не подчеркнуты = остатки FVIII)</i>
pSYN FVIII 312A	<u>PRFSQNGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG</u> <u>SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES</u> <u>GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE</u> <u>GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS</u> <u>EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE</u> <u>PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASSEITR</u> (SEQ ID NO: 2) <i>(подобная последовательность, что и pSYN FVIII 312, удалены только</i> <i>остатки, соответствующие сайту AscI, т.е. разрыву) (Подчеркнуты =</i> <i>остатки XTEN; не подчеркнуты = остатки FVIII)</i>

Клонирование pSYN ФВ059 и ФВ073.

Были созданы различные синтетические фрагменты ДНК, кодирующие различные линкерные регионы между D'D3-XTEN и Fc. Эти синтетические фрагменты ДНК фланкированы сайтом ASC1 на N-конце и сайтом Not1 на C-конце. Эти синтетические ДНК использовались для замены региона Asc1 на Not1 в конструкторе pSYN ФВ057 (SEQ ID NO: 152). Конструктор ФВ059 pSYN (табл. 21) содержит линкерный регион (SEQ ID NO: 13), который включает в себя весь кислый регион 2 (a2) FVIII. Как сообщается, этот сайт расщепляется тромбином и при активации FVIII высвобождается D'D3XTEN. Конструктор ФВ073 pSYN (табл. 21) содержит только сайт расщепления тромбином кислого региона 2 (a2) FVIII (т.е. IEPRFSFS) (SEQ ID NO: 23). И синтетическая ДНК и ДНК pSYN ФВ057 были дважды расщеплены с использованием Asc1 и Not1. Расщепленная синтетическая ДНК встраивалась в расщепленный pSYN ФВ057 для создания pSYN ФВ059 и pSYN ФВ073. Конструктор ФВ59A pSYN (табл. 21) был сформирован из pSYN ФВ059 путем удаления сайта рестрикции EcoRV. Гетеродимерные белки FVIII169/ФВ057 и FVIII169/ФВ059 были созданы путем коэкспрессии FVIII169 и ФВ057 или ФВ059 в клетках HEK293.

Таблица 21

Синтетические конструкторы ФВ - регионы расщепляемого линкера

Конструкт	Последовательность белка
pSYN ФВ057	<u>TS</u>TEEGASS<u>GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSLVPR</u> <u>GSGGDKTH</u> (SEQ ID NO: 12) Выделенная курсивом и подчеркнутая последовательность показывает GS линкер и сайт расщепления тромбином LVPR (также заштрихован).
pSYN ФВ059	TSTEEGASIS<u>DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSF</u><u>SDKTH</u> (SEQ ID NO: 13) Выделенная курсивом и подчеркнутая последовательность показывает 32 а.к. из кислого региона 2 FVIII (a2). Заштрихованная последовательность показывает сайт расщепления тромбином, используемый в pSYN ФВ059A.
pSYN ФВ059A	TSTEEGASS<u>DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSF</u><u>SDKTH</u> (SEQ ID NO: 22) Выделенная курсивом и подчеркнутая последовательность показывает 32 а.к. из кислого региона 2 FVIII (a2). Эта последовательность представляет собой аналогичную последовательность для ФВ059, за исключением того, что остатки соответствующие сайту EcoRV (т.е., IS) удалены.
pSYN ФВ073	TSTEEGASS<u>GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGG</u><u>SIEPRSFSGSG</u> <u>GDKTH</u> (SEQ ID NO: 23) Выделенная курсивом и подчеркнутая последовательность показывает линкер GS с укороченным сайтом расщепления тромбином из кислого региона 2 FVIII (заштрихованные 7 аминокислот-IEPRSFs).

Пример 12. Расщепление гетеродимера FVIII тромбином для анализа высвобождения D'D3 из Fc.

Два гетеродимерных белка FVIII испытывались в экспериментах расщепления тромбином, а также проверялся их уровень расщепления тромбином. Два гетеродимерных конструкта, используемые в данном эксперименте, являлись гетеродимером FVIII169/ФВ057 и гетеродимером FVIII169/ФВ059 вместе с FVIII_{FC}. Гетеродимеры FVIII169/ФВ057 и FVIII169/ФВ059 описаны выше. Проводились три реакции расщепления: i) FVIII_{FC} ii) FVIII169/ФВ057 (фиг. 11), и iii) FVIII 169/ФВ059 (фиг. 12). Образцы для испытаний обрабатывались человеческим а-тромбином при молярном соотношении, если FVIII:тромбин приблизительно 22:1. Каждая реакция инкубировалась в водяной бане при 37°C. В каждый указанный момент времени (t=5, 15, 30, 45, 60 мин), изымался образец 22,5 мкл, останавливался с 22,5 мкл 2×ДСН красителя в невосстанавливающих условиях, и нагревался в течение 3-х мин. Расщепленный белок затем запускался на геле ДСН-ПААГ. Вестерн-блоттинг проводился с использованием антител против тяжелой цепи FVIII (GMA012) и антител против ФВ-D3 (Ат 96340) с использованием системы LICOR.

Как показано на фиг. 11, экспозиция FVIII169/ФВ057 с тромбином приводит к постепенному снижению детектируемого уровня D'D3-XTEN-Fc, коррелирующего с увеличением уровня D'D3-144 XTEN расщепленного продукта. После 15 мин остается нерасщепленный FVIII169/ФВ057. С другой стороны, фиг. 12 показывает, что FVIII 169/ФВ059 быстрее расщепляется тромбином, о чем свидетельствует практически не обнаруживаемый через 5 мин нерасщепленный FVIII 169/ФВ059. Соответственно, FVIII 169/ФВ059, по сравнению с FVIII 169/ФВ057, показывает лучшее высвобождение D'D3 из Fc при активации тромбина.

Для исследования расщепления тромбином проводились параллельные эксперименты с использованием масс-спектропии (МС). С использованием МС, FVIII 169/ФВ059, по сравнению с ФВ057, вновь показал лучшее высвобождение D'D3 из Fc.

Пример 13. In vivo определение FVIII169/ФВ059 в мышцах НемА.

Для дальнейшей оценки фармакокинетического профиля и *in vivo* эффективности FVIII169/ФВ059,

мыши Нема обрабатывались FVIII169/ФВ059 путем внутривенного введения при дозе 150 МЕ/кг. Образцы плазмы собирались с помощью взятия крови полую вены через 5 мин, 24, 48, 72, 96 и 120 ч после инъекции. Активность FVIII в образцах плазмы измерялась с помощью хромогенного анализа FVIII, а параметры ФК рассчитывались с использованием программы Phoenix. Как проиллюстрировано в табл. 22, по сравнению с FVIII169/ФВ057, у FVIII169/ФВ059 наблюдался аналогичный профиль ФК, это означает, что линкер расщепления тромбином а2 не оказывает отрицательного влияния на ФК профиль гетеродимера.

Таблица 22

Профиль ФК FVIII169/ФВ057 и FVIII169/ФВ059 у мышей Нема

Гетеродимер	T _{1/2} (ч)	AUC/D (ч*кг*мМЕ/мл/мМЕ)	CI (мл/ч/кг)	MRT (ч)	Vss (мл/кг)
FVIII169/ФВ057	38,53	0,80	1,26	44,92	56,38
FVIII169/ФВ059	40,51	0,74	1,35	49,22	66,26

Мгновенная эффективность FVIII169/ФВ059 оценивалась на модели хвоста мыши Нема (описана в примере 9), по сравнению с диким типом BDD-FVIII. Мыши Нема обрабатывались 75 МЕ/кг либо FVIII169/ФВ059 либо BDD-FVIII, объем потери крови каждой экспериментальной мыши был отображен на графике на фиг. 13. По сравнению с BDD-FVIII, FVIII169/ФВ059 обеспечивал ту же степень защиты мышей Нема (p=0,9883), что свидетельствует о том, что FVIII169/ФВ059 является полностью функциональным *in vivo*.

Плазмидная конструкция гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc/D'D3-Fc.

Нуклеотидная последовательность ФВ031 (SEQ ID NO: 147).

```

1   ATGAT TCCTG CCAGA TTGCG CGGGG TGCTG CTTGC TCTGG CCCTC ATTTT
51  GCCAG GGACC CTTTG TGCAG AAGGA ACTCG CGGCA GGTCA TCCAC GGCCC
101 GATGC AGCCT TTTTG GAACT GACTT CGTCA ACACC TTTGA TGGGA GCATG
151 TACAG CTTTG CGGGA TACTG CAGTT ACCTC CTGGC AGGGG GCTGC CAGAA
201 ACGCT CCTTC TCGAT TATTG GGGAC TTCCA GAATG GCAAG AGAGT GAGCC
251 TCTCC GTGTA TCTTG GGGAA TTTT TGACA TCCAT TTGTT TGTC AATGGT
301 ACCGT GACAC AGGGG GACCA AAGAG TCTCC ATGCC CTATG CCTCC AAAGG
351 GCTGT ATCTA GAAAC TGAGG CTGGG TACTA CAAGC TGTC GGTGA GGCCT
401 ATGGC TTTGT GGCCA GGATC GATGG CAGCG GCAAC TTTCA AGTCC TGCTG
451 TCAGA CAGAT ACTTC AACAA GACCT GCGGG CTGTG TGGCA ACTTT AACAT
501 CTTTG CTGAA GATGA CTTTA TGACC CAAGA AGGGA CCTTG ACCTC GGACC
551 CTTAT GACTT TGCCA ACTCA TGGGC TCTGA GCAGT GGAGA ACAGT GGTGT
601 GAACG GGCAT CTCCT CCCAG CAGCT CATGC AACAT CTCCT CTGGG GAAAT
651 GCAGA AGGGC CTGTG GGAGC AGTGC CAGCT TCTGA AGAGC ACCTC GGTGT
701 TTGCC CGCTG CCACC CTCTG GTGGA CCCC AGCCT TTTGT GGCCC TGTGT
751 GAGAA GACTT TGTGT GAGTG TGCTG GGGGG CTGGA GTGCG CCTGC CCTGC
801 CCTCC TGGAG TACGC CCGGA CCTGT GCCCA GGAGG GAATG GTGCT GTACG
851 GCTGG ACCGA CCACA GCGCG TGCAG CCCAG TGTGC CCTGC TGGTA TGGAG
901 TATAG GCAGT GTGTG TCCCC TTGCG CCAGG ACCTG CCAGA GCCTG CACAT
951 CAATG AAATG TGTC AAGGC CTCTG CGTGG AGAGC ACCGA GTGTC CCTGC
1001 GACAG CTCCT GGATG AAGGC CTCTG CGTGG AGAGC ACCGA GTGTC CCTGC
1051 GTGCA TTCCG GAAAG CGCTA CCCTC CCGGC ACCTC CCTCT CTCGA GACTG
1101 CAACA CCTGC ATTTG CCGAA ACAGC CAGTG GATCT GCAGC AATGA AGAAT
1151 GTCCA GGGGA GTGCC TTGTC ACTGG TCAAT CCCAC TTCAA GAGCT TTGAC

```

1201 AACAG ATACT TCACC TTCAG TGGGA TCTGC CAGTA CCTGC TGGCC CGGGA
 1251 TTGCC AGGAC CACTC CTTCT CCATT GTCAT TGAGA CTGTC CAGTG TGCTG
 1301 ATGAC CGCGA CGCTG TGTGC ACCCG CTCCG TCACC GTCCG GCTGC CTGGC
 1351 CTGCA CAACA GCCTT GTGAA ACTGA AGCAT GGGGC AGGAG TTGCC ATGGA
 1401 TGGCC AGGAC ATCCA GCTCC CCCTC CTGAA AGGTG ACCTC CGCAT CCAGC
 1451 ATACA GTGAC GGCCT CCGTG CGCCT CAGCT ACGGG GAGGA CCTGC AGATG
 1501 GACTG GGATG GCCGC GGGAG GCTGC TGGTG AAGCT GTCCC CCGTC TATGC
 1551 CGGGA AGACC TGCGG CCTGT GTGGG AATTA CAATG GCAAC CAGGG CGACG
 1601 ACTTC CTTAC CCCCT CTGGG CTGGC GGAGC CCCGG GTGGA GGACT TCGGG
 1651 AACGC CTGGA AGCTG CACGG GGA CTG GACT GCCAG GACCT GCAGA AGCAG CACAG
 1701 CGATC CCTGC GCCCT CAACC CGCGC ATGAC CAGGT TCTCC GAGGA GCGCT
 1751 GCGCG GTCCT GACGT CCCCC ACATT CGAGG CCTGC CATCG TGCCG TCAGC
 1801 CCGCT GCCCT ACCTG CGGAA CTGCC GCTAC GACGT GTGCT CCTGC TCGGA
 1851 CGGCC GCGAG TGCCT GTGCG GCGCC CTGGC CAGCT ATGCC GCGGC CTGCG
 1901 CGGGG AGAGG CGTGC GCGTC GCGTG GCGCG AGCCA GGCCG CTGTG AGCTG
 1951 AACTG CCCGA AAGGC CAGGT GTACC TGCAG TGCGG GACCC CCTGC AACCT
 2001 GACCT GCCGC TCTCT CTCTT ACCCG GATGA GGAAT GCAAT GAGGC CTGCC
 2051 TGGAG GGCTG CTTCT GCCCC CCAGG GCTCT ACATG GATGA GAGGG GGGAC
 2101 TGCGT GCCCA AGGCC CAGTG CCCCT GTTAC TATGA CCGTG AGATC TTCCA
 2151 GCCAG AAGAC ATCTT CTCAG ACCAT CACAC CATGT GCTAC TGTGA GGATG
 2201 GCTTC ATGCA CTGTA CCATG AGTGG AGTCC CCGGA AGCTT GCTGC CTGAC
 2251 GCTGT CCTCA GCAGT CCCCT GTCTC ATCGC AGCAA AAGGA GCCTA TCCTG
 2301 TCGGC CCCCC ATGGT CAAGC TGGTG TGTCC CGCTG ACAAC CTGCG GGCTG
 2351 AAGGG CTCGA GTGTA CCAAA ACGTG CCAGA ACTAT GACCT GGAGT GCATG
 2401 AGCAT GGGCT GTGTC TCTGG CTGCC TCTGC CCCCC GGGCA TGGTC CGGCA
 2451 TGAGA ACAGA TGTGT GGCCC TGGAA AGGTG TCCCT GCTTC CATCA GGGCA
 2501 AGGAG TATGC CCCTG GAGAA ACAGT GAAGA TTGGC TGCAA CACTT GTGTC
 2551 TGTCT GGACC GGAAG TGGAA CTGCA CAGAC CATGT GTGTG ATGCC ACGTG
 2601 CTCCA CGATC GGCAT GGCCC ACTAC CTCAC CTTCT ACGGG CTCAA ATACC
 2651 TGTTC CCCGG GGAGT GCCAG TACGT TCTGG TGCAG GATTA CTGCG GCAGT
 2701 AACCC TGGGA CCTTT CGGAT CCTAG TGGGG AATAA GGGAT GCAGC CACCC
 2751 CTCAG TGAAA TGCAA GAAAC GGGTC ACCAT CCTGG TGGAG GGAGG AGAGA
 2801 TTGAG CTGTT TGACG GGGAG GTGAA TGTGA AGAGG CCCAT GAAGG ATGAG
 2851 ACTCA CTTTG AGGTG GTGGA GTCTG GCCGG TACAT CATTG TGCTG CTGGG
 2901 CAAAG CCCTC TCCGT GGTCT GGGAC CGCCA CCTGA GCATC TCCGT GGTCC
 2951 TGAAG CAGAC ATACC AGGAG AAAGT GTGTG GCCTG TGTGG GAATT TTGAT
 3001 GGCAT CCAGA ACAAT GACCT CACCA GCAGC AACCT CCAAG TGGAG GAAGA
 3051 CCCTG TGGAC TTTGG GAACT CCTGG AAAGT GAGCT CGCAG TGTGC TGACA

3101 CCAGA AAAGT GCCTC TGGAC TCATC CCCTG CCACC TGCCA TAACA ACATC
 3151 ATGAA GCAGA CGATG GTGGA TTCCT CCTGT AGAAT CCTTA CCAGT GACGT
 3201 CTTCC AGGAC TGCAA CAAGC TGGTG GACCC CGAGC CATAT CTGGA TGTCT
 3251 GCATT TACGA CACCT GCTCC TGTGA GTCCA TTGGG GACTG CGCCG CATTG
 3301 TGCGA CACCA TTGCT GCCTA TGCCC ACGTG TGTGC CCAGC ATGGC AAGGT
 3351 GGTGA CCTGG AGGAC GGCCA CATTG TGCCC CCAGA GCTGC GAGGA GAGGA
 3401 ATCTC CGGGA GAACG GGTAT GAGGC TGAGT GGCGC TATAA CAGCT GTGCA
 3451 CCTGC CTGTC AAGTC ACGTG TCAGC ACCCT GAGCC ACTGG CCTGC CCTGT
 3501 GCAGT GTGTG GAGGG CTGCC ATGCC CACTG CCCTC CAGGG AAAAT CCTGG
 3551 ATGAG CTTTT GCAGA CCTGC GTTGA CCCTG AAGAC TGTCC AGTGT GTGAG
 3601 GTGGC TGGCC GGCCT TTTGC CTCAG GAAAG AAAGT CACCT TGAAT CCCAG
 3651 TGACC CTGAG CACTG CCAGA TTTGC CACTG TGATG TTGTC AACCT CACCT
 3701 GTGAA GCCTG CCAGG AGCCG ATATC TGGCG GTGGA GGTTC CGGTG GCGGG
 3751 GGATC CGGCG GTGGA GGTTC CGGCG GTGGA GGTTC CGGTG GCGGG GGATC
 3801 CGGTG GCGGG GGATC CCTGG TCCCC CGGGG CAGCG GCGGT GGAGG TTCCG
 3851 GTGGC GGGGG ATCCG ACAA ACTCA CACAT GCCCA CCGTG CCCAG CTCCA
 3901 GAACT CCTGG GCGGA CCGTC AGTCT TCCTC TTCCC CCAA AACCC AAGGA
 3951 CACCC TCATG ATCTC CCGGA CCCCT GAGGT CACAT GCGTG GTGGT GGACG
 4001 TGAGC CACGA AGACC CTGAG GTCAA GTTCA ACTGG TACGT GGACG GCGTG
 4051 GAGGT GCATA ATGCC AAGAC AAAGC CGCGG GAGGA GCAGT ACAAC AGCAC
 4101 GTACC GTGTG GTCAG CGTCC TCACC GTCCT GCACC AGGAC TGGCT GAATG
 4151 GCAAG GAGTA CAAGT GCAAG GTCTC CAACA AAGCC CTCCC AGCCC CCATC
 4201 GAGAA AACCA TCTCC AAAGC CAAAG GGCAG CCCCAG AGAAC CACAG GTGTA
 4251 CACCC TGCCC CCATC CCGCG ATGAG CTGAC CAAGA ACCAG GTCAG CCTGA
 4301 CCTGC CTGGT CAAAG GCTTC TATCC CAGCG ACATC GCCGT GGAGT GGGAG
 4351 AGCAA TGGGC AGCCG GAGAA CAACT ACAAG ACCAC GCCTC CCGTG TTGGA
 4401 CTCCG ACGGC TCCTT CTCC TCTAC AGCAA GCTCA CCGTG GACAA GAGCA
 4451 GGTGG CAGCA GGGGA ACGTC TTCTC ATGCT CCGTG ATGCA TGAGG CTCTG
 4501 CACAA CCACT ACACG CAGAA GAGCC TCTCC CTGTC TCCGG GTAAA TGA

Последовательность белка ФВ031 (SEQ ID NO: 86).

1 MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFNNTFDGSM
 51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVLSVYLGE FFDIHLFVNG
 101 TVTQGDQRRS MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL
 151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
 201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
 251 ECTLCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWTDHSA CSPVCPAGME
 301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTPCPC

351 VHSGKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD
 401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFIVIVTV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
 451 LHNSLVKLKH GAGVAMDGQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQM
 501 DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
 551 NAWKLHGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
 601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCEL
 651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
 701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFS DHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
 751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
 801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
 851 CRDRKWNCTD HVC DATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ YVLVQDYCGS
 901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTLVE GGEIELFDGE VNVKRPMDKE
 951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
 1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI
 1051 MKQTMVDSSC RILTSDFVQD CNKLVDP EPY LDVCIYDTCS CESIGDCAAF
 1101 CDTIAAYAHV CAQH GKVV TW RTATLCPQSC EERNLRENGY EAEWRYNSCA
 1151 PACQVTCQHP EPLACPVQCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
 1201 VAGR RFASGK KVT LNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGGGGSGGG
 1251 GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSLVPRGSGG GSGGGGSGDK THTCPPCPAP
 1301 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV
 1351 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKALPAPI
 1401 EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
 1451 SNGQPENNYK TTPVLDSDG SFFLYSKLTV DKS R WQGNV FSCSV MHEAL
 1501 HNHYTQKSLS LSPGK*

Нуклеотидная последовательность ФБ034 (SEQ ID NO: 148).

1 ATGAT TCCTG CCAGA TTTGC CGGGG TGCTG CTTGC TCTGG CCCTC ATTTT
 51 GCCAG GGACC CTTTG TGCAG AAGGA ACTCG CGGCA GTTCA TCCAC GGCCC
 101 GATGC AGCCT TTTCG GAAGT GACTT CGTCA ACACC TTTGA TGGGA GCATG
 151 TACAG CTTTG CGGGA TACTG CAGTT ACCTC CTGGC AGGGG GCTGC CAGAA
 201 ACGCT CCTTC TCGAT TATTG GGGAC TTCCA GAATG GCAAG AGAGT GAGCC
 251 TCTCC GTGTA TCTTG GGGAA TTTT TGACA TCCAT TTGTT TGTC AATGGT
 301 ACCGT GACAC AGGGG GACCA AAGAG TCTCC ATGCC CTATG CCTCC AAAGG
 351 GCTGT ATCTA GAAAC TGAGG CTGGG TACTA CAAGC TGTCC GGTGA GGCCT
 401 ATGGC TTTGT GGCCA GGATC GATGG CAGCG GCAAC TTTCA AGTCC TGCTG
 451 TCAGA CAGAT ACTTC AACAA GACCT GCGGG CTGTG TGGCA ACTTT AACAT
 501 CTTTG CTGAA GATGA CTTTA TGACC CAAGA AGGGA CCTTG ACCTC GGACC
 551 CTTAT GACTT TGCCA ACTCA TGGGC TCTGA GCAGT GGAGA ACAGT GGTGT

601 GAACG GGCAT CTCCT CCCAG CAGCT CATGC AACAT CTCCT CTGGG GAAAT
 651 GCAGA AGGGC CTGTG GGAGC AGTGC CAGCT TCTGA AGAGC ACCTC GGTGT
 701 TTGCC CGCTG CCACC CTCTG GTGGA CCCCC AGCCT TTTGT GGCCC TGTGT
 751 GAGAA GACTT TGTGT GAGTG TGCTG GGGGG CTGGA GTGCG CCTGC CCTGC
 801 CCTCC TGGAG TACGC CCGGA CCTGT GCCCA GGAGG GAATG GTGCT GTACG
 851 GCTGG ACCGA CCACA GCGCG TGCAG CCCAG TGTGC CCTGC TGGTA TGGAG
 901 TATAG GCAGT GTGTG TCCCC TTGCG CCAGG ACCTG CCAGA GCCTG CACAT
 951 CAATG AAATG TGTC AAGGC GATGC GTGGA TGGCT GCAGC TGCCC TGAGG
 1001 GACAG CTCCT GGATG AAGGC CTCTG CGTGG AGAGC ACCGA GTGTC CCTGC
 1051 GTGCA TTCCG GAAAG CGCTA CCCTC CCGGC ACCTC CCTCT CTCGA GACTG
 1101 CAACA CCTGC ATTTG CCGAA ACAGC CAGTG GATCT GCAGC AATGA AGAAT
 1151 GTCCA GGGGA GTGCC TTGTC ACTGG TCAAT CCCAC TTCAA GAGCT TTGAC
 1201 AACAG ATACT TCACC TTCAG TGGGA TCTGC CAGTA CCTGC TGGCC CGGGA
 1251 TTGCC AGGAC CACTC CTTCT CCATT GTCAT TGAGA CTGTC CAGTG TGCTG
 1301 ATGAC CGCGA CGCTG TGTGC ACCCG CTCCG TCACC GTCCG GCTGC CTGGC
 1351 CTGCA CAACA GCCTT GTGAA ACTGA AGCAT GGGGC AGGAG TTGCC ATGGA
 1401 TGGCC AGGAC ATCCA GCTCC CCCTC CTGAA AGGTG ACCTC CGCAT CCAGC
 1451 ATACA GTGAC GGCCT CCGTG CGCCT CAGCT ACGGG GAGGA CCTGC AGATG
 1501 GACTG GGATG GCCGC GGGAG GCTGC TGGTG AAGCT GTCCC CCGTC TATGC
 1551 CGGGA AGACC TGCAG CCTGT GTGGG AATTA CAATG GCAAC CAGGG CGACG
 1601 ACTTC CTTAC CCCCT CTGGG CTGGC GGAGC CCCGG GTGGA GGAAT TCGGG
 1651 AACGC CTGGA AGCTG CACGG GGAAT GCCAG GACCT GCAGA AGCAG CACAG
 1701 CGATC CCTGC GCCCT CAACC CGCGC ATGAC CAGGT TCTCC GAGGA GGCGT
 1751 GCGCG GTCCT GACGT CCCCC ACATT CGAGG CCTGC CATCG TGCCG TCAGC
 1801 CCGCT GCCCT ACCTG CGGAA CTGCC GCTAC GACGT GTGCT CCTGC TCGGA
 1851 CGGCC GCGAG TGCCT GTGCG GCGCC CTGGC CAGCT ATGCC GCGGC CTGCG
 1901 CGGGG AGAGG CGTGC GCGTC GCGTG GCGCG AGCCA GGCCG CTGTG AGCTG
 1951 AACTG CCCGA AAGGC CAGGT GTACC TGCAG TGCAG GACCC CCTGC AACCT
 2001 GACCT GCCGC TCTCT CTCTT ACCCG GATGA GGAAT GCAAT GAGGC CTGCC
 2051 TGGAG GGCTG CTTCT GCCCC CCAGG GCTCT ACATG GATGA GAGGG GGGAC
 2101 TGCGT GCCCA AGGCC CAGTG CCCCT GTTAC TATGA CCGTG AGATC TTCCA
 2151 GCCAG AAGAC ATCTT CTCAG ACCAT CACAC CATGT GCTAC TGTGA GGATG
 2201 GCTTC ATGCA CTGTA CCATG AGTGG AGTCC CCGGA AGCTT GCTGC CTGAC
 2251 GCTGT CCTCA GCAGT CCCCT GTCTC ATCGC AGCAA AAGGA GCCTA TCCTG
 2301 TCGGC CCCCC ATGGT CAAGC TGGTG TGTCC CGCTG ACAAC CTGCG GGCTG
 2351 AAGGG CTCGA GTGTA CCAAA ACGTG CCAGA ACTAT GACCT GGAGT GCATG
 2401 AGCAT GGGCT GTGTC TCTGG CTGCC TCTGC CCCCC GGGCA TGGTC CGGCA
 2451 TGAGA ACAGA TGTGT GGCCC TGGAA AGGTG TCCCT GCTTC CATCA GGGCA

2501 AGGAG TATGC CCCTG GAGAA ACAGT GAAGA TTGGC TGCAA CACTT GTGTC
 2551 TGTCTG GGACC GGAAG TGGAA CTGCA CAGAC CATGT GTGTG ATGCC ACGTG
 2601 CTCCA CGATC GGCAT GGCCC ACTAC CTCAC CTTCG ACGGG CTCAA ATACC
 2651 TGTTC CCCGG GGAGT GCCAG TACGT TCTGG TGCAG GATTA CTGCG GCAGT
 2701 AACCC TGGGA CCTTT CGGAT CCTAG TGGGG AATAA GGGAT GCAGC CACCC
 2751 CTCAG TGAAA TGCAA GAAAC GGGTC ACCAT CCTGG TGGAG GGAGG AGAGA
 2801 TTGAG CTGTT TGACG GGGAG GTGAA TGTGA AGAGG CCCAT GAAGG ATGAG
 2851 ACTCA CTTTG AGGTG GTGGA GTCTG GCCGG TACAT CATTC TGCTG CTGGG
 2901 CAAAG CCCTC TCCGT GGTCT GGGAC CGCCA CCTGA GCATC TCCGT GGTCC
 2951 TGAAG CAGAC ATACC AGGAG AAAGT GTGTG GCCTG TGTGG GAATT TTGAT
 3001 GGCAT CCAGA ACAAT GACCT CACCA GCAGC AACCT CCAAG TGGAG GAAGA
 3051 CCCTG TGGAC TTTGG GAACT CCTGG AAAGT GAGCT CGCAG TGTGC TGACA
 3101 CCAGA AAAGT GCCTC TGGAC TCATC CCCTG CCACC TGCCA TAACA ACATC
 3151 ATGAA GCAGA CGATG GTGGA TTCCT CCTGT AGAAT CCTTA CCAGT GACGT
 3201 CTTCC AGGAC TGCAA CAAGC TGGTG GACCC CGAGC CATAT CTGGA TGTCT
 3251 GCATT TACGA CACCT GCTCC TGTGA GTCCA TTGGG GACTG CGCCG CATTC
 3301 TGCGA CACCA TTGCT GCCTA TGCCC ACGTG TGTGC CCAGC ATGGC AAGGT
 3351 GGTGA CCTGG AGGAC GGCCA CATTG TGCCC CCAGA GCTGC GAGGA GAGGA
 3401 ATCTC CGGGA GAACG GGTAT GAGGC TGAGT GGCGC TATAA CAGCT GTGCA
 3451 CCTGC CTGTC AAGTC ACGTG TCAGC ACCCT GAGCC ACTGG CCTGC CCTGT
 3501 GCAGT GTGTG GAGGG CTGCC ATGCC CACTG CCCTC CAGGG AAAAT CCTGG
 3551 ATGAG CTTTT GCAGA CCTGC GTTGA CCCTG AAGAC TGTCC AGTGT GTGAG
 3601 GTGGC TGGCC GCGT TTTGC CTCAG GAAAG AAAGT CACCT TGAAT CCCAG
 3651 TGACC CTGAG CACTG CCAGA TTTGC CACTG TGATG TTGTC AACCT CACCT
 3701 GTGAA GCCTG CCAGG AGCCG ATATC GGGTA CCTCA GAGTC TGCTA CCCCC
 3751 GAGTC AGGGC CAGGA TCAGA GCCAG CCACC TCCGG GTCTG AGACA CCGG
 3801 GACTT CCGAG AGTGC CACCC CTGAG TCCGG ACCCG GGTCC GAGCC CGCCA
 3851 CTTCC GGCTC CGAAA CTCCC GGCAC AAGCG AGAGC GCTAC CCCAG AGTCA
 3901 GGACC AGGAA CATCT ACAGA GCCCT CTGAA GGCTC CGCTC CAGGG TCCCC
 3951 AGCCG GCAGT CCCAC TAGCA CCGAG GAGGG AACCT CTGAA AGCGC CACAC
 4001 CCGAA TCAGG GCCAG GGTCT GAGCC TGCTA CCAGC GGCAG CGAGA CACCA
 4051 GGCAC CTCTG AGTCC GCCAC ACCAG AGTCC GGACC CGGAT CTCCC GCTGG
 4101 GAGCC CCACC TCCAC TGAGG AGGGA TCTCC TGCTG GCTCT CCAAC ATCTA
 4151 CTGAG GAAGG TACCT CAACC GAGCC ATCCG AGGGA TCAGC TCCCG GCACC
 4201 TCAGA GTCGG CAACC CCGGA GTCTG GACCC GGAAC TTCCG AAAGT GCCAC
 4251 ACCAG AGTCC GGTCC CGGGA CTTCA GAATC AGCAA CACCC GAGTC CGGCC
 4301 CTGGG TCTGA ACCCG CCACA AGTGG TAGTG AGACA CCAGG ATCAG AACCT
 4351 GCTAC CTCAG GGTCA GAGAC ACCCG GATCT CCGGC AGGCT CACCA ACCTC

4401 CACTG AGGAG GGCAC CAGCA CAGAA CCAAG CGAGG GCTCC GCACC CGGAA
 4451 CAAGC ACTGA ACCCA GTGAG GGTTC AGCAC CCGGC TCTGA GCCGG CCACA
 4501 AGTGG CAGTG AGACA CCCGG CACTT CAGAG AGTGC CACCC CCGAG AGTGG
 4551 CCCAG GCACT AGTAC CGAGC CCTCT GAAGG CAGTG CGCCA GATTC TGGCG
 4601 GTGGA GGTTC CGGTG GCGGG GGATC CGGTG GCGGG GGATC CGGTG GCGGG
 4651 GGATC CGGTG GCGGG GGATC CCTGG TCCCC CGGGG CAGCG GAGGC GACAA
 4701 AACTC ACACA TGCCC ACCGT GCCCA GCTCC AGAAC TCCTG GGCGG ACCGT
 4751 CAGTC TTCCT CTTC CCCCC AAACC CAAGG ACACC CTCAT GATCT CCCGG
 4801 ACCCC TGAGG TCACA TCGGT GGTGG TGGAC GTGAG CCACG AAGAC CCTGA
 4851 GGTCA AGTTC AACTG GTACG TGGAC GCGGT GGAGG TGCAT AATGC CAAGA
 4901 CAAAG CCGCG GGAGG AGCAG TACAA CAGCA CGTAC CGTGT GGTCA GCGTC
 4951 CTCAC CGTCC TGCAC CAGGA CTGGC TGAAT GGCAA GGAGT ACAAG TGCAA
 5001 GGTCT CCAAC AAAGC CCTCC CAGCC CCCAT CGAGA AAACC ATCTC CAAAG
 5051 CCAAA GGGCA GCCCC GAGAA CCACA GGTGT ACACC CTGCC CCCAT CCCGG
 5101 GATGA GCTGA CCAAG AACCA GGTCA GCCTG ACCTG CCTGG TCAAA GGCTT
 5151 CTATC CCAGC GACAT CGCCG TGGAG TGGGA GAGCA ATGGG CAGCC GGAGA
 5201 ACAAC TACAA GACCA CGCCT CCCGT GTTGG ACTCC GACGG CTCCT TCTTC
 5251 CTCTA CAGCA AGCTC ACCGT GGACA AGAGC AGGTG GCAGC AGGGG AACGT
 5301 CTTCT CATGC TCCGT GATGC ATGAG GCTCT GCACA ACCAC TACAC GCAGA
 5351 AGAGC CTCTC CCTGT CTCCG GGTAAT ATGA
 Последовательность белка ФВ034 (SEQ ID NO: 87).
 1 MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFNVTDFGSM
 51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
 101 TVTQGDQRVS MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL
 151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
 201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
 251 EKTLCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDHSA CSPVCPAGME
 301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTTEPC
 351 VHSGKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD
 401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIETV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
 451 LHNSLVKLKH GAGVAMDGQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQM
 501 DWDGRGRLLV KLSPLYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
 551 NAWKLHGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
 601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCEL
 651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCT SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD

701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
 751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
 801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
 851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ YVLVQDYCGS
 901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTLVE GGEIELFDGE VNVKRPMKDE
 951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
 1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI
 1051 MKQTMVDSSC RILTSDVFQD CNKLVDPPEY LDVCIYDTCS CESIGDCAAF
 1101 CDTIAAYAHV CAQHGVVVTW RTATLCPQSC EERNLRENGY EAEWRYNSCA
 1151 PACQVTCQHP EPLACPVQCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
 1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGTSESATP
 1251 ESGPGSEPAT SGSETPGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP GTSESATPES
 1301 GPGTSTEPSE GSAPGSPAGS PTSTEEGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP
 1351 GTSESATPES GPGSPAGSPT STEEGSPAGS PTSTEEGTST EPSEGSAPGT
 1401 SESATPESGP GTSESATPES GPGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPGSEP
 1451 ATSGSETPGS PAGSPTSTEE GTSTEPSEGS APGTSTEPSE GSAPGSEPAT
 1501 SGSETPGTSE SATPESGPGT STEPSEGSAP DIGGGGGSGG GGS LVPRGSG
 1551 GDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
 1601 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
 1651 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV
 1701 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
 1751 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*

Нуклеотидная последовательность ФБ050 (тройной мутант IHH) (SEQ ID NO: 149).

1 ATGAT TCCTG CCAGA TTTGC CGGGG TGCTG CTTGC TCTGG CCCTC ATTTT
 51 GCCAG GGACC CTTTG TGCAG AAGGA ACTCG CGGCA GTTCA TCCAC GGCCC
 101 GATGC AGCCT TTTCG GAAGT GACTT CGTCA ACACC TTTGA TGGGA GCATG
 151 TACAG CTTTG CGGGA TACTG CAGTT ACCTC CTGGC AGGGG GCTGC CAGAA
 201 ACGCT CCTTC TCGAT TATTG GGGAC TTCCA GAATG GCAAG AGAGT GAGCC
 251 TCTCC GTGTA TCTTG GGGAA TTTT TGACA TCCAT TTGTT TGTCA ATGGT
 301 ACCGT GACAC AGGGG GACCA AAGAG TCTCC ATGCC CTATG CCTCC AAAGG
 351 GCTGT ATCTA GAAAC TGAGG CTGGG TACTA CAAGC TGTCC GGTGA GGCCT
 401 ATGGC TTTGT GGCCA GGATC GATGG CAGCG GCAAC TTTCA AGTCC TGCTG
 451 TCAGA CAGAT ACTTC AACAA GACCT GCGGG CTGTG TGGCA ACTTT AACAT
 501 CTTTG CTGAA GATGA CTTTA TGACC CAAGA AGGGA CCTTG ACCTC GGACC
 551 CTTAT GACTT TGCCA ACTCA TGGGC TCTGA GCAGT GGAGA ACAGT GGTGT
 601 GAACG GGCAT CTCCT CCCAG CAGCT CATGC AACAT CTCCT CTGGG GAAAT

651 GCAGA AGGGC CTGTG GGAGC AGTGC CAGCT TCTGA AGAGC ACCTC GGTGT
 701 TTGCC CGCTG CCACC CTCTG GTGGA CCCCAG AGCCT TTTGT GGCCC TGTGT
 751 GAGAA GACTT TGTGT GAGTG TGCTG GGGGG CTGGA GTGCG CCTGC CCTGC
 801 CCTCC TGGAG TACGC CCGGA CCTGT GCCCA GGAGG GAATG GTGCT GTACG
 851 GCTGG ACCGA CCACA GCGCG TGCAG CCCAG TGTGC CCTGC TGGTA TGGAG
 901 TATAG GCAGT GTGTG TCCCC TTGCG CCAGG ACCTG CCAGA GCCTG CACAT
 951 CAATG AAATG TGTCA GGAGC GATGC GTGGA TGGCT GCAGC TGCCC TGAGG
 1001 GACAG CTCCT GGATG AAGGC CTCTG CGTGG AGAGC ACCGA GTGTC CCTGC
 1051 GTGCA TTCCG GAAAG CGCTA CCCTC CCGGC ACCTC CCTCT CTCGA GACTG
 1101 CAACA CCTGC ATTTG CCGAA ACAGC CAGTG GATCT GCAGC AATGA AGAAT
 1151 GTCCA GGGGA GTGCC TTGTC ACTGG TCAAT CCCAC TTCAA GAGCT TTGAC
 1201 AACAG ATACT TCACC TTCAG TGGGA TCTGC CAGTA CCTGC TGGCC CGGGA
 1251 TTGCC AGGAC CACTC CTTCT CCATT GTCAT TGAGA CTGTC CAGTG TGCTG
 1301 ATGAC CGCGA CGCTG TGTGC ACCCG CTCCG TCACC GTCCG GCTGC CTGGC
 1351 CTGCA CAACA GCCTT GTGAA ACTGA AGCAT GGGGC AGGAG TTGCC ATGGA
 1401 TGGCC AGGAC ATCCA GCTCC CCCTC CTGAA AGGTG ACCTC CGCAT CCAGC
 1451 ATACA GTGAC GGCCT CCGTG CGCCT CAGCT ACGGG GAGGA CCTGC AGATG
 1501 GACTG GGATG GCCGC GGGAG GCTGC TGGTG AAGCT GTCCC CCGTC TATGC
 1551 CGGGA AGACC TGCAG CCTGT GTGGG AATTA CAATG GCAAC CAGGG CGACG
 1601 ACTTC CTTAC CCCCT CTGGG CTGGC GGAGC CCCGG GTGGA GGACT TCGGG
 1651 AACGC CTGGA AGCTG CACGG GGAAT GCCAG GACCT GCAGA AGCAG CACAG
 1701 CGATC CCTGC GCCCT CAACC CGCGC ATGAC CAGGT TCTCC GAGGA GCGCT
 1751 GCGCG GTCCT GACGT CCCCC ACATT CGAGG CCTGC CATCG TGCCG TCAGC
 1801 CCGCT GCCCT ACCTG CGGAA CTGCC GCTAC GACGT GTGCT CCTGC TCGGA
 1851 CGGCC GCGAG TGCCT GTGCG GCGCC CTGGC CAGCT ATGCC GCGGC CTGCG
 1901 CGGGG AGAGG CGTGC GCGTC GCGTG GCGCG AGCCA GGCCG CTGTG AGCTG
 1951 AACTG CCCGA AAGGC CAGGT GTACC TGCAG TGCAG GACCC CCTGC AACCT
 2001 GACCT GCCGC TCTCT CTCTT ACCCG GATGA GGAAT GCAAT GAGGC CTGCC
 2051 TGGAG GGCTG CTTCT GCGCC CCAGG GCTCT ACATG GATGA GAGGG GGGAC
 2101 TGCGT GCCCA AGGCC CAGTG CCCCT GTTAC TATGA CCGTG AGATC TTCCA
 2151 GCCAG AAGAC ATCTT CTCAG ACCAT CACAC CATGT GCTAC TGTGA GGATG
 2201 GCTTC ATGCA CTGTA CCATG AGTGG AGTCC CCGGA AGCTT GCTGC CTGAC
 2251 GCTGT CCTCA GCAGT CCCCT GTCTC ATCGC AGCAA AAGGA GCCTA TCCTG
 2301 TCGGC CCCCC ATGGT CAAGC TGGTG TGTCC CGCTG ACAAC CTGCG GGCTG
 2351 AAGGG CTCGA GTGTA CCAAA ACGTG CCAGA ACTAT GACCT GGAGT GCATG
 2401 AGCAT GGGCT GTGTC TCTGG CTGCC TCTGC CCCCC GGGCA TGGTC CGGCA
 2451 TGAGA ACAGA TGTGT GGCCC TGGAA AGGTG TCCCT GCTTC CATCA GGGCA
 2501 AGGAG TATGC CCCTG GAGAA ACAGT GAAGA TTGGC TGCAA CACTT GTGTC

2551 TGTCG GGACC GGAAG TGGAA CTGCA CAGAC CATGT GTGTG ATGCC ACGTG
 2601 CTCCA CGATC GGCAT GGCCC ACTAC CTCAC CTTCG ACGGG CTCAA ATACC
 2651 TGTTC CCCGG GGAGT GCCAG TACGT TCTGG TGCAG GATTA CTGCG GCAGT
 2701 AACCC TGGGA CCTTT CGGAT CCTAG TGGGG AATAA GGGAT GCAGC CACCC
 2751 CTCAG TGAAA TGCAA GAAAC GGGTC ACCAT CCTGG TGGAG GGAGG AGAGA
 2801 TTGAG CTGTT TGACG GGGAG GTGAA TGTGA AGAGG CCCAT GAAGG ATGAG
 2851 ACTCA CTTTG AGGTG GTGGA GTCTG GCCGG TACAT CATTG TGCTG CTGGG
 2901 CAAAG CCCTC TCCGT GGTCT GGGAC CGCCA CCTGA GCATC TCCGT GGTCC
 2951 TGAAG CAGAC ATACC AGGAG AAAGT GTGTG GCCTG TGTGG GAATT TTGAT
 3001 GGCAT CCAGA ACAAT GACCT CACCA GCAGC AACCT CCAAG TGGAG GAAGA
 3051 CCCTG TGGAC TTTGG GAACT CCTGG AAAGT GAGCT CGCAG TGTGC TGACA
 3101 CCAGA AAAGT GCCTC TGGAC TCATC CCCTG CCACC TGCCA TAACA ACATC
 3151 ATGAA GCAGA CGATG GTGGA TTCCT CCTGT AGAAT CCTTA CCAGT GACGT
 3201 CTTCC AGGAC TGCAA CAAGC TGGTG GACCC CGAGC CATAT CTGGA TGTCT
 3251 GCATT TACGA CACCT GCTCC TGTGA GTCCA TTGGG GACTG CGCCG CATTG
 3301 TGCGA CACCA TTGCT GCCTA TGCCC ACGTG TGTGC CCAGC ATGGC AAGGT
 3351 GGTGA CCTGG AGGAC GGCCA CATTG TGCCC CCAGA GCTGC GAGGA GAGGA
 3401 ATCTC CGGGA GAACG GGTAT GAGGC TGAGT GGCGC TATAA CAGCT GTGCA
 3451 CCTGC CTGTC AAGTC ACGTG TCAGC ACCCT GAGCC ACTGG CCTGC CCTGT
 3501 GCAGT GTGTG GAGGG CTGCC ATGCC CACTG CCCTC CAGGG AAAAT CCTGG
 3551 ATGAG CTTTT GCAGA CCTGC GTTGA CCCTG AAGAC TGTCC AGTGT GTGAG
 3601 GTGGC TGGCC GCGGT TTTGC CTCAG GAAAG AAAGT CACCT TGAAT CCCAG
 3651 TGACC CTGAG CACTG CCAGA TTTGC CACTG TGATG TTGTC AACCT CACCT
 3701 GTGAA GCCTG CCAGG AGCCG ATATC TGGCG GTGGA GGTTC CGGTG GCGGG
 3751 GGATC CGGCG GTGGA GGTTC CGGCG GTGGA GGTTC CGGTG GCGGG GGATC
 3801 CGGTG GCGGG GGATC CCTGG TCCCC CGGGG CAGCG GCGGT GGAGG TTCCG
 3851 GTGGC GGGGG ATCCG ACAAA ACTCA CACAT GCCCA CCGTG CCCAG CTCCA
 3901 GAACT CCTGG GCGGA CCGTC AGTCT TCCTC TTCCC CCAA AACCC AAGGA
 3951 CACCC TCATG GCCTC CCGGA CCCCT GAGGT CACAT GCGTG GTGGT GGACG
 4001 TGAGC CACGA AGACC CTGAG GTCAA GTTCA ACTGG TACGT GGACG GCGTG
 4051 GAGGT GCATA ATGCC AAGAC AAAGC CGCGG GAGGA GCAGT ACAAC AGCAC
 4101 GTACC GTGTG GTCAG CGTCC TCACC GTCCT GGCCC AGGAC TGGCT GAATG
 4151 GCAAG GAGTA CAAGT GCAAG GTCTC CAACA AAGCC CTCCC AGCCC CCATC
 4201 GAGAA AACCA TCTCC AAAGC CAAAG GGCAG CCCCC AGAAC CACAG GTGTA
 4251 CACCC TGCCC CCATC CCGCG ATGAG CTGAC CAAGA ACCAG GTCAG CCTGA
 4301 CCTGC CTGGT CAAAG GCTTC TATCC CAGCG ACATC GCCGT GGAGT GGGAG
 4351 AGCAA TGGGC AGCCG GAGAA CAACT ACAAG ACCAC GCCTC CCGTG TTGGA
 4401 CTCCG ACGGC TCCTT CTTCC TCTAC AGCAA GCTCA CCGTG GACAA GAGCA
 4451 GGTGG CAGCA GGGGA ACGTC TTCTC ATGCT CCGTG ATGCA TGAGG CTCTG
 4501 CACAA CGCCT ACACG CAGAA GAGCC TCTCC CTGTC TCCGG GTAAA TGA

Последовательность белка ФВ050 (тройной мутант IHH) (SEQ ID NO: 150).

```

1  MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFNVTFDGSM
51  YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
101 TVTQGDQRRS MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL
151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
251 EKTLCCEAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDHSA CSPVCPAGME
301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLEDEG LCVESTTEPC
351 VHS GKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD
401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIETV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
451 LHNSLVKLLH GAGVAMDQGD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQM
501 DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
551 NAWKLHGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCEL
651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFS DHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVC PADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ YVLVQDYCGS
901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTLVE GGEIELFDGE VNVKRPMKDE
951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI
1051 MKQTMVDSSC RILTSDVFQD CNKLVDPEPY LDVCIYDTCS CESIGDCAAF
1101 CDTIAAYAHV CAQH GKVV TW RTATLCPQSC EERNLRENGY EAEWRYNSCA
1151 PACQVTCQHP EPLACPVQCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGGGGSGGG
1251 GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSLVPRGSGG GSGGGGSGDK THTCPPCPAP
1301 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ASRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV
1351 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLAQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI
1401 EKTISKAKGQ PREPQVYTL PPSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
1451 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKS R WQQGNV FCSVMHEAL
1501 HNAYTQKSLS LSPGK*

```

Нуклеотидная последовательность ФВ057 (SEQ ID NO: 151).

```

1      ATGAT TCCTG CCAGA TTTGC CGGGG TGCTG CTTGC TCTGG CCCTC ATTTT
51     GCCAG GGACC CTTTG TGCAG AAGGA ACTCG CGGCA GGTCA TCCAC GGCCC
101    GATGC AGCCT TTTCG GAAGT GACTT CGTCA ACACC TTTGA TGGGA GCATG
151    TACAG CTTTG CGGGA TACTG CAGTT ACCTC CTGGC AGGGG GCTGC CAGAA
201    ACGCT CCTTC TCGAT TATTG GGGAC TTCCA GAATG GCAAG AGAGT GAGCC
251    TCTCC GTGTA TCTTG GGGAA TTTT  TGACA TCCAT TTGTT TGTC  ATGGT
301    ACCGT GACAC AGGGG GACCA AAGAG TCTCC ATGCC CTATG CCTCC AAAGG
351    GCTGT ATCTA GAAAC TGAGG CTGGG TACTA CAAGC TGTCC GGTGA GGCCT
401    ATGGC TTTGT GGCCA GGATC GATGG CAGCG GCAAC TTTCA AGTCC TGCTG
451    TCAGA CAGAT ACTTC AACAA GACCT GCGGG CTGTG TGGCA ACTTT AACAT
501    CTTTG CTGAA GATGA CTTTA TGACC CAAGA AGGGA CCTTG ACCTC GGACC
551    CTTAT GACTT TGCCA ACTCA TGGGC TCTGA GCAGT GGAGA ACAGT GGTGT
601    GAACG GGCAT CTCCT CCCAG CAGCT CATGC AACAT CTCCT CTGGG GAAAT
651    GCAGA AGGGC CTGTG GGAGC AGTGC CAGCT TCTGA AGAGC ACCTC GGTGT
701    TTGCC CGCTG CCACC CTCTG GTGGA CCCC  AGCCT TTTGT GGCCC TGTGT
751    GAGAA GACTT TGTGT GAGTG TGCTG GGGGG CTGGA GTGCG CCTGC CCTGC
801    CCTCC TGGAG TACGC CCGGA CCTGT GCCCA GGAGG GAATG GTGCT GTACG
851    GCTGG ACCGA CCACA GCGCG TGCAG CCCAG TGTGC CCTGC TGGTA TGGAG
901    TATAG GCAGT GTGTG TCCCC TTGCG CCAGG ACCTG CCAGA GCCTG CACAT
951    CAATG AAATG TGTCA GGAGC GATGC GTGGA TGGCT GCAGC TGCCC TGAGG
1001   GACAG CTCCT GGATG AAGGC CTCTG CGTGG AGAGC ACCGA GTGTC CCTGC
1051   GTGCA TTCCG GAAAG CGCTA CCCTC CCGGC ACCTC CCTCT CTCGA GACTG
1101   CAACA CCTGC ATTTG CCGAA ACAGC CAGTG GATCT GCAGC AATGA AGAAT
1151   GTCCA GGGGA GTGCC TTGTC ACTGG TCAAT CCCAC TTCAA GAGCT TTGAC
1201   AACAG ATACT TCACC TTCAG TGGGA TCTGC CAGTA CCTGC TGGCC CGGGA
1251   TTGCC AGGAC CACTC CTTCT CCATT GTCAT TGAGA CTGTC CAGTG TGCTG
1301   ATGAC CGCGA CGCTG TGTGC ACCCG CTCCG TCACC GTCCG GCTGC CTGGC
1351   CTGCA CAACA GCCTT GTGAA ACTGA AGCAT GGGGC AGGAG TTGCC ATGGA
1401   TGGCC AGGAC ATCCA GCTCC CCCTC CTGAA AGGTG ACCTC CGCAT CCAGC
1451   ATACA GTGAC GGCCT CCGTG CGCCT CAGCT ACGGG GAGGA CCTGC AGATG
1501   GACTG GGATG GCCGC GGGAG GCTGC TGGTG AAGCT GTCCC CCGTC TATGC
1551   CGGGA AGACC TGCGG CCTGT GTGGG AATTA CAATG GCAAC CAGGG CGACG
1601   ACTTC CTTAC CCCCT CTGGG CTGGC GGAGC CCCGG GTGGA GGA  TCGGG
1651   AACGC CTGGA AGCTG CACGG GGA  GGCAG GACCT GCAGA AGCAG CACAG
1701   CGATC CCTGC GCCCT CAACC CGCGC ATGAC CAGGT TCTCC GAGGA GCGGT
1751   GCGCG GTCCT GACGT CCCCC ACATT CGAGG CCTGC CATCG TGCCG TCAGC
1801   CCGCT GCCCT ACCTG CGGAA CTGCC GCTAC GACGT GTGCT CCTGC TCGGA

```

1851 CGGCC GCGAG TGCCT GTGCG GCGCC CTGGC CAGCT ATGCC GCGGC CTGCG
 1901 CGGGG AGAGG CGTGC GCGTC GCGTG GCGCG AGCCA GGCCG CTGTG AGCTG
 1951 AACTG CCCGA AAGGC CAGGT GTACC TGCAG TCGCG GACCC CCTGC AACCT
 2001 GACCT GCCGC TCTCT CTCTT ACCCG GATGA GGAAT GCAAT GAGGC CTGCC
 2051 TGGAG GGCTG CTTCT GCCCC CCAGG GCTCT ACATG GATGA GAGGG GGGAC
 2101 TCGGT GCCCA AGGCC CAGTG CCCCT GTTAC TATGA CGGTG AGATC TTCCA
 2151 GCCAG AAGAC ATCTT CTCAG ACCAT CACAC CATGT GCTAC TGTGA GGATG
 2201 GCTTC ATGCA CTGTA CCATG AGTGG AGTCC CCGGA AGCTT GCTGC CTGAC
 2251 GCTGT CCTCA GCAGT CCCCT GTCTC ATCGC AGCAA AAGGA GCCTA TCCTG
 2301 TCGGC CCCCC ATGGT CAAGC TGGTG TGTCC CGCTG ACAAC CTGCG GGCTG
 2351 AAGGG CTCGA GTGTA CAAA ACGTG CCAGA ACTAT GACCT GGAGT GCATG
 2401 AGCAT GGGCT GTGTC TCTGG CTGCC TCTGC CCCCC GGGCA TGGTC CGGCA
 2451 TGAGA ACAGA TGTGT GGCCG TGGAA AGGTG TCCCT GCTTC CATCA GGGCA
 2501 AGGAG TATGC CCCTG GAGAA ACAGT GAAGA TTGGC TGCAA CACTT GTGTC
 2551 TGTCG GGACC GGAAG TGGAA CTGCA CAGAC CATGT GTGTG ATGCC ACGTG
 2601 CTCCA CGATC GGCAT GGCCG ACTAC CTCAC CTTCG ACGGG CTCAA ATACC
 2651 TGTTC CCCGG GGAGT GCCAG TACGT TCTGG TGCAG GATTA CTGCG GCAGT
 2701 AACCC TGGGA CCTTT CGGAT CCTAG TGGGG AATAA GGGAT GCAGC CACCC
 2751 CTCAG TGAAA TGCAA GAAAC GGGTC ACCAT CCTGG TGGAG GGAGG AGAGA
 2801 TTGAG CTGTT TGACG GGGAG GTGAA TGTGA AGAGG CCCAT GAAGG ATGAG
 2851 ACTCA CTTTG AGGTG GTGGA GTCTG GCCGG TACAT CATTG TGCTG CTGGG
 2901 CAAAG CCCTC TCCGT GGTCT GGGAC CGCCA CCTGA GCATC TCCGT GGTCC
 2951 TGAAG CAGAC ATACC AGGAG AAAGT GTGTG GCCTG TGTGG GAATT TTGAT
 3001 GGCAT CCAGA ACAAT GACCT CACCA GCAGC AACCT CCAAG TGGAG GAAGA
 3051 CCCTG TGGAC TTTGG GAACT CCTGG AAAGT GAGCT CGCAG TGTGC TGACA
 3101 CCAGA AAAGT GCCTC TGGAC TCATC CCCTG CCACC TGCCA TAACA ACATC
 3151 ATGAA GCAGA CGATG GTGGA TTCCT CCTGT AGAAT CCTTA CCAGT GACGT
 3201 CTTCC AGGAC TGCAA CAAGC TGGTG GACCC CGAGC CATAT CTGGA TGTCT
 3251 GCATT TACGA CACCT GCTCC TGTGA GTCCA TTGGG GACTG CGCCG CATTG
 3301 TGCGA CACCA TTGCT GCCTA TGCCC ACGTG TGTGC CCAGC ATGGC AAGGT
 3351 GGTGA CCTGG AGGAC GGCCA CATTG TGCCC CCAGA GCTGC GAGGA GAGGA
 3401 ATCTC CGGGA GAACG GGTAT GAGGC TGAGT GGCGC TATAA CAGCT GTGCA
 3451 CCTGC CTGTC AAGTC ACGTG TCAGC ACCCT GAGCC ACTGG CCTGC CCTGT
 3501 GCAGT GTGTG GAGGG CTGCC ATGCC CACTG CCCTC CAGGG AAAAT CCTGG
 3551 ATGAG CTTTT GCAGA CCTGC GTTGA CCCTG AAGAC TGTCC AGTGT GTGAG
 3601 GTGGC TGGCC GGCGT TTTGC CTCAG GAAAG AAAGT CACCT TGAAT CCCAG
 3651 TGACC CTGAG CACTG CCAGA TTTGC CACTG TGATG TTGTC AACCT CACCT
 3701 GTGAA GCCTG CCAGG AGCCG ATATC GGGCG CGCCA ACATC AGAGA GCGCC

3751 ACCCC TGAAA GTGGT CCCGG GAGCG AGCCA GCCAC ATCTG GGTCG GAAAC
 3801 GCCAG GCACA AGTGA GTCTG CAACT CCCGA GTCCG GACCT GGCTC CGAGC
 3851 CTGCC ACTAG CGGCT CCGAG ACTCC GGGAA CTTCC GAGAG CGCTA CACCA
 3901 GAAAG CGGAC CCGGA ACCAG TACCG AACCT AGCGA GGGCT CTGCT CCGGG
 3951 CAGCC CAGCC GGCTC TCCTA CATCC ACGGA GGAGG GCACT TCCGA ATCCG
 4001 CCACC CCGGA GTCAG GGCCA GGATC TGAAC CCGCT ACCTC AGGCA GTGAG
 4051 ACGCC AGGAA CGAGC GAGTC CGCTA CACCG GAGAG TGGGC CAGGG AGCCC
 4101 TGCTG GATCT CCTAC GTCCA CTGAG GAAGG GTCAC CAGCG GGCTC GCCCA
 4151 CCAGC ACTGA AGAAG GTGCC TCGAG CGGCG GTGGA GGTTC CGGTG GCGGG
 4201 GGATC CGGTG GCGGG GGATC CGGTG GCGGG GGATC CGGTG GCGGG GGATC
 4251 CCTGG TCCCC CGGGG CAGCG GAGGC GACAA AACTC ACACA TGCCC ACCGT
 4301 GCCCA GCTCC AGAAC TCCTG GGCGG ACCGT CAGTC TTCCT CTTCC CCCCA
 4351 AAACC CAAGG ACACC CTCAT GATCT CCCGG ACCCC TGAGG TCACA TGCGT
 4401 GGTGG TGGAC GTGAG CCACG AAGAC CCTGA GGTCA AGTTC AACTG GTACG
 4451 TGGAC GCGGT GGAGG TGCAT AATGC CAAGA CAAAG CCGCG GGAGG AGCAG
 4501 TACAA CAGCA CGTAC CGTGT GGTCA GCGTC CTCAC CGTCC TGCAC CAGGA
 4551 CTGGC TGAAT GGCAA GGAGT ACAAG TGCAA GGTCT CCAAC AAAGC CCTCC
 4601 CAGCC CCCAT CGAGA AAACC ATCTC CAAAG CAAA GGGCA GCCCC GAGAA
 4651 CCACA GGTGT ACACC CTGCC CCCAT CCCGG GATGA GCTGA CCAAG AACCA
 4701 GGTCA GCCTG ACCTG CCTGG TCAAA GGCTT CTATC CCAGC GACAT CGCCG
 4751 TGGAG TGGGA GAGCA ATGGG CAGCC GGAGA ACAAC TACAA GACCA CGCCT
 4801 CCCGT GTTGG ACTCC GACGG CTCCT TCTTC CTCTA CAGCA AGCTC ACCGT
 4851 GGACA AGAGC AGGTG GCAGC AGGGG AACGT CTTCT CATGC TCCGT GATGC
 4901 ATGAG GCTCT GCACA ACCAC TACAC GCAGA AGAGC CTCTC CCTGT CTCCG
 4951 GGTAAT ATGA

Последовательность белка ФВ057 (SEQ ID NO: 152).

1 MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFVNTFDGSM
 51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
 101 TVTQGDQRRV MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL
 151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
 201 ERASPPSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
 251 ECTLCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDHSA CSPVCPAGME
 301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTECPC
 351 VHSGKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD
 401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIETV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
 451 LHNSLVKLKH GAGVAMDGQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQM

501 DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
 551 NAWKLHGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
 601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCCL
 651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
 701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
 751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
 801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
 851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ YVLVQDYCGS
 901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTLVE GGEIELFDGE VNVKRPMDKE
 951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
 1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI
 1051 MKQTMVDSSC RILTSDVFQD CNKLVDPPEY LDVCIYDTCS CESIGDCAAF
 1101 CDTIAAYAHV CAQHKGKVTW RTATLCPQSC EERNLRENGY EAEWRYNSCA
 1151 PACQVTCQHP EPLACPVCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
 1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGAPTESA
 1251 TPESGPGSEP ATSGSETPGT SESATPESGP GSEPATSGSE TPGTSESATP
 1301 ESGPGTSTEP SEGSA PGSPA GSPTSTEEGT SESATPESGP GSEPATSGSE
 1351 TPGTSESATP ESGPGSPAGS PTSTEEGSPA GSPTSTEEGA SSGGGGSGGG
 1401 GSGGGGSGGG GSGGGGSLVP RSGGGDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFP
 1451 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
 1501 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
 1551 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP
 1601 PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP
 1651 GK*

Нуклеотидная последовательность ФВ058 (ФВ034 с мутацией IHH)(SEQ ID NO: 153).

1 ATGAT TCCTG CCAGA TTTGC CGGGG TGCTG CTTGC TCTGG CCCTC ATTTT
 51 GCCAG GGACC CTTTG TGCAG AAGGA ACTCG CGGCA GGTC A TCCAC GGCCC
 101 GATGC AGCCT TTTCG GAAGT GACTT CGTCA ACACC TTTGA TGGGA GCATG
 151 TACAG CTTTG CGGGA TACTG CAGTT ACCTC CTGGC AGGGG GCTGC CAGAA
 201 ACGCT CCTTC TCGAT TATTG GGGAC TTCCA GAATG GCAAG AGAGT GAGCC
 251 TCTCC GTGTA TCTTG GGGAA TTTTT TGACA TCCAT TTGTT TGTCA ATGGT
 301 ACCGT GACAC AGGGG GACCA AAGAG TCTCC ATGCC CTATG CCTCC AAAGG
 351 GCTGT ATCTA GAAAC TGAGG CTGGG TACTA CAAGC TGTCC GGTGA GGCCT
 401 ATGGC TTTGT GGCCA GGATC GATGG CAGCG GCAAC TTTCA AGTCC TGCTG
 451 TCAGA CAGAT ACTTC AACA GACCT GCGGG CTGTG TGGCA ACTTT AACAT
 501 CTTTG CTGAA GATGA CTTA TGACC CAAGA AGGGA CCTTG ACCTC GGACC

551 CTTAT GACTT TGCCA ACTCA TGGGC TCTGA GCAGT GGAGA ACAGT GGTGT
 601 GAACG GGCAT CTCCT CCCAG CAGCT CATGC AACAT CTCCT CTGGG GAAAT
 651 GCAGA AGGGC CTGTG GGAGC AGTGC CAGCT TCTGA AGAGC ACCTC GGTGT
 701 TTGCC CGCTG CCACC CTCTG GTGGA CCCCAG AGCCT TTTGT GGCCC TGTGT
 751 GAGAA GACTT TGTGT GAGTG TGCTG GGGGG CTGGA GTGCG CCTGC CCTGC
 801 CCTCC TGGAG TACGC CCGGA CCTGT GCCCA GGAGG GAATG GTGCT GTACG
 851 GCTGG ACCGA CCACA GCGCG TGCAG CCCAG TGTGC CCTGC TGGTA TGGAG
 901 TATAG GCAGT GTGTG TCCCC TTGCG CCAGG ACCTG CCAGA GCCTG CACAT
 951 CAATG AAATG TGTCA GGAGC GATGC GTGGA TGGCT GCAGC TGCCC TGAGG
 1001 GACAG CTCCT GGATG AAGGC CTCTG CGTGG AGAGC ACCGA GTGTC CCTGC
 1051 GTGCA TTCCG GAAAG CGCTA CCCTC CCGGC ACCTC CCTCT CTCGA GACTG
 1101 CAACA CCTGC ATTTG CCGAA ACAGC CAGTG GATCT GCAGC AATGA AGAAT
 1151 GTCCA GGGGA GTGCC TTGTC ACTGG TCAAT CCCAC TTCAA GAGCT TTGAC
 1201 AACAG ATACT TCACC TTCAG TGGGA TCTGC CAGTA CCTGC TGGCC CGGGA
 1251 TTGCC AGGAC CACTC CTTCT CCATT GTCAT TGAGA CTGTC CAGTG TGCTG
 1301 ATGAC CGCGA CGCTG TGTGC ACCCG CTCCG TCACC GTCCG GCTGC CTGGC
 1351 CTGCA CAACA GCCTT GTGAA ACTGA AGCAT GGGGC AGGAG TTGCC ATGGA
 1401 TGGCC AGGAC ATCCA GCTCC CCCTC CTGAA AGGTG ACCTC CGCAT CCAGC
 1451 ATACA GTGAC GGCCT CCGTG CGCCT CAGCT ACGGG GAGGA CCTGC AGATG
 1501 GACTG GGATG GCCGC GGGAG GCTGC TGGTG AAGCT GTCCC CCGTC TATGC
 1551 CGGGA AGACC TGCAG CCTGT GTGGG AATTA CAATG GCAAC CAGGG CGACG
 1601 ACTTC CTTAC CCCCT CTGGG CTGGC GGAGC CCCGG GTGGA GGACT TCGGG
 1651 AACGC CTGGA AGCTG CACGG GGAAT GCCAG GACCT GCAGA AGCAG CACAG
 1701 CGATC CCTGC GCCCT CAACC CGCGC ATGAC CAGGT TCTCC GAGGA GCGCT
 1751 GCGCG GTCCT GACGT CCCCC ACATT CGAGG CCTGC CATCG TGCCG TCAGC
 1801 CCGCT GCCCT ACCTG CGGAA CTGCC GCTAC GACGT GTGCT CCTGC TCGGA
 1851 CGGCC GCGAG TGCCT GTGCG GCGCC CTGGC CAGCT ATGCC GCGGC CTGCG
 1901 CGGGG AGAGG CGTGC GCGTC GCGTG GCGCG AGCCA GGCCG CTGTG AGCTG
 1951 AACTG CCCGA AAGGC CAGGT GTACC TGCAG TGCGG GACCC CCTGC AACCT
 2001 GACCT GCCGC TCTCT CTCTT ACCCG GATGA GGAAT GCAAT GAGGC CTGCC
 2051 TGGAG GGCTG CTTCT GCCCC CCAGG GCTCT ACATG GATGA GAGGG GGGAC
 2101 TGCGT GCCCA AGGCC CAGTG CCCCT GTTAC TATGA CGGTG AGATC TTCCA
 2151 GCCAG AAGAC ATCTT CTCAG ACCAT CACAC CATGT GCTAC TGTGA GGATG
 2201 GCTTC ATGCA CTGTA CCATG AGTGG AGTCC CCGGA AGCTT GCTGC CTGAC
 2251 GCTGT CCTCA GCAGT CCCCT GTCTC ATCGC AGCAA AAGGA GCCTA TCCTG
 2301 TCGGC CCCCC ATGGT CAAGC TGGTG TGTCC CGCTG ACAAC CTGCG GGCTG
 2351 AAGGG CTCGA GTGTA CCAAA ACGTG CCAGA ACTAT GACCT GGAGT GCATG
 2401 AGCAT GGGCT GTGTC TCTGG CTGCC TCTGC CCCCC GGGCA TGGTC CGGCA

2451 TGAGA ACAGA TGTGT GGCCC TGGAA AGGTG TCCCT GCTTC CATCA GGGCA
 2501 AGGAG TATGC CCCTG GAGAA ACAGT GAAGA TTGGC TGCAA CACTT GTGTG
 2551 TGTCG GGACC GGAAG TGGAA CTGCA CAGAC CATGT GTGTG ATGCC ACGTG
 2601 CTCCA CGATC GGCAT GGCCC ACTAC CTCAC CTTCG ACGGG CTCAA ATACC
 2651 TGTTC CCCGG GGAGT GCCAG TACGT TCTGG TGCAG GATTA CTGCG GCAGT
 2701 AACCC TGGGA CCTTT CGGAT CCTAG TGGGG AATAA GGGAT GCAGC CACCC
 2751 CTCAG TGAAG TGCAA GAAAC GGGTC ACCAT CCTGG TGGAG GGAGG AGAGA
 2801 TTGAG CTGTT TGACG GGGAG GTGAA TGTGA AGAGG CCCAT GAAGG ATGAG
 2851 ACTCA CTTTG AGGTG GTGGA GTCTG GCCGG TACAT CATTC TGCTG CTGGG
 2901 CAAAG CCCTC TCCGT GGTCT GGGAC CGCCA CCTGA GCATC TCCGT GGTCC
 2951 TGAAG CAGAC ATACC AGGAG AAAGT GTGTG GCCTG TGTGG GAATT TTGAT
 3001 GGCAT CCAGA ACAAT GACCT CACCA GCAGC AACCT CCAAG TGGAG GAAGA
 3051 CCCTG TGGAC TTTGG GAACT CCTGG AAAGT GAGCT CGCAG TGTGC TGACA
 3101 CCAGA AAAGT GCCTC TGGAC TCATC CCCTG CCACC TGCCA TAACA ACATC
 3151 ATGAA GCAGA CGATG GTGGA TTCCT CCTGT AGAAT CCTTA CCAGT GACGT
 3201 CTTCC AGGAC TGCAA CAAGC TGGTG GACCC CGAGC CATAT CTGGA TGTCT
 3251 GCATT TACGA CACCT GCTCC TGTGA GTCCA TTGGG GACTG CGCCG CATTC
 3301 TGCGA CACCA TTGCT GCCTA TGCCC ACGTG TGTGC CCAGC ATGGC AAGGT
 3351 GGTGA CCTGG AGGAC GGCCA CATTG TGCCC CCAGA GCTGC GAGGA GAGGA
 3401 ATCTC CGGGA GAACG GGTAT GAGGC TGAGT GGCGC TATAA CAGCT GTGCA
 3451 CCTGC CTGTC AAGTC ACGTG TCAGC ACCCT GAGCC ACTGG CCTGC CCTGT
 3501 GCAGT GTGTG GAGGG CTGCC ATGCC CACTG CCCTC CAGGG AAAAT CCTGG
 3551 ATGAG CTTTT GCAGA CCTGC GTTGA CCCTG AAGAC TGTCC AGTGT GTGAG
 3601 GTGGC TGGCC GCGGT TTTGC CTCAG GAAAG AAAGT CACCT TGAAT CCCAG
 3651 TGACC CTGAG CACTG CCAGA TTTGC CACTG TGATG TTGTC AACCT CACCT
 3701 GTGAA GCCTG CCAGG AGCCG ATATC GGGTA CCTCA GAGTC TGCTA CCCCC
 3751 GAGTC AGGGC CAGGA TCAGA GCCAG CCACC TCCGG GTCTG AGACA CCCGG
 3801 GACTT CCGAG AGTGC CACCC CTGAG TCCGG ACCCG GGTCC GAGCC CGCCA
 3851 CTTCC GGCTC CGAAA CTCCC GGCAC AAGCG AGAGC GCTAC CCCAG AGTCA
 3901 GGACC AGGAA CATCT ACAGA GCCCT CTGAA GGCTC CGCTC CAGGG TCCCC
 3951 AGCCG GCAGT CCCAC TAGCA CCGAG GAGGG AACCT CTGAA AGCGC CACAC
 4001 CCGAA TCAGG GCCAG GGTCT GAGCC TGCTA CCAGC GGCAG CGAGA CACCA
 4051 GGCAC CTCTG AGTCC GCCAC ACCAG AGTCC GGACC CGGAT CTCCC GCTGG
 4101 GAGCC CCACC TCCAC TGAGG AGGGA TCTCC TGCTG GCTCT CCAAC ATCTA
 4151 CTGAG GAAGG TACCT CAACC GAGCC ATCCG AGGGA TCAGC TCCCG GCACC
 4201 TCAGA GTCGG CAACC CCGGA GTCTG GACCC GGAAC TTCCG AAAGT GCCAC
 4251 ACCAG AGTCC GGTCC CGGGA CTTCA GAATC AGCAA CACCC GAGTC CGGCC
 4301 CTGGG TCTGA ACCCG CCACA AGTGG TAGTG AGACA CCAGG ATCAG AACCT

4351 GCTAC CTCAG GGTCA GAGAC ACCCG GATCT CCGGC AGGCT CACCA ACCTC
 4401 CACTG AGGAG GGCAC CAGCA CAGAA CCAAG CGAGG GCTCC GCACC CGGAA
 4451 CAAGC ACTGA ACCCA GTGAG GGTTC AGCAC CCGGC TCTGA GCCGG CCACA
 4501 AGTGG CAGTG AGACA CCCGG CACTT CAGAG AGTGC CACCC CCGAG AGTGG
 4551 CCCAG GCACT AGTAC CGAGC CCTCT GAAGG CAGTG CGCCA GATTC TGGCG
 4601 GTGGA GGTTC CGGTG GCGGG GGATC CGGTG GCGGG GGATC CGGTG GCGGG
 4651 GGATC CGGTG GCGGG GGATC CCTGG TCCCC CGGGG CAGCG GAGGC GACAA
 4701 AACTC ACACA TGCCC ACCGT GCCCA GCTCC AGAAC TCCTG GGCGG ACCGT
 4751 CAGTC TTCCT CTTCC CCCC AAACC CAAGG ACACC CTCAT GGCCT CCCGG
 4801 ACCCC TGAGG TCACA TGCCT GGTGG TGGAC GTGAG CCACG AAGAC CCTGA
 4851 GGTCA AGTTC AACTG GTACG TGGAC GGCCT GGAGG TGCAT AATGC CAAGA
 4901 CAAAG CCGCG GGAGG AGCAG TACAA CAGCA CGTAC CGTGT GGTCA GCGTC
 4951 CTCAC CGTCC TGGCC CAGGA CTGGC TGAAT GGCAA GGAGT ACAAG TGCAA
 5001 GGTCT CCAAC AAAGC CCTCC CAGCC CCCAT CGAGA AAACC ATCTC CAAAG
 5051 CCAAA GGGCA GCCCC GAGAA CCACA GGTGT ACACC CTGCC CCCAT CCCGC
 5101 GATGA GCTGA CCAAG AACCA GTTCA GCCTG ACCTG CCTGG TCAAA GGCTT
 5151 CTATC CCAGC GACAT CGCCG TGGAG TGGGA GAGCA ATGGG CAGCC GGAGA
 5201 ACAAC TACAA GACCA CGCCT CCCGT GTTGG ACTCC GACGG CTCCT TCTTC
 5251 CTCTA CAGCA AGCTC ACCGT GGACA AGAGC AGGTG GCAGC AGGGG AACGT
 5301 CTTCT CATGC TCCGT GATGC ATGAG GCTCT GCACA ACGCC TACAC GCAGA
 5351 AGAGC CTCTC CCTGT CTCCG GGTAAT ATGA

Последовательность белка ФВ058 (ФВ034 с мутацией IHH) (SEQ ID NO: 154).

1 MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFNFTFDGSM
 51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
 101 TVTQGDQRVS MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL
 151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
 201 ERASPPSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
 251 EKTLCCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDHSA CSPVCPAGME
 301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTPCPC
 351 VHSGKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD
 401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIETV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
 451 LHNSLVKLKH GAGVAMDQGD IQLPLLKGD RIQHTVTASV RLSYGEDLQM
 501 DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
 551 NAWKLHGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
 601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCEL

651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCT SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
 701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
 751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
 801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
 851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ YVLVQDYCGS
 901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE VNVKRPMKDE
 951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
 1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI
 1051 MKQTMVDSSC RILTSDVFQD CNKLVDPPEY LDVCIYDTCS CESIGDCAAF
 1101 CDTIAAYAHV CAQHKGKVVW RTATLCPQSC EERNLRENGY EAEWRYNSCA
 1151 PACQVTCQHP EPLACPVQCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
 1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGTSESATP
 1251 ESGPGSEPAT SGSETPGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP GTSESATPES
 1301 GPGTSTEPSE GSAPGSPAGS PTSTEEGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP
 1351 GTSESATPES GPGSPAGSPT STEEGSPAGS PTSTEEGTST EPSEGSAPGT
 1401 SESATPESGP GTSESATPES GPGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPGSEP
 1451 ATSGSETPGS PAGSPTSTEE GTSTEPSEGS APTGSTEPSE GSAPGSEPAT
 1501 SGSETPGTSE SATPESGPGT STEPSEGSAP DSGGGGSGGG GSGGGGSGGG
 1551 GSGGGGSLVP RSGGGDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMASR
 1601 TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV
 1651 LTVLAQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR
 1701 DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSDGSFF
 1751 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNA YTQKSLSLSP GK*

Нуклеотидная последовательность FVIII 169 (SEQ ID NO: 155).

1 ATGCA AATAG AGCTC TCCAC CTGCT TCTTT CTGTG CCTTT TGCGA TTCTG
 51 CTTTA GTGCC ACCAG AAGAT ACTAC CTGGG TGCAG TGGAA CTGTC ATGGG
 101 ACTAT ATGCA AAGTG ATCTC GGTGA GCTGC CTGTG GACGC AAGAT TTCCT
 151 CCTAG AGTGC CAAAA TCTTT TCCAT TCAAC ACCTC AGTCG TGTAC AAAAA
 201 GACTC TGTTT GTAGA ATTCA CGGAT CACCT TTTCA ACATC GCTAA GCCAA
 251 GGCCA CCCTG GATGG GTCTG CTAGG TCCTA CCATC CAGGC TGAGG TTTAT
 301 GATAC AGTGG TCATT AACT TAAGA ACATG GCTTC CCATC CTGTC AGTCT
 351 TCATG CTGTT GGTGT ATCCT ACTGG AAAGC TTCTG AGGGA GCTGA ATATG
 401 ATGAT CAGAC CAGTC AAAGG GAGAA AGAAG ATGAT AAAGT CTTCC CTGGT
 451 GGAAG CCATA CATAT GTCTG GCAGG TCCTG AAAGA GAATG GTCCA ATGGC
 501 CTCTG ACCCA CTGTG CCTTA CCTAC TCATA TCTTT CTCAT GTGGA CCTGG

551 TAAAA GACTT GAATT CAGGC CTCAT TGGAG CCCTA CTAGT ATGTA GAGAA
 601 GGGAG TCTGG CCAAG GAAAA GACAC AGACC TTGCA CAAAT TTATA CTACT
 651 TTTTG CTGTA TTTGA TGAAG GGAAA AGTTG GCACT CAGAA ACAA GAAC T
 701 CCTTG ATGCA GGATA GGGAT GCTGC ATCTG CTCGG GCCTG GCCTA AAATG
 751 CACAC AGTCA ATGGT TATGT AAACA GGTCT CTGCC AGGTC TGATT GGATG
 801 CCACA GGAAA TCAGT CTATT GGCAT GTGAT TGGAA TGGGC ACCAC TCCTG
 851 AAGTG CACTC AATAT TCCTC GAAGG TCACA CATTT CTTGT GAGGA ACCAT
 901 CGCCA GGCTA GCTTG GAAAT CTCGC CAATA ACTTT CCTTA CTGCT CAAAC
 951 ACTCT TGATG GACCT TGGAC AGTTT CTACT GTTTT GTCAT ATCTC TTCCC
 1001 ACCAA CATGA TGGCA TGGAA GCTTA TGTCA AAGTA GACAG CTGTC CAGAG
 1051 GAACC CCAAC TACGA ATGAA AAATA ATGAA GAAGC GGAAG ACTAT GATGA
 1101 TGATC TTACT GATTC TGAAA TGGAT GTGGT CAGGT TTGAT GATGA CAACT
 1151 CTCCT TCCTT TATCC AAATT CGCTC AGTTG CCAAG AAGCA TCCTA AAAC T
 1201 TGGGT ACATT ACATT GCTGC TGAAG AGGAG GACTG GGACT ATGCT CCCTT
 1251 AGTCC TCGCC CCCGA TGACA GAAGT TATAA AAGTC AATAT TTGAA CAATG
 1301 GCCCT CAGCG GATTG GTAGG AAGTA CAAAA AAGTC CGATT TATGG CATA C
 1351 ACAGA TGAAA CCTTT AAGAC TCGTG AAGCT ATTCA GCATG AATCA GGAAT
 1401 CTTGG GACCT TTACT TTATG GGGAA GTTGG AGACA CACTG TTGAT TATAT
 1451 TTAAG AATCA AGCAA GCAGA CCATA TAACA TCTAC CCTCA CGGAA TCACT
 1501 GATGT CCGTC CTTTG TATTC AAGGA GATTA CCAAA AGGTG TAAAA CATTT
 1551 GAAGG ATTTT CCAAT TCTGC CAGGA GAAAT ATTCA AATAT AAATG GACAG
 1601 TGACT GTAGA AGATG GGCCA ACTAA ATCAG ATCCT CGGTG CCTGA CCCGC
 1651 TATTA CTCTA GTTTC GTTAA TATGG AGAGA GATCT AGCTT CAGGA CTCAT
 1701 TGGCC CTCTC CTCAT CTGCT ACAA GAATC TGTAG ATCAA AGAGG AAACC
 1751 AGATA ATGTC AGACA AGAGG AATGT CATCC TGTTT TCTGT ATTTG ATGAG
 1801 AACCG AAGCT GGTAC CTCAC AGAGA ATATA CAACG CTTTC TCCCC AATCC
 1851 AGCTG GAGTG CAGCT TGAGG ATCCA GAGTT CCAAG CCTCC AACAT CATGC
 1901 ACAGC ATCAA TGGCT ATGTT TTTGA TAGTT TGCAG TTGTC AGTTT GTTTG
 1951 CATGA GGTGG CATACT TGGTA CATTG TAAGC ATTGG AGCAC AGACT GACTT
 2001 CCTTT CTGTC TTCTT CTCTG GATAT ACCTT CAAAC ACAA ATGGT CTATG
 2051 AAGAC AACT CACCC TATTC CCATT CTCAG GAGAA ACTGT CTTCA TGTCG
 2101 ATGGA AAACC CAGGT CTATG GATTC TGGGG TGCCA CAACT CAGAC TTTCG
 2151 GAACA GAGGC ATGAC CGCCT TACTG AAGGT TTCTA GTTGT GACAA GAACA
 2201 CTGGT GATTA TTACG AGGAC AGTTA TGAAG ATATT TCAGC ATACT TGCTG
 2251 AGTAA AAACA ATGCC ATTGA ACCAA GAAGC TTCTC TCAAA ACGGC GCGCC
 2301 AGGTA CCTCA GAGTC TGCTA CCCCC GAGTC AGGGC CAGGA TCAGA GCCAG
 2351 CCACC TCCGG GTCTG AGACA CCCGG GACTT CCGAG AGTGC CACCC CTGAG
 2401 TCCGG ACCCG GGTCC GAGCC CGCCA CTTCG GGCTC CGAAA CTCCC GGCAC

2451 AAGCG AGAGC GCTAC CCCAG AGTCA GGACC AGGAA CATCT ACAGA GCCCT
 2501 CTGAA GGCTC CGCTC CAGGG TCCCC AGCCG GCAGT CCCAC TAGCA CCGAG
 2551 GAGGG AACCT CTGAA AGCGC CACAC CCGAA TCAGG GCCAG GGTCT GAGCC
 2601 TGCTA CCAGC GGCAG CGAGA CACCA GGCAC CTCTG AGTCC GCCAC ACCAG
 2651 AGTCC GGACC CGGAT CTCCC GCTGG GAGCC CCACC TCCAC TGAGG AGGGA
 2701 TCTCC TGCTG GCTCT CCAAC ATCTA CTGAG GAAGG TACCT CAACC GAGCC
 2751 ATCCG AGGGA TCAGC TCCCG GCACC TCAGA GTCGG CAACC CCGGA GTCTG
 2801 GACCC GGAAC TTCCG AAAGT GCCAC ACCAG AGTCC GGTCC CGGGA CTTCA
 2851 GAATC AGCAA CACCC GAGTC CGGCC CTGGG TCTGA ACCCG CCACA AGTGG
 2901 TAGTG AGACA CCAGG ATCAG AACCT GCTAC CTCAG GGTCA GAGAC ACCCG
 2951 GATCT CCGGC AGGCT CACCA ACCTC CACTG AGGAG GGCAC CAGCA CAGAA
 3001 CCAAG CGAGG GCTCC GCACC CGGAA CAAGC ACTGA ACCCA GTGAG GGTTC
 3051 AGCAC CCGGC TCTGA GCCGG CCACA AGTGG CAGTG AGACA CCCGG CACTT
 3101 CAGAG AGTGC CACCC CCGAG AGTGG CCCAG GCACT AGTAC CGAGC CCTCT
 3151 GAAGG CAGTG CGCCA GCCTC GAGCC CACCA GTCTT GAAAC GCCAT CAAGC
 3201 TGAAA TAACT CGTAC TACTC TTCAG TCAGA TCAAG AGGAA ATCGA TTATG
 3251 ATGAT ACCAT ATCAG TTGAA ATGAA GAAGG AAGAT TTTGA CATT TATGAT
 3301 GAGGA TGAAA ATCAG AGCCC CCGCA GCTTT CAAAA GAAAA CACGA CACTA
 3351 TTTTA TTGCT GCAGT GGAGA GGCTC TGGGA TTATG GGATG AGTAG CTCCC
 3401 CACAT GTTCT AAGAA ACAGG GCTCA GAGTG GCAGT GTCCC TCAGT TCAAG
 3451 AAAGT TGTTT TCCAG GAATT TACTG ATGGC TCCTT TACTC AGCCC TTATA
 3501 CCGTG GAGAA CTAAA TGAAC ATTTG GGACT CCTGG GGCCA TATAT AAGAG
 3551 CAGAA GTTGA AGATA ATATC ATGGT AACTT TCAGA AATCA GGCCT CTCGT
 3601 CCCTA TTCCT TCTAT TCTAG CCTTA TTTCT TATGA GGAAG ATCAG AGGCA
 3651 AGGAG CAGAA CCTAG AAAAA ACTTT GTCAA GCCTA ATGAA ACCAA AACTT
 3701 ACTTT TGGAA AGTGC AACAT CATAT GGCAC CCACT AAAGA TGAGT TTGAC
 3751 TGCAA AGCCT GGGCT TATTT CTCTG ATGTT GACCT GGAAA AAGAT GTGCA
 3801 CTCAG GCCTG ATTGG ACCCC TTCTG GTCTG CCACA CTAAC AACT GAACC
 3851 CTGCT CATGG GAGAC AAGTG ACAGT ACAGG AATTT GCTCT GTTTT TCACC
 3901 ATCTT TGATG AGACC AAAAG CTGGT ACTTC ACTGA AAATA TGGAA AGAAA
 3951 CTGCA GGGCT CCCTG CAATA TCCAG ATGGA AGATC CCACT TTAA AGAGA
 4001 ATTAT CGCTT CCATG CAATC AATGG CTACA TAATG GATAC ACTAC CTGGC
 4051 TTAGT AATGG CTCAG GATCA AAGGA TTCGA TGGTA TCTGC TCAGC ATGGG
 4101 CAGCA ATGAA AACAT CCATT CTATT CATT CAGTG GACAT GTGTT CACTG
 4151 TACGA AAAAA AGAGG AGTAT AAAAT GGCAC TGTAC AATCT CTATC CAGGT
 4201 GTTTT TGAGA CAGTG GAAAT GTTAC CATCC AAAGC TGGAA TTTGG CGGGT
 4251 GGAAT GCCTT ATTGG CGAGC ATCTA CATGC TGGGA TGAGC AACT TTTTC
 4301 TGGTG TACAG CAATA AGTGT CAGAC TCCCC TGGGA ATGGC TTCTG GACAC

4351 ATTAG AGATT TTCAG ATTAC AGCTT CAGGA CAATA TGGAC AGTGG GCCCC
 4401 AAAGC TGGCC AGACT TCATT ATTCC GGATC AATCA ATGCC TGGAG CACCA
 4451 AGGAG CCCTT TTCTT GGATC AAGGT GGATC TGTG GCACC AATGA TTATT
 4501 CACGG CATCA AGACC CAGGG TGCCC GTCAG AAGTT CTCCA GCCTC TACAT
 4551 CTCTC AGTTT ATCAT CATGT ATAGT CTTGA TGGGA AGAAG TGGCA GACTT
 4601 ATCGA GGAAA TTCCA CTGGA ACCTT AATGG TCTTC TTTGG CAATG TGGAT
 4651 TCATC TGGGA TAAAA CACAA TATTT TTAAC CCTCC AATTA TTGCT CGATA
 4701 CATCC GTTTG CACCC AACTC ATTAT AGCAT TCGCA GCACT CTTCG CATGG
 4751 AGTTG ATGGG CTGTG ATTTA AATAG TTGCA GCATG CCATT GGGAA TGGAG
 4801 AGTAA AGCAA TATCA GATGC ACAGA TTAAT GCTTC ATCCT ACTTT ACCAA
 4851 TATGT TTGCC ACCTG GTCTC CTTCA AAAGC TCGAC TTCAC CTCCA AGGGA
 4901 GGAGT AATGC CTGGA GACCT CAGGT GAATA ATCCA AAAGA GTGGC TGCAA
 4951 GTGGA CTTCC AGAAG ACAAT GAAAG TCACA GGAGT AACTA CTCAG GGAGT
 5001 AAAAT CTCTG CTTAC CAGCA TGTAT GTGAA GGAGT TCCTC ATCTC CAGCA
 5051 GTCAA GATGG CCATC AGTGG ACTCT CTTTT TTCAG AATGG CAAAG TAAAG
 5101 GTTTT TCAGG GAAAT CAAGA CTCCT TCACA CCTGT GGTGA ACTCT CTAGA
 5151 CCCAC CGTTA CTGAC TCGCT ACCTT CGAAT TCACC CCCAG AGTTG GGTGC
 5201 ACCAG ATTGC CCTGA GGATG GAGGT TCTGG GCTGC GAGGC ACAGG ACCTC
 5251 TACGA CAAAA CTCAC ACATG CCCAC CGTGC CCAGC TCCAG AACTC CTGGG
 5301 CGGAC CGTCA GTCTT CCTCT TCCCC CCAAA ACCCA AGGAC ACCCT CATGA
 5351 TCTCC CGGAC CCCTG AGGTC ACATG CGTGG TGGTG GACGT GAGCC ACGAA
 5401 GACCC TGAGG TCAAG TTCAA CTGGT ACGTG GACGG CGTGG AGGTG CATAA
 5451 TGCCA AGACA AAGCC GCGGG AGGAG CAGTA CAACA GCACG TACCG TGTGG
 5501 TCAGC GTCCT CACCG TCCTG CACCA GGACT GGCTG AATGG CAAGG AGTAC
 5551 AAGTG CAAGG TCTCC AACAAG AGCCC TCCCA GCCCC CATCG AGAAA ACCAT
 5601 CTCCA AAGCC AAAGG GCAGC CCCGA GAACC ACAGG TGTAC ACCCT GCCCC
 5651 CATCC CGGGA TGAGC TGACC AAGAA CCAGG TCAGC CTGAC CTGCC TGGTC
 5701 AAAGG CTTCT ATCCC AGCGA CATCG CCGTG GAGTG GGAGA GCAAT GGGCA
 5751 GCCGG AGAAC AACTA CAAGA CCACG CCTCC CGTGT TGGAC TCCGA CGGCT
 5801 CCTTC TTCCT CTACA GCAAG CTCAC CGTGG ACAAG AGCAG GTGGC AGCAG
 5851 GGGAA CGTCT TCTCA TGCTC CGTGA TGCAT GAGGC TCTGC ACAAC CACTA
 5901 CACGC AGAAG AGCCT CTCCC TGTCT CCGGG TAAAT GA

Последовательность белка FVIII169 (SEQ ID NO: 70).

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGA VE LSWDYMQS DL GELPVDARFP
 51 PRVPKSF PFN TSVVYK KTLF VEFTDHL FNI AKPRPPW MGL LGPTIQAEVY
 101 DTVVITL K NM ASHPVSLH AV GVS YWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFP G

151 GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 251 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
 301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYWVKVDSCPE
 351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
 401 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
 501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
 551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 601 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MUYEDTLTLF PFSGETV FMS
 701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDY YED SYEDISAYLL
 751 SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET PGTSESATPE
 801 SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG SPAGSPTSTE
 851 EGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG
 901 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGTS
 951 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP TSTEEGTSTE
 1001 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE SGPGTSTEPS
 1051 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
 1101 EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSV PQFK
 1151 KVV FQEFTDG SFTQPLYRGE LNEHLG LLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
 1201 PYSFYSSLIS YEEDQRQGAE PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
 1251 CKAWAYFSDV DLEKDVHSLG IGPLL VCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT
 1301 IFDETKSWYF TENMERN CRA PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
 1351 LVMAQDQRIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
 1401 VFETVEM LPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC QTPLGMASGH
 1451 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
 1501 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
 1551 SSGIKHNIFN PPIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL NSCSMPLGME
 1601 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
 1651 VDFQKTMKVT GVTTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK
 1701 VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL
 1751 YDKTHTCPPC PAPELLG GPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
 1801 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
 1851 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV
 1901 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTT PPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
 1951 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*

Нуклеотидная последовательность FVIII 263 (тройной мутант ИНН) (SEQ ID NO: 156).

```

1   ATGCA AATAG AGCTC TCCAC CTGCT TCTTT CTGTG CCTTT TGC GA TTCTG
51  CTTTA GTGCC ACCAG AAGAT ACTAC CTGGG TGCAG TGGAA CTGTC ATGGG
101 ACTAT ATGCA AGGCG CGCCA ACATC AGAGA GCGCC ACCCC TGAAA GTGGT
151 CCCGG GAGCG AGCCA GCCAC ATCTG GGTCG GAAAC GCCAG GCACA AGTGA
201 GTCTG CAACT CCCGA GTCCG GACCT GGCTC CGAGC CTGCC ACTAG CGGCT
251 CCGAG ACTCC GGGAA CTTCC GAGAG CGCTA CACCA GAAAG CGGAC CCGGA
301 ACCAG TACCG AACCT AGCGA GGGCT CTGCT CCGGG CAGCC CAGCC GGCTC
351 TCCTA CATCC ACGGA GGAGG GCACT TCCGA ATCCG CCACC CCGGA GTCAG
401 GGCCA GGATC TGAAC CCGCT ACCTC AGGCA GTGAG ACGCC AGGAA CGAGC
451 GAGTC CGCTA CACCG GAGAG TGGGC CAGGG AGCCC TGCTG GATCT CCTAC
501 GTCCA CTGAG GAAGG GTCAC CAGCG GGCTC GCCCA CCAGC ACTGA AGAAG
551 GTGCC TCGAG CAGTG ATCTC GGTGA GCTGC CTGTG GACGC AAGAT TTCCT
601 CCTAG AGTGC CAAAA TCTTT TCCAT TCAAC ACCTC AGTCG TGTAC AAAAA
651 GACTC TGTTT GTAGA ATTCA CGGAT CACCT TTTCA ACATC GCTAA GCCAA
701 GGCCA CCCTG GATGG GTCTG CTAGG TCCTA CCATC CAGGC TGAGG TTTAT
751 GATAC AGTGG TCATT ACACT TAAGA ACATG GCTTC CCATC CTGTC AGTCT
801 TCATG CTGTT GGTGT ATCCT ACTGG AAAGC TTCTG AGGGA GCTGA ATATG
851 ATGAT CAGAC CAGTC AAAGG GAGAA AGAAG ATGAT AAAGT CTTCC CTGGT
901 GGAAG CCATA CATAT GTCTG GCAGG TCCTG AAAGA GAATG GTCCA ATGGC
951 CTCTG ACCCA CTGTG CCTTA CCTAC TCATA TCTTT CTCAT GTGGA CCTGG
1001 TAAAA GACTT GAATT CAGGC CTCAT TGGAG CCCTA CTAGT ATGTA GAGAA
1051 GGGAG TCTGG CCAAG GAAAA GACAC AGACC TTGCA CAAAT TTATA CTA CT
1101 TTTTG CTGTA TTTGA TGAAG GGAAA AGTTG GCACT CAGAA ACAA GAACT
1151 CCTTG ATGCA GGATA GGGAT GCTGC ATCTG CTCGG GCCTG GCCTA AAATG
1201 CACAC AGTCA ATGGT TATGT AAACA GGTCT CTGCC AGGTC TGATT GGATG
1251 CCACA GGAAA TCAGT CTATT GGCAT GTGAT TGGAA TGGGC ACCAC TCCTG
1301 AAGTG CACTC AATAT TCCTC GAAGG TCACA CATTT CTTGT GAGGA ACCAT
1351 CGCCA GGCTA GCTTG GAAAT CTCGC CAATA ACTTT CCTTA CTGCT CAAAC
1401 ACTCT TGATG GACCT TGGAC AGTTT CTA CT GTTTT GTCAT ATCTC TTCCC
1451 ACCAA CATGA TGGCA TGGAA GCTTA TGTCA AAGTA GACAG CTGTC CAGAG
1501 GAACC CCAAC TACGA ATGAA AAATA ATGAA GAAGC GGAAG ACTAT GATGA
1551 TGATC TTA CT GATTC TGAAA TGGAT GTGGT CAGGT TTGAT GATGA CAACT
1601 CTCCT TCCTT TATCC AAATT CGCTC AGTTG CCAAG AAGCA TCCTA AA ACT
1651 TGGGT ACATT ACATT GCTGC TGAAG AGGAG GACTG GGA CT ATGCT CCCTT
1701 AGTCC TCGCC CCCGA TGACA GAAGT TATAA AAGTC AATAT TTGAA CAATG
1751 GCCCT CAGCG GATTG GTAGG AAGTA CAAAA AAGTC CGATT TATGG CATACT

```

1801 ACAGA TGAAA CCTTT AAGAC TCGTG AAGCT ATTCA GCATG AATCA GGAAT
 1851 CTTGG GACCT TTA CT TTATG GGGAA GTTGG AGACA CACTG TTGAT TATAT
 1901 TTAAG AATCA AGCAA GCAGA CCATA TAACA TCTAC CCTCA CGGAA TCACT
 1951 GATGT CCGTC CTTTG TATTC AAGGA GATTA CCAAA AGGTG TAAAA CATTT
 2001 GAAGG ATTTT CCAAT TCTGC CAGGA GAAAT ATTCA AATAT AAATG GACAG
 2051 TGA CT GTAGA AGATG GGCCA ACTAA ATCAG ATCCT CGGTG CCTGA CCCGC
 2101 TATTA CTCTA GTTTC GTTAA TATGG AGAGA GATCT AGCTT CAGGA CTCAT
 2151 TGGCC CTCTC CTCAT CTGCT ACAA GAATC TG TAG ATCAA AGAGG AAACC
 2201 AGATA ATGTC AGACA AGAGG AATGT CATCC TGTTT TCTGT ATTTG ATGAG
 2251 AACC G AAGCT GGTAC CTCAC AGAGA ATATA CAACG CTTTC TCCCC AATCC
 2301 AGCTG GAGTG CAGCT TGAGG ATCCA GAGTT CCAAG CCTCC AACAT CATGC
 2351 ACAGC ATCAA TGGCT ATGTT TTTGA TAGTT TGCAG TTGTC AGTTT GTTTG
 2401 CATGA GGTGG CATA C TGGA CATTC TAAGC ATTGG AGCAC AGACT GACTT
 2451 CCTTT CTGTC TTCTT CTCTG GATAT ACCTT CAAAC ACAA ATGGT CTATG
 2501 AAGAC AACT CACCC TATTC CCATT CTCAG GAGAA ACTGT CTTC A TGTCG
 2551 ATGGA AAACC CAGGT CTATG GATTC TGGGG TGCCA CAACT CAGAC TTTCG
 2601 GAACA GAGGC ATGAC CGCCT TACTG AAGGT TTCTA GTTGT GACAA GAACA
 2651 CTGGT GATTA TTACG AGGAC AGTTA TGAAG ATATT TCAGC ATACT TGCTG
 2701 AGTAA AAACA ATGCC ATTGA ACCAA GAAGC TTCTC TCAAA ACGGC GCGCC
 2751 AGGTA CCTCA GAGTC TGCTA CCCCC GAGTC AGGGC CAGGA TCAGA GCCAG
 2801 CCACC TCCGG GTCTG AGACA CCGG GACTT CCGAG AGTGC CACCC CTGAG
 2851 TCCGG ACCCG GTTCC GAGCC CGCCA CTTCC GGCTC CGAAA CTCCC GGCAC
 2901 AAGCG AGAGC GCTAC CCCAG AGTCA GGACC AGGAA CATCT ACAGA GCCCT
 2951 CTGAA GGCTC CGCTC CAGGG TCCCC AGCCG GCAGT CCCAC TAGCA CCGAG
 3001 GAGGG AACCT CTGAA AGCGC CACAC CCGAA TCAGG GCCAG GGTCT GAGCC
 3051 TGCTA CCAGC GGCAG CGAGA CACCA GGCAC CTCTG AGTCC GCCAC ACCAG
 3101 AGTCC GGACC CGGAT CTCCC GCTGG GAGCC CCACC TCCAC TGAGG AGGGA
 3151 TCTCC TGCTG GCTCT CCAAC ATCTA CTGAG GAAGG TACCT CAACC GAGCC
 3201 ATCCG AGGGA TCAGC TCCCG GCACC TCAGA GTCGG CAACC CCGGA GTCTG
 3251 GACCC GGAAC TTCCG AAAGT GCCAC ACCAG AGTCC GGTCC CGGGA CTTC A
 3301 GAATC AGCAA CACCC GAGTC CGGCC CTGGG TCTGA ACCCG CCACA AGTGG
 3351 TAGTG AGACA CCAGG ATCAG AACCT GCTAC CTCAG GGTCA GAGAC ACCCG
 3401 GATCT CCGGC AGGCT CACCA ACCTC CACTG AGGAG GGCAC CAGCA CAGAA
 3451 CCAAG CGAGG GCTCC GCACC CGGAA CAAGC ACTGA ACCCA GTGAG GTTTC
 3501 AGCAC CCGGC TCTGA GCCGG CCACA AGTGG CAGTG AGACA CCCGG CACTT
 3551 CAGAG AGTGC CACCC CCGAG AGTGG CCCAG GCACT AGTAC CGAGC CCTCT
 3601 GAAGG CAGTG CGCCA GCCTC GAGCC CACCA GTCTT GAAAC GCCAT CAAGC
 3651 TGAAA TAACT CGTAC TACTC TTCAG TCAGA TCAAG AGGAA ATCGA TTATG

3701 ATGAT ACCAT ATCAG TTGAA ATGAA GAAGG AAGAT TTTGA CATT ATGAT
 3751 GAGGA TGAAA ATCAG AGCCC CCGCA GCTTT CAAAA GAAAA CACGA CACTA
 3801 TTTTA TTGCT GCAGT GGAGA GGCTC TGGGA TTATG GGATG AGTAG CTCCC
 3851 CACAT GTTCT AAGAA ACAGG GCTCA GAGTG GCAGT GTCCC TCAGT TCAAG
 3901 AAAGT TGTTT TCCAG GAATT TACTG ATGGC TCCTT TACTC AGCCC TTATA
 3951 CCGTG GAGAA CTAAA TGAAC ATTTG GGAAT CCTGG GGCCA TATAT AAGAG
 4001 CAGAA GTTGA AGATA ATATC ATGGT AACTT TCAGA AATCA GGCCT CTCGT
 4051 CCCTA TTCCT TCTAT TCTAG CCTTA TTTCT TATGA GGAAG ATCAG AGGCA
 4101 AGGAG CAGAA CCTAG AAAAA ACTTT GTCAA GCCTA ATGAA ACCAA AACTT
 4151 ACTTT TGGAA AGTGC AACAT CATAT GGCAC CCACT AAAGA TGAGT TTGAC
 4201 TGCAA AGCCT GGGCT TATTT CTCTG ATGTT GACCT GGAAA AAGAT GTGCA
 4251 CTCAG GCCTG ATTGG ACCCC TTCTG GTCTG CCACA CTAAC AACTT GAACC
 4301 CTGCT CATGG GAGAC AAGTG ACAGT ACAGG AATTT GCTCT GTTTT TCACC
 4351 ATCTT TGATG AGACC AAAAG CTGGT ACTTC ACTGA AAATA TGGAA AGAAA
 4401 CTGCA GGGCT CCCTG CAATA TCCAG ATGGA AGATC CCACT TTAA AGAGA
 4451 ATTAT CGCTT CCATG CAATC AATGG CTACA TAATG GATAC ACTAC CTGGC
 4501 TTAGT AATGG CTCAG GATCA AAGGA TTCGA TGGTA TCTGC TCAGC ATGGG
 4551 CAGCA ATGAA AACAT CCATT CTATT CATT CAGTG GACAT GTGTT CACTG
 4601 TACGA AAAAA AGAGG AGTAT AAAAT GGCAC TGTAC AATCT CTATC CAGGT
 4651 GTTTT TGAGA CAGTG GAAAT GTTAC CATCC AAAGC TGGAA TTTGG CGGGT
 4701 GGAAT GCCTT ATTGG CGAGC ATCTA CATGC TGGGA TGAGC AACTT TTTTC
 4751 TGGTG TACAG CAATA AGTGT CAGAC TCCCC TGGGA ATGGC TTCTG GACAC
 4801 ATTAG AGATT TTCAG ATTAC AGCTT CAGGA CAATA TGGAC AGTGG GCCCC
 4851 AAAGC TGGCC AGACT TCATT ATTCC GGATC AATCA ATGCC TGGAG CACCA
 4901 AGGAG CCCTT TTCTT GGATC AAGGT GGATC TGTTG GCACC AATGA TTATT
 4951 CACGG CATCA AGACC CAGGG TGCCC GTCAG AAGTT CTCCA GCCTC TACAT
 5001 CTCTC AGTTT ATCAT CATGT ATAGT CTTGA TGGGA AGAAG TGGCA GACTT
 5051 ATCGA GGAAA TTCCA CTGGA ACCTT AATGG TCTTC TTTGG CAATG TGGAT
 5101 TCATC TGGGA TAAAA CACAA TATTT TTAAC CCTCC AATTA TTGCT CGATA
 5151 CATCC GTTTG CACCC AACTC ATTAT AGCAT TCGCA GCACT CTTCG CATGG
 5201 AGTTG ATGGG CTGTG ATTTA AATAG TTGCA GCATG CCATT GGGAA TGGAG
 5251 AGTAA AGCAA TATCA GATGC ACAGA TTAAT GCTTC ATCCT ACTTT ACCAA
 5301 TATGT TTGCC ACCTG GTCTC CTCA AAAGC TCGAC TTCAC CTCCA AGGGA
 5351 GGAGT AATGC CTGGA GACCT CAGGT GAATA ATCCA AAAGA GTGGC TGCAA
 5401 GTGGA CTTC AGAAG ACAAT GAAAG TCACA GGAGT AACTA CTCAG GGAGT
 5451 AAAAT CTCTG CTTAC CAGCA TGTAT GTGAA GGAGT TCCTC ATCTC CAGCA
 5501 GTCAA GATGG CCATC AGTGG ACTCT CTTT TTCAG AATGG CAAAG TAAAG
 5551 GTTTT TCAGG GAAAT CAAGA CTCCT TCACA CCTGT GGTGA ACTCT CTAGA

5601 CCCAC CGTTA CTGAC TCGCT ACCTT CGAAT TCACC CCCAG AGTTG GGTGC
 5651 ACCAG ATTGC CCTGA GGATG GAGGT TCTGG GCTGC GAGGC ACAGG ACCTC
 5701 TACGA CAAAA CTCAC ACATG CCCAC CGTGC CCAGC TCCAG AACTC CTGGG
 5751 CGGAC CGTCA GTCTT CCTCT TCCCC CCAA ACCCA AGGAC ACCCT CATGG
 5801 CCTCC CGGAC CCCTG AGGTC ACATG CGTGG TGGTG GACGT GAGCC ACGAA
 5851 GACCC TGAGG TCAAG TTCAA CTGGT ACGTG GACGG CGTGG AGGTG CATAA
 5901 TGCCA AGACA AAGCC GCGGG AGGAG CAGTA CAACA GCACG TACCG TGTGG
 5951 TCAGC GTCCT CACCG TCCTG GCCCA GGACT GGCTG AATGG CAAGG AGTAC
 6001 AAGTG CAAGG TCTCC AACA AGCCC TCCCA GCCCC CATCG AGAAA ACCAT
 6051 CTCCA AAGCC AAAGG GCAGC CCCGA GAACC ACAGG TGTAC ACCCT GCCCC
 6101 CATCC CGCGA TGAGC TGACC AAGAA CCAGG TCAGC CTGAC CTGCC TGGTC
 6151 AAAGG CTTCT ATCCC AGCGA CATCG CCGTG GAGTG GGAGA GCAAT GGGCA
 6201 GCCGG AGAAC AACTA CAAGA CCACG CCTCC CGTGT TGGAC TCCGA CGGCT
 6251 CCTTC TTCCT CTACA GCAAG CTCAC CGTGG ACAAG AGCAG GTGGC AGCAG
 6301 GGGAA CGTCT TCTCA TGCTC CGTGA TGCAT GAGGC TCTGC ACAAC GCCTA
 6351 CACGC AGAAG AGCCT CTCCC TGTCT CCGGG TAAAT GA

Последовательность белка FVIII 263 (тройной мутант IHH) (SEQ ID NO: 157).

1 MQIELSTCF LCLLRFCFSA TRRYYLGA VE LSWDYMQGAP TSESATPESG
 51 PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
 101 TSTEPSEGS A PGSPAGSPTS TEEGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS
 151 ESATPESGPG SPAGSPTS E EGSPAGSPTS TEEGASSSDL GELPVDARFP
 201 PRVPKSF PFN TSVVYK KTLF VFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
 251 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVS YWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
 301 GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 351 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 401 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
 451 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
 501 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKH PKT
 551 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 601 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
 651 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
 701 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LIC YKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 751 NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 801 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS
 851 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDY YED SYEDISAYLL
 901 SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET PGTSSESATPE

951 SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG SPAGSPTSTE
 1001 EGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG
 1051 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGTS
 1101 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP TSTEEGTSTE
 1151 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE SGPGTSTEPS
 1201 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
 1251 EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVQPK
 1301 KVVVFQFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
 1351 PYSFYSSLIS YEEDQRQGA PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
 1401 CKAWAYFSDV DLEKDVHSL IGPLLVCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT
 1451 IFDETKSWYF TENMERN CRA PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
 1501 LVMAQDQIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
 1551 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC QTPLGMASGH
 1601 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
 1651 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
 1701 SSGIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL NSCSMPLGME
 1751 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
 1801 VDFQKTMKVT GVTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK
 1851 VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL
 1901 YDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMASRTPEV TCVVVDVSHE
 1951 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL AQDWLNGKEY
 2001 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV
 2051 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
 2101 GNVFSCSVMH EALHNAYTQK SLSLSPGK*

Нуклеотидная последовательность FVIII 282 (SEQ ID NO: 158).

1 ATGCA AATAG AGCTC TCCAC CTGCT TCTTT CTGTG CCTTT TGCGA TTCTG
 51 CTTTA GTGCC ACCAG AAGAT ACTAC CTGGG TGCAG TGGAA CTGTC ATGGG
 101 ACTAT ATGCA AAGTG ATCTC GGTGA GCTGC CTGTG GACGC AAGAT TTCCT
 151 CCTAG AGTGC CAAAA TCTTT TCCAT TCAAC ACCTC AGTCG TGTAC AAAAA
 201 GACTC TGTTT GTAGA ATTCA CGGAT CACCT TTTCA ACATC GCTAA GCCAA
 251 GGCCA CCCTG GATGG GTCTG CTAGG TCCTA CCATC CAGGC TGAGG TTTAT
 301 GATAC AGTGG TCATT AACT TAAGA ACATG GCTTC CCATC CTGTC AGTCT
 351 TCATG CTGTT GGTGT ATCCT ACTGG AAAGC TTCTG AGGGA GCTGA ATATG
 401 ATGAT CAGAC CAGTC AAAGG GAGAA AGAAG ATGAT AAAGT CTTCC CTGGT
 451 GGAAG CCATA CATAT GTCTG GCAGG TCCTG AAAGA GAATG GTCCA ATGGC
 501 CTCTG ACCCA CTGTG CCTTA CCTAC TCATA TCTTT CTCAT GTGGA CCTGG

551 TAAAA GACTT GAATT CAGGC CTCAT TGGAG CCCTA CTAGT ATGTA GAGAA
 601 GGGAG TCTGG CCAAG GAAAA GACAC AGACC TTGCA CAAAT TTATA CTACT
 651 TTTTG CTGTA TTTGA TGAAG GGAAA AGTTG GCACT CAGAA ACAA GAAC
 701 CCTTG ATGCA GGATA GGGAT GCTGC ATCTG CTCGG GCCTG GCCTA AAATG
 751 CACAC AGTCA ATGGT TATGT AAACA GGTCT CTGCC AGGTC TGATT GGATG
 801 CCACA GGAAA TCAGT CTATT GGCAT GTGAT TGGAA TGGGC ACCAC TCCTG
 851 AAGTG CACTC AATAT TCCTC GAAGG TCACA CATTT CTTGT GAGGA ACCAT
 901 CGCCA GGCTA GCTTG GAAAT CTCGC CAATA ACTTT CCTTA CTGCT CAAAC
 951 ACTCT TGATG GACCT TGGAC AGTTT CTACT GTTTT GTCAT ATCTC TTCCC
 1001 ACCAA CATGA TGGCA TGGAA GCTTA TGTCA AAGTA GACAG CTGTC CAGAG
 1051 GAACC CCAAC TACGA ATGAA AAATA ATGAA GAAGC GGAAG ACTAT GATGA
 1101 TGATC TTACT GATTC TGAAA TGGAT GTGGT CAGGT TTGAT GATGA CAACT
 1151 CTCCT TCCTT TATCC AAATT CGCTC AGTTG CCAAG AAGCA TCCTA AAAC
 1201 TGGGT ACATT ACATT GCTGC TGAAG AGGAG GACTG GGACT ATGCT CCCTT
 1251 AGTCC TCGCC CCCGA TGACA GAAGT TATAA AAGTC AATAT TTGAA CAATG
 1301 GCCCT CAGCG GATTG GTAGG AAGTA CAAAA AAGTC CGATT TATGG CATACT
 1351 ACAGA TGAAA CCTTT AAGAC TCGTG AAGCT ATTCA GCATG AATCA GGAAT
 1401 CTTGG GACCT TTACT TTATG GGGAA GTTGG AGACA CACTG TTGAT TATAT
 1451 TTAAG AATCA AGCAA GCAGA CCATA TAACA TCTAC CCTCA CGGAA TCACT
 1501 GATGT CCGTC CTTTG TATTC AAGGA GATTA CCAAA AGGTG TAAAA CATTT
 1551 GAAGG ATTTT CCAAT TCTGC CAGGA GAAAT ATTCA AATAT AAATG GACAG
 1601 TGACT GTAGA AGATG GGCCA ACTAA ATCAG ATCCT CGGTG CCTGA CCCGC
 1651 TATTA CTCTA GTTTC GTTAA TATGG AGAGA GATCT AGCTT CAGGA CTCAT
 1701 TGGCC CTCTC CTCAT CTGCT ACAA GAATC TGTAG ATCAA AGAGG AAACC
 1751 AGATA ATGTC AGACA AGAGG AATGT CATCC TGTTT TCTGT ATTTG ATGAG
 1801 AACCG AAGCT GGTAC CTCAC AGAGA ATATA CAACG CTTTC TCCCC AATCC
 1851 AGCTG GAGTG CAGCT TGAGG ATCCA GAGTT CCAAG CCTCC AACAT CATGC
 1901 ACAGC ATCAA TGGCT ATGTT TTTGA TAGTT TGCAG TTGTC AGTTT GTTTG
 1951 CATGA GGTGG CATACT TGGTA CATTG TAAGC ATTGG AGCAC AGACT GACTT
 2001 CCTTT CTGTC TTCTT CTCTG GATAT ACCTT CAAAC ACAA ATGGT CTATG
 2051 AAGAC AACT CACCC TATTC CCATT CTCAG GAGAA ACTGT CTTCA TGTCG
 2101 ATGGA AAACC CAGGT CTATG GATTC TGGGG TGCCA CAACT CAGAC TTTCG
 2151 GAACA GAGGC ATGAC CGCCT TACTG AAGGT TTCTA GTTGT GACAA GAACA
 2201 CTGGT GATTA TTACG AGGAC AGTTA TGAAG ATATT TCAGC ATACT TGCTG
 2251 AGTAA AAACA ATGCC ATTGA ACCAA GAAGC TTCTC TCAAA ACGGC GCGCC
 2301 AACAT CAGAG AGCGC CACCC CTGAA AGTGG TCCCG GGAGC GAGCC AGCCA
 2351 CATCT GGGTC GGAAA CGCCA GGCAC AAGTG AGTCT GCAAC TCCCG AGTCC
 2401 GGACC TGGCT CCGAG CCTGC CACTA GCGGC TCCGA GACTC CGGGA ACTTC

2451 CGAGA GCGCT ACACC AGAAA GCGGA CCCGG AACCA GTACC GAACC TAGCG
 2501 AGGGC TCTGC TCCGG GCAGC CCAGC CGGCT CTCCT ACATC CACGG AGGAG
 2551 GGCAC TTCCG AATCC GCCAC CCCGG AGTCA GGGCC AGGAT CTGAA CCCGC
 2601 TACCT CAGGC AGTGA GACGC CAGGA ACGAG CGAGT CCGCT ACACC GGAGA
 2651 GTGGG CCAGG GAGCC CTGCT GGATC TCCTA CGTCC ACTGA GGAAG GGTC A
 2701 CCAGC GGGCT CGCCC ACCAG CACTG AAGAA GGTGC CTCGA GCCCA CCAGT
 2751 CTTGA AACGC CATCA AGCTG AAATA ACTCG TACTA CTCTT CAGTC AGATC
 2801 AAGAG GAAAT CGATT ATGAT GATAC CATAT CAGTT GAAAT GAAGA AGGAA
 2851 GATTT TGACA TTTAT GATGA GGATG AAAAT CAGAG CCCCC GCAGC TTTCA
 2901 AAAGA AAACA CGACA CTATT TTATT GCTGC AGTGG AGAGG CTCTG GGATT
 2951 ATGGG ATGAG TAGCT CCCCC CATGT TCTAA GAAAC AGGGC TCAGA GTGGC
 3001 AGTGT CCCTC AGTTC AAGAA AGTTG TTTTC CAGGA ATTTA CTGAT GGCTC
 3051 CTTTA CTCAG CCCTT ATACC GTGGA GAACT AAATG AACAT TTGGG ACTCC
 3101 TGGGG CCATA TATAA GAGCA GAAGT TGAAG ATAAT ATCAT GTTAA CTTTC
 3151 AGAAA TCAGG CCTCT CGTCC CTATT CCTTC TATTC TAGCC TTATT TCTTA
 3201 TGAGG AAGAT CAGAG GCAAG GAGCA GAACC TAGAA AAAAC TTTGT CAAGC
 3251 CTAAT GAAAC CAAAA CTTAC TTTTG GAAAG TGCAA CATCA TATGG CACCC
 3301 ACTAA AGATG AGTTT GACTG CAAAG CCTGG GCTTA TTTCT CTGAT GTTGA
 3351 CCTGG AAAAA GATGT GCACT CAGGC CTGAT TGGAC CCCTT CTGGT CTGCC
 3401 ACACT AACAC ACTGA ACCCT GCTCA TGGGA GACAA GTGAC AGTAC AGGAA
 3451 TTTGC TCTGT TTTTC ACCAT CTTTG ATGAG ACCAA AAGCT GGTAC TTCAC
 3501 TGAAA ATATG GAAAG AAACT GCAGG GCTCC CTGCA ATATC CAGAT GGAAG
 3551 ATCCC ACTTT TAAAG AGAAT TATCG CTTCC ATGCA ATCAA TGGCT ACATA
 3601 ATGGA TACAC TACCT GGCTT AGTAA TGGCT CAGGA TCAAA GGATT CGATG
 3651 GTATC TGCTC AGCAT GGGCA GCAAT GAAAA CATCC ATTCT ATTCA TTTCA
 3701 GTGGA CATGT GTTCA CTGTA CGAAA AAAAG AGGAG TATAA AATGG CACTG
 3751 TACAA TCTCT ATCCA GGTGT TTTTG AGACA GTGGA AATGT TACCA TCCAA
 3801 AGCTG GAATT TGGCG GGTGG AATGC CTTAT TGGCG AGCAT CTACA TGCTG
 3851 GGATG AGCAC ACTTT TTCTG GTGTA CAGCA ATAAG TGTCA GACTC CCCTG
 3901 GGAAT GGCTT CTGGA CACAT TAGAG ATTTT CAGAT TACAG CTTCA GGACA
 3951 ATATG GACAG TGGGC CCAA AGCTG GCCAG ACTTC ATTAT TCCGG ATCAA
 4001 TCAAT GCCTG GAGCA CCAAG GAGCC CTTTT CTTGG ATCAA GGTGG ATCTG
 4051 TTGGC ACCAA TGATT ATTCA CGGCA TCAAG ACCCA GGGTG CCCGT CAGAA
 4101 GTTCT CCAGC CTCTA CATCT CTCAG TTTAT CATCA TGTAT AGTCT TGATG
 4151 GGAAG AAGTG GCAGA CTTAT CGAGG AAATT CCACT GGAAC CTAA TGGTG
 4201 TTCTT TGGCA ATGTG GATTC ATCTG GGATA AAACA CAATA TTTTT AACCC
 4251 TCCAA TTATT GCTCG ATACA TCCGT TTGCA CCAA CTCAT TATAG CATTC
 4301 GCAGC ACTCT TCGCA TGGAG TTGAT GGGCT GTGAT TTAAG TAGTT GCAGC

4351 ATGCC ATTGG GAATG GAGAG TAAAG CAATA TCAGA TGCAC AGATT ACTGC
 4401 TTCAT CCTAC TTTAC CAATA TGTTT GCCAC CTGGT CTCCT TCAAA AGCTC
 4451 GACTT CACCT CCAAG GGAGG AGTAA TGCCT GGAGA CCTCA GGTGA ATAAT
 4501 CCAAA AGAGT GGCTG CAAGT GGA CTCCAG AAGAC AATGA AAGTC ACAGG
 4551 AGTAA CTACT CAGGG AGTAA AATCT CTGCT TACCA GCATG TATGT GAAGG
 4601 AGTTC CTCAT CTCCA GCAGT CAAGA TGGCC ATCAG TGGAC TCTCT TTTT
 4651 CAGAA TGGCA AAGTA AAGGT TTTTC AGGGA AATCA AGACT CCTTC ACACC
 4701 TGTGG TGAAC TCTCT AGACC CACCG TTA CTACT GACTC GCTAC CTTCG AATTC
 4751 ACCCC CAGAG TTGGG TGCAC CAGAT TGCCC TGAGG ATGGA GGTTC TGGGC
 4801 TGCGA GGCAC AGGAC CTCTA CGACA AA ACT CACAC ATGCC CACCG TGCCC
 4851 AGCTC CAGAA CTCCT GGGCG GACCG TCAGT CTTC TCTTC CCCCC AAAAC
 4901 CCAAG GACAC CCTCA TGATC TCCCG GACCC CTGAG GTCAC ATGCG TGGTG
 4951 GTGGA CGTGA GCCAC GAAGA CCCTG AGGTC AAGTT CAACT GGTAC GTGGA
 5001 CGGCG TGGAG GTGCA TAATG CCAAG ACAA GCCGC GGGAG GAGCA GTACA
 5051 ACAGC ACGTA CCGTG TGGTC AGCGT CCTCA CCGTC CTGCA CCAGG ACTGG
 5101 CTGAA TGGCA AGGAG TACAA GTGCA AGGTC TCCAA CAAAG CCCTC CCAGC
 5151 CCCCC TCGAG AAAAC CATCT CCAAA GCCAA AGGGC AGCCC CGAGA ACCAC
 5201 AGGTG TACAC CCTGC CCCCC TCCCG GGATG AGCTG ACCAA GAACC AGGTC
 5251 AGCCT GACCT GCCTG GTCAA AGGCT TCTAT CCCAG CGACA TCGCC GTGGA
 5301 GTGGG AGAGC AATGG GCAGC CGGAG ACAA CTACA AGACC ACGCC TCCCG
 5351 TGTGT GACTC CGACG GCTCC TTCTT CCTCT ACAGC AAGCT CACCG TGGAC
 5401 AAGAG CAGGT GGCAG CAGGG GAACG TCTTC TCATG CTCCG TGATG CATGA
 5451 GGCTC TGCAC AACCA CTACA CGCAG AAGAG CCTCT CCCTG TCTCC GGGTA
 5501 AATGA

Последовательность белка FVIII 282 (SEO ID NO: 159).

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGA VE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
 51 PRVPKSEFPN TSVVYKKT LF VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
 101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVS YWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFP
 151 GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 251 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGH TFLVRNH
 301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
 351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
 401 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR PYN IYPHGIT
 501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR

551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 601 NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS
 701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
 751 SKNNAIEPRS FSQNGAPTSE SATPESGPGS EPATSGSETP GTSESATPES
 801 GPGSEPATSG SETPGTSESA TPESGPGTST EPSEGSAPGS PAGSPTSTEE
 851 GTSESATPES GPGSEPATSG SETPGTSESA TPESGPGSPA GSPTSTEEGS
 901 PAGSPTSTEE GASSPPVLKR HQAEITRTTL QSDQEEIDYD DTISVEMKKE
 951 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLNRNAQSG
 1001 SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
 1051 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY FWKVQHMAP
 1101 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNLNP AHGRQVTVQE
 1151 FALFFTIFDE TKSIFYTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
 1201 MDTLPLVMA QDQIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL
 1251 YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
 1301 GMASGHIRDF QITASGQYQG WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
 1351 LAPMIIHGK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
 1401 FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
 1451 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
 1501 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVT TQGVKSLLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
 1551 QNGKVVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
 1601 CEAQDLYDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
 1651 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
 1701 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
 1751 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD
 1801 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

Нуклеотидная последовательность FVIII 283 (FVIII169 с тройной мутацией IHH) (SEQ ID NO: 160).

1 ATGCA AATAG AGCTC TCCAC CTGCT TCTTT CTGTG CCTTT TGC GA TTCTG
 51 CTTTA GTGCC ACCAG AAGAT ACTAC CTGGG TGCAG TGGAA CTGTC ATGGG
 101 ACTAT ATGCA AAGTG ATCTC GGTGA GCTGC CTGTG GACGC AAGAT TTCCT
 151 CCTAG AGTGC CAAAA TCTTT TCCAT TCAAC ACCTC AGTCG TGTAC AAAAA
 201 GACTC TGTTT GTAGA ATTCA CGGAT CACCT TTTCA ACATC GCTAA GCCAA
 251 GGCCA CCCTG GATGG GTCTG CTAGG TCCTA CCATC CAGGC TGAGG TTTAT
 301 GATAC AGTGG TCATT AACT TAAGA ACATG GCTTC CCATC CTGTC AGTCT

351 TCATG CTGTT GGTGT ATCCT ACTGG AAAGC TTCTG AGGGA GCTGA ATATG
 401 ATGAT CAGAC CAGTC AAAGG GAGAA AGAAG ATGAT AAAGT CTTCC CTGGT
 451 GGAAG CCATA CATAT GTCTG GCAGG TCCTG AAAGA GAATG GTCCA ATGGC
 501 CTCTG ACCCA CTGTG CCTTA CCTAC TCATA TCTTT CTCAT GTGGA CCTGG
 551 TAAAA GACTT GAATT CAGGC CTCAT TGGAG CCCTA CTAGT ATGTA GAGAA
 601 GGGAG TCTGG CCAAG GAAAA GACAC AGACC TTGCA CAAAT TTATA CTACT
 651 TTTTG CTGTA TTTGA TGAAG GGAAA AGTTG GCACT CAGAA ACAA GAACT
 701 CCTTG ATGCA GGATA GGGAT GCTGC ATCTG CTCGG GCCTG GCCTA AAATG
 751 CACAC AGTCA ATGGT TATGT AAACA GGTCT CTGCC AGGTC TGATT GGATG
 801 CCACA GGAAA TCAGT CTATT GGCAT GTGAT TGGAA TGGGC ACCAC TCCTG
 851 AAGTG CACTC AATAT TCCTC GAAGG TCACA CATTT CTTGT GAGGA ACCAT
 901 CGCCA GGCTA GCTTG GAAAT CTCGC CAATA ACTTT CCTTA CTGCT CAAAC
 951 ACTCT TGATG GACCT TGGAC AGTTT CTA CTACT GTTTT GTCAT ATCTC TTCCC
 1001 ACCAA CATGA TGGCA TGGAA GCTTA TGTCA AAGTA GACAG CTGTC CAGAG
 1051 GAACC CCAAC TACGA ATGAA AAATA ATGAA GAAGC GGAAG ACTAT GATGA
 1101 TGATC TTA CTACT GATTG TGAAA TGGAT GTGGT CAGGT TTGAT GATGA CAACT
 1151 CTCCT TCCTT TATCC AAATT CGCTC AGTTG CCAAG AAGCA TCCTA AAATC
 1201 TGGGT ACATT ACATT GCTGC TGAAG AGGAG GACTG GGACT ATGCT CCCTT
 1251 AGTCC TCGCC CCCGA TGACA GAAGT TATAA AAGTC AATAT TTGAA CAATG
 1301 GCCCT CAGCG GATTG GTAGG AAGTA CAAAA AAGTC CGATT TATGG CATACT
 1351 ACAGA TGAAA CCTTT AAGAC TCGTG AAGCT ATTCA GCATG AATCA GGAAT
 1401 CTTGG GACCT TTA CTACT TTATG GGGAA GTTGG AGACA CACTG TTGAT TATAT
 1451 TTAAG AATCA AGCAA GCAGA CCATA TAACA TCTAC CCTCA CGGAA TCACT
 1501 GATGT CCGTC CTTTG TATTC AAGGA GATTA CCAAA AGGTG TAAAA CATTT
 1551 GAAGG ATTTT CCAAT TCTGC CAGGA GAAAT ATTCA AATAT AAATG GACAG
 1601 TGACT GTAGA AGATG GGCCA ACTAA ATCAG ATCCT CGGTG CCTGA CCCGC
 1651 TATTA CTCTA GTTTC GTTAA TATGG AGAGA GATCT AGCTT CAGGA CTCAT
 1701 TGGCC CTCTC CTCAT CTGCT ACAA GAATC TGTA AGAGG AAACC
 1751 AGATA ATGTC AGACA AGAGG AATGT CATCC TGTTT TCTGT ATTTG ATGAG
 1801 AACCG AAGCT GGTAC CTCAC AGAGA ATATA CAACG CTTTC TCCCC AATCC
 1851 AGCTG GAGTG CAGCT TGAGG ATCCA GAGTT CCAAG CCTCC AACAT CATGC
 1901 ACAGC ATCAA TGGCT ATGTT TTTGA TAGTT TGCAG TTGTC AGTTT GTTTG
 1951 CATGA GGTGG CATACT TGGTA CATTG TAAGC ATTGG AGCAC AGACT GACTT
 2001 CCTTT CTGTC TTCTT CTCTG GATAT ACCTT CAAAC ACAA ATGGT CTATG
 2051 AAGAC AACT CACCC TATTC CCATT CTCAG GAGAA ACTGT CTTCA TGTCG
 2101 ATGGA AAACC CAGGT CTATG GATTG TGGGG TGCCA CAACT CAGAC TTTCG
 2151 GAACA GAGGC ATGAC CGCCT TACTG AAGGT TTCTA GTTGT GACAA GAACA
 2201 CTGGT GATTA TTACG AGGAC AGTTA TGAAG ATATT TCAGC ATACT TGCTG

2251 AGTAA AAACA ATGCC ATTGA ACCAA GAAGC TTCTC TCAAA ACGGC GCGCC
 2301 AGGTA CCTCA GAGTC TGCTA CCCCC GAGTC AGGGC CAGGA TCAGA GCCAG
 2351 CCACC TCCGG GTCTG AGACA CCCGG GACTT CCGAG AGTGC CACCC CTGAG
 2401 TCCGG ACCCG GGTCC GAGCC CGCCA CTTCG GGCTC CGAAA CTCCC GGCAC
 2451 AAGCG AGAGC GCTAC CCCAG AGTCA GGACC AGGAA CATCT ACAGA GCCCT
 2501 CTGAA GGCTC CGCTC CAGGG TCCCC AGCCG GCAGT CCCAC TAGCA CCGAG
 2551 GAGGG AACCT CTGAA AGCGC CACAC CCGAA TCAGG GCCAG GGTCT GAGCC
 2601 TGCTA CCAGC GGCAG CGAGA CACCA GGCAC CTCTG AGTCC GCCAC ACCAG
 2651 AGTCC GGACC CGGAT CTCCC GCTGG GAGCC CCACC TCCAC TGAGG AGGGA
 2701 TCTCC TGCTG GCTCT CCAAC ATCTA CTGAG GAAGG TACCT CAACC GAGCC
 2751 ATCCG AGGGA TCAGC TCCCG GCACC TCAGA GTCGG CAACC CCGGA GTCTG
 2801 GACCC GGAAC TTCCG AAAGT GCCAC ACCAG AGTCC GGTCC CGGGA CTTCA
 2851 GAATC AGCAA CACCC GAGTC CGGCC CTGGG TCTGA ACCCG CCACA AGTGG
 2901 TAGTG AGACA CCAGG ATCAG AACCT GCTAC CTCAG GGTCA GAGAC ACCCG
 2951 GATCT CCGGC AGGCT CACCA ACCTC CACTG AGGAG GGCAC CAGCA CAGAA
 3001 CCAAG CGAGG GCTCC GCACC CGGAA CAAGC ACTGA ACCCA GTGAG GGTTC
 3051 AGCAC CCGGC TCTGA GCCGG CCACA AGTGG CAGTG AGACA CCCGG CACTT
 3101 CAGAG AGTGC CACCC CCGAG AGTGG CCCAG GCACT AGTAC CGAGC CCTCT
 3151 GAAGG CAGTG CGCCA GCCTC GAGCC CACCA GTCTT GAAAC GCCAT CAAGC
 3201 TGAAA TAACT CGTAC TACTC TTCAG TCAGA TCAAG AGGAA ATCGA TTATG
 3251 ATGAT ACCAT ATCAG TTGAA ATGAA GAAGG AAGAT TTTGA CATT TATGAT
 3301 GAGGA TGAAA ATCAG AGCCC CCGCA GCTTT CAAAA GAAAA CACGA CACTA
 3351 TTTTA TTGCT GCAGT GGAGA GGCTC TGGGA TTATG GGATG AGTAG CTCCC
 3401 CACAT GTTCT AAGAA ACAGG GCTCA GAGTG GCAGT GTCCC TCAGT TCAAG
 3451 AAAGT TGTTT TCCAG GAATT TACTG ATGGC TCCTT TACTC AGCCC TTATA
 3501 CCGTG GAGAA CTAAA TGAAC ATTTG GGACT CCTGG GGCCA TATAT AAGAG
 3551 CAGAA GTTGA AGATA ATATC ATGGT AACTT TCAGA AATCA GGCCT CTCGT
 3601 CCCTA TTCCT TCTAT TCTAG CCTTA TTTCT TATGA GGAAG ATCAG AGGCA
 3651 AGGAG CAGAA CCTAG AAAAA ACTTT GTCAA GCCTA ATGAA ACCAA AACTT
 3701 ACTTT TGGAAG AGTGC AACAT CATAT GGCAC CCACT AAAGA TGAGT TTGAC
 3751 TGCAA AGCCT GGGCT TATTT CTCTG ATGTT GACCT GGAAA AAGAT GTGCA
 3801 CTCAG GCCTG ATTGG ACCCC TTCTG GTCTG CCACA CTAAC AACTT GAACC
 3851 CTGCT CATGG GAGAC AAGTG ACAGT ACAGG AATTT GCTCT GTTTT TCACC
 3901 ATCTT TGATG AGACC AAAAG CTGGT ACTTC ACTGA AAATA TGGAA AGAAA
 3951 CTGCA GGGCT CCCTG CAATA TCCAG ATGGA AGATC CCACT TTAA AGAGA
 4001 ATTAT CGCTT CCATG CAATC AATGG CTACA TAATG GATAC ACTAC CTGGC
 4051 TTAGT AATGG CTCAG GATCA AAGGA TTCGA TGGTA TCTGC TCAGC ATGGG
 4101 CAGCA ATGAA AACAT CCATT CTATT CATT CAGTG GACAT GTGTT CACTG

4151 TACGA AAAAA AGAGG AGTAT AAAAT GGCAC TGTAC AATCT CTATC CAGGT
 4201 GTTTT TGAGA CAGTG GAAAT GTTAC CATCC AAAGC TGGAA TTTGG CGGGT
 4251 GGAAT GCCTT ATTGG CGAGC ATCTA CATGC TGGGA TGAGC AACTT TTTC
 4301 TGGTG TACAG CAATA AGTGT CAGAC TCCCC TGGGA ATGGC TTCTG GACAC
 4351 ATTAG AGATT TTCAG ATTAC AGCTT CAGGA CAATA TGGAC AGTGG GCCCC
 4401 AAAGC TGGCC AGACT TCATT ATTCC GGATC AATCA ATGCC TGGAG CACCA
 4451 AGGAG CCCTT TTCTT GGATC AAGGT GGATC TGTG GCACC AATGA TTATT
 4501 CACGG CATCA AGACC CAGGG TGCCC GTCAG AAGTT CTCCA GCCTC TACAT
 4551 CTCTC AGTTT ATCAT CATGT ATAGT CTTGA TGGGA AGAAG TGGCA GACTT
 4601 ATCGA GGAAA TTCCA CTGGA ACCTT AATGG TCTTC TTTGG CAATG TGGAT
 4651 TCATC TGGGA TAAAA CACAA TATTT TTAAC CCTCC AATTA TTGCT CGATA
 4701 CATCC GTTG CACCC AACTC ATTAT AGCAT TCGCA GCACT CTTTC CATGG
 4751 AGTTG ATGGG CTGTG ATTTA AATAG TTGCA GCATG CCATT GGGAA TGGAG
 4801 AGTAA AGCAA TATCA GATGC ACAGA TTAAT GCTTC ATCCT ACTTT ACCAA
 4851 TATGT TTGCC ACCTG GTCTC CTTCA AAAGC TCGAC TTCAC CTCCA AGGGA
 4901 GGAGT AATGC CTGGA GACCT CAGGT GAATA ATCCA AAAGA GTGGC TGCAA
 4951 GTGGA CTTCC AGAAG ACAAT GAAAG TCACA GGAGT AACTA CTCAG GGAGT
 5001 AAAAT CTCTG CTTAC CAGCA TGTAT GTGAA GGAGT TCCTC ATCTC CAGCA
 5051 GTCAA GATGG CCATC AGTGG ACTCT CTTTT TTCAG AATGG CAAAG TAAAG
 5101 GTTTT TCAGG GAAAT CAAGA CTCCT TCACA CCTGT GGTGA ACTCT CTAGA
 5151 CCCAC CGTTA CTGAC TCGCT ACCTT CGAAT TCACC CCCAG AGTTG GGTGC
 5201 ACCAG ATTGC CCTGA GGATG GAGGT TCTGG GCTGC GAGGC ACAGG ACCTC
 5251 TACGA CAAAA CTCAC ACATG CCCAC CGTGC CCAGC TCCAG AACTC CTGGG
 5301 CGGAC CGTCA GTCTT CCTCT TCCCC CAAA ACCCA AGGAC ACCCT CATGG
 5351 CCTCC CGGAC CCCTG AGGTC ACATG CGTGG TGGTG GACGT GAGCC ACGAA
 5401 GACCC TGAGG TCAAG TTCAA CTGGT ACGTG GACGG CGTGG AGGTG CATAA
 5451 TGCCA AGACA AAGCC GCGGG AGGAG CAGTA CAACA GCACG TACCG TGTGG
 5501 TCAGC GTCCT CACCG TCCTG GCCCA GGACT GGCTG AATGG CAAGG AGTAC
 5551 AAGTG CAAGG TCTCC AACAA AGCCC TCCCA GCCCC CATCG AGAAA ACCAT
 5601 CTCCA AAGCC AAAGG GCAGC CCCGA GAACC ACAGG TGTAC ACCCT GCCCC
 5651 CATCC CGGGA TGAGC TGACC AAGAA CCAGG TCAGC CTGAC CTGCC TGGTC
 5701 AAAGG CTTCT ATCCC AGCGA CATCG CCGTG GAGTG GGAGA GCAAT GGGCA
 5751 GCCGG AGAAC AACTA CAAGA CCACG CCTCC CGTGT TGGAC TCCGA CGGCT
 5801 CCTTC TTCCT CTACA GCAAG CTCAC CGTGG ACAAG AGCAG GTGGC AGCAG
 5851 GGGAA CGTCT TCTCA TGCTC CGTGA TGCAT GAGGC TCTGC ACAAC GCCTA
 5901 CACGC AGAAG AGCCT CTCCC TGTCT CCGGG TAAAT GA

Последовательность белка FVIII 283 (FVIII169 с тройной мутацией IHH)(SEQ ID NO: 161).

```

1    MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGA VE LSWDYM QS DL GELPVDARFP
51   PRVPKSFPFN TSVVYKKT LF VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
101  DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVS YWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
151  GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
201  GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
251  HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
301  RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
351  EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
401  WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
451  TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR PYNIPHGIT
501  DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
551  YYSSFVNMER DLASGLIGPL LIC YKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
601  NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
651  HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS
701  MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDY YED SYEDISAYLL
751  SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET PGTSESATPE
801  SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG SPAGSPTSTE
851  EGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG
901  SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGTS
951  ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP TSTEEGTSTE
1001 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE SGPGTSTEPS
1051 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
1101 EDENQSPRSF QKKT RHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSV PQFK
1151 KVVVFQEFTDG SFTQPLYRGE LNEHLG LLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
1201 PYSFYSSLIS YEEDQRQGAE PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
1251 CKAWAYFSDV DLEKDVHSG L IGPLL VCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT
1301 IFDETKSWYF TENMERN CRA PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
1351 LVMAQDQRIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
1401 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC QTPLGMASGH
1451 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
1501 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
1551 SSGIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL NSCSMPLGME
1601 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
1651 VDFQKTMKVT GVTTQGVKSL LTS MYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK
1701 VFQGNQDSFT PVVNSLD PPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL
1751 YDKTHTCPPC PAPELLG GPS VLFPPKPKD TLMASRTPEV TCVVVDVSHE
1801 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL AQDWLNGKEY
1851 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV
1901 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTT PPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
1951 GNVFSCSVMH EALHNAYTQK SLSLSPGK*

```

Нуклеотидная последовательность pSYNFVIII 010-(двойная цепь FVIII_{IFc}) (SEQ ID NO: 162).

```

1   ATGCAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TGCGATTCTG
51  CTTTAGTGCC ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGA CTGTCATGGG
101 АСТАТАТGCA AAGTGATCTC GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCCT
151 CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC ACCTCAGTCG TGTACAAAAA
201 GACTCTGTTT GTAGAATTCA CGGATCACCT TTTCAACATC GCTAAGCCAA
251 GGCCACCCTG GATGGGTCTG CTAGGTCCTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
301 GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCAGTCT
351 TCATGCTGTT GGTGTATCCT ACTGGAAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG
401 ATGATCAGAC CAGTCAAAGG GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTTCCTGGT
451 GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCCTG AAAGAGAATG GTCCAATGGC
501 CTCTGACCCA CTGTGCCTTA CCTACTCATA TCTTTCTCAT GTGGACCTGG
551 TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCCTACTAGT ATGTAGAGAA
601 GGGAGTCTGG CCAAGGAAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATACTACT
651 TTTTGCTGTA TTTGATGAAG GGAAAAGTTG GCACTCAGAA ACAAAGAACT
701 CCTTGATGCA GGATAGGGAT GCTGCATCTG CTCGGGCCTG GCCTAAAATG
751 CACACAGTCA ATGGTTATGT AAACAGGTCT CTGCCAGGTC TGATTGGATG
801 CCACAGGAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGAATGGGC ACCACTCCTG
851 AAGTGCACTC AATATTCCTC GAAGGTCACA CATTTCTTGT GAGGAACCAT
901 CGCCAGGCGT CCTTGGAAAT CTCGCCAATA ACTTTCCTTA CTGCTCAAAC
951 ACTCTTGATG GACCTTGGAC AGTTTCTACT GTTTTGT CAT ATCTCTTCCC
1001 ACCAACATGA TGGCATGGAA GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG
1051 GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA GAAGCGGAAG ACTATGATGA
1101 TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT GATGACAACT
1151 CTCCTTCCTT TATCCAAATT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAAT
1201 TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT
1251 AGTCCTCGCC CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG
1301 GCCCTCAGCG GATTGGTAGG AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATA
1351 ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT ATTCAGCATG AATCAGGAAT
1401 CTTGGGACCT TACTTTATG GGGAAGTTGG AGACACACTG TTGATTATAT

```

1451 TTAAGAATCA AGCAAGCAGA CCATATAACA TCTACCCTCA CGGAATCACT
 1501 GATGTCCGTC CTTTGTATTC AAGGAGATTA CCAAAAGGTG TAAAACATTT
 1551 GAAGGATTTT CCAATTCTGC CAGGAGAAAT ATTCAAATAT AAATGGACAG
 1601 TGA CTGTAGA AGATGGGCCA ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCGC
 1651 TATTACTCTA GTTTCGTAA TATGGAGAGA GATCTAGCTT CAGGACTCAT
 1701 TGGCCCTCTC CTCATCTGCT ACAAAGAATC TG TAGATCAA AGAGGAAACC
 1751 AGATAATGTC AGACAAGAGG AATGTCATCC TGTTTCTGT ATTTGATGAG
 1801 AACCGAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTTC TCCCCAATCC
 1851 AGCTGGAGTG CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCTCC AACATCATGC
 1901 ACAGCATCAA TGGCTATGTT TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTTGTGTTG
 1951 CATGAGGTGG CATACTGGTA CATTCTAAGC ATTGGAGCAC AGACTGACTT
 2001 CCTTTCTGTC TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA ATGGTCTATG
 2051 AAGACACACT CACCCTATTC CCATTCTCAG GAGAACTGT CTCATGTGC
 2101 ATGGA AAAACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACA ACT CAGACTTTGC
 2151 GAACAGAGGC ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAACA
 2201 CTGGTGATTA TTACGAGGAC AGTTATGAAG ATATTT CAGC ATACTTGCTG
 2251 AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAAGC TTCTCTCAA ACCCACCAGT
 2301 CTTGAAACGC CATCAACGGG AAATAACTCG TACTACTCTT CAGTCAGATC
 2351 AAGAGGAAAT TGA CTATGAT GATACCATAT CAGTTGAAAT GAAGAAGGAA
 2401 GATTTTGACA TTTATGATGA GGATGAAAAT CAGAGCCCC GCAGCTTTCA
 2451 AAAGAAAACA CGACACTATT TTATTGCTGC AGTGGAGAGG CTCTGGGATT
 2501 ATGGGATGAG TAGCTCCCCA CATGTTCTAA GAAACAGGGC TCAGAGTGGC
 2551 AGTGTCCCTC AGTTCAAGAA AGTTGTTTT CAGGAATTTA CTGATGGCTC
 2601 CTTTACTCAG CCCTTATACC GTGGAGAACT AAATGAACAT TTGGGACTCC
 2651 TGGGGCCATA TATAAGAGCA GAAGTTGAAG ATAATATCAT GGTA ACTTTC
 2701 AGAAATCAGG CCTCTCGTCC CTATTCCTTC TATTCTAGCC TTATTTCTTA
 2751 TGAGGAAGAT CAGAGGCAAG GAGCAGAACC TAGAAAAAAC TTTGTCAAGC
 2801 CTAATGAAAC CAAA ACTTAC TTTTGGAAG TGCAACATCA TATGGCACCC
 2851 ACTAAAGATG AGTTTGACTG CAAAGCCTGG GCTTATTTCT CTGATGTTGA
 2901 CCTGGA AAAA GATGTGCACT CAGGCCTGAT TGGACCCCTT CTGGTCTGCC
 2951 AACTAACAC ACTGAACCCT GCTCATGGGA GACAAGTGAC AGTACAGGAA
 3001 TTTGCTCTGT TTTTACCAT CTTTGATGAG ACCAAAAGCT GGTACTTCAC
 3051 TGAAAATATG GAAAGAACT GCAGGGCTCC CTGCAATATC CAGATGGAAG
 3101 ATCCCACTTT TAAAGAGAAT TATCGCTTCC ATGCAATCAA TGGCTACATA
 3151 ATGGATACAC TACCTGGCTT AGTAATGGCT CAGGATCAAA GGATTCGATG
 3201 GTATCTGCTC AGCATGGGCA GCAATGAAAA CATCCATTCT ATTCATTTC
 3251 GTGGACATGT GTTCACTGTA CGAAAAAAG AGGAGTATAA AATGGCACTG
 3301 TACAATCTCT ATCCAGGTGT TTTTGAGACA GTGGAAATGT TACCATCCAA

3351 AGCTGGAATT TGGCGGGTGG AATGCCTTAT TGGCGAGCAT CTACATGCTG
 3401 GGATGAGCAC ACTTTTTCTG GTGTACAGCA ATAAGTGTCA GACTCCCCTG
 3451 GGAATGGCTT CTGGACACAT TAGAGATTTT CAGATTACAG CTTCAGGACA
 3501 ATATGGACAG TGGGCCCCAA AGCTGGCCAG ACTTCATTAT TCCGGATCAA
 3551 TCAATGCCTG GAGCACCAAG GAGCCCTTTT CTTGGATCAA GGTGGATCTG
 3601 TTGGCACCAA TGATTATTCA CGGCATCAAG ACCCAGGGTG CCCGTCAGAA
 3651 GTTCTCCAGC CTCTACATCT CTCAGTTTAT CATCATGTAT AGTCTTGATG
 3701 GGAAGAAGTG GCAGACTTAT CGAGGAAATT CCACTGGAAC CTTAATGGTC
 3751 TTCTTTGGCA ATGTGGATTC ATCTGGGATA AAACACAATA TTTTAAACCC
 3801 TCCAATTATT GCTCGATACA TCCGTTTGCA CCCAACTCAT TATAGCATTG
 3851 GCAGCACTCT TCGCATGGAG TTGATGGGCT GTGATTTAAA TAGTTGCAGC
 3901 ATGCCATTGG GAATGGAGAG TAAAGCAATA TCAGATGCAC AGATTACTGC
 3951 TTCATCCTAC TTTACCAATA TGTTTGCCAC CTGGTCTCCT TCAAAAGCTC
 4001 GACTTCACCT CCAAGGGAGG AGTAATGCCT GGAGACCTCA GGTGAATAAT
 4051 CCAAAAGAGT GGCTGCAAGT GGAATTCCAG AAGACAATGA AAGTCACAGG
 4101 AGTAACTACT CAGGGAGTAA AATCTCTGCT TACCAGCATG TATGTGAAGG
 4151 AGTTCCTCAT CTCCAGCAGT CAAGATGGCC ATCAGTGGAC TCTCTTTTTT
 4201 CAGAATGGCA AAGTAAAGGT TTTTCAGGGA AATCAAGACT CCTTCACACC
 4251 TGTGGTGAAC TCTCTAGACC CACCGTTACT GACTCGCTAC CTTCGAATTC
 4301 ACCCCCAGAG TTGGGTGCAC CAGATTGCCC TGAGGATGGA GGTCTGGGC
 4351 TGCGAGGCAC AGGACCTCTA CGACAAAAC CACACATGCC CACCGTGCCC
 4401 AGCTCCAGAA CTCCTGGGCG GACCGTCAGT CTTCTCTTC CCCCCAAAAC
 4451 CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG
 4501 GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA
 4551 CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA
 4601 ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG
 4651 CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC
 4701 CCCCATCGAG AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC
 4751 AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGATG AGCTGACCAA GAACCAGGTC
 4801 AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGTGGA
 4851 GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCCTCCCG
 4901 TGTTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC
 4951 AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA
 5001 GGCTCTGCAC AACCCTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA
 5051 AATGA

Последовательность белка pSYNFVIII 010-(двойная цепь FVIII Fc) (SEQ ID NO: 163).

```

1      MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGA VE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
51     PRVPKSF PFN TSVVYK KTLF VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
101    DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKA SEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
151    GSHTYVWQVL KENGP MASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
201    GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
251    HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
301    RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
351    EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
401    WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
451    TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR PYNIPHGIT
501    DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
551    YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
601    NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
651    HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MUYEDTLTLF PFSGETVFMS
701    MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDY YED SYEDISAYLL
751    SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQREITRTTL QSDQEEIDYD DTISVEMKKE
801    DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAA VER LWDYGMSSSP HVLNRNAQSG
851    SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
901    RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEP RKN FVKPNETKTY FWKVQH HMAP
951    TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
1001   FALFFTIFDE TKS WYFTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
1051   MDTLPLGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYK MAL
1101   YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
1151   GMASGHIRDF QITASGQYGQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
1201   LAPMIIHGIK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
1251   FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
1301   MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
1351   PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
1401   QNGKVKVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
1451   CEAQDLYDKT HTPPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
1501   VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
1551   LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
1601   SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDS DGS FFLYSKLTVD
1651   KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

```

Последовательность белка FVIII195 (двойная цепь FVIIIc с двумя 144 АЕ ХТЕНs в аминокислоте 1656 и 1900) (SEO ID NO: 73).

```

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGA VE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
51  PRVPKSF PFN TSVVYKKT LF VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVS YWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFP G
151 GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
251 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
401 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR PYNIPHGIT
501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
601 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS
701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDY YED SYEDISAYLL
751 SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQREITRTTL QGAPGTPGSG TASSSPGASP
801 GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
851 TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSTPSGA
901 TGSPGSSTPS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SSDQEEIDYD DTISVEMKKE
951 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLNRNAQSG
1001 SVPQFKKVV F QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
1051 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEP RKN FVKPNETKTY FWKVQH HMAP
1101 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
1151 FALFFTIFDE TKS WYFTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG SEPATSGSET
1201 PGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG
1251 TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGSP TSTEEGSPAG SPTSTEEGTS
1301 ESATPESGPG TSTEPSEGS A PGASSAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
1351 MDTLPGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYK MAL
1401 YNLYPGVFET VEMPLSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
1451 GMASGHIRDF QITASGQY GQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
1501 LAPMIIHG I K TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
1551 FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
1601 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
1651 PKEWLQVDFQ KTMKVTVGTT QGVKSLLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
1701 QNGKV KVFQ G NQDSFTP VVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
1751 CEAQDLYDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
1801 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
1851 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
1901 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDS DGS FFLYSKLTVD
1951 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

```

Последовательность зрелого белка pSYN-FVIII-173 (SEQ ID NO: 72).

1 ATRRYYLGAVALSWDYMQSD LGELPVDARF PPRVPKSFPF NTSVVYKCTL
 51 FVEFTDHLFN IAKPRPPWMG LLGPTIQAEV YDTVVITLKN MASHPVSLHA
 101 VGVSYWKASE GAEYDDQTSQ REKEDDKVFP GGSHTYVWQV LKENGPMASD
 151 PLCLTYSYLS HVDLVKDLNS GLIGALLVCR EGSLAKEKTQ TLHKFILLFA
 201 VFDEGKSWHS ETKNSLMQDR DAASARAWPK MHTVNGYVNR SLPGLIGCHR
 251 KSVYWHVIGM GTTPEVHSIF LEGHTFLVRN HRQASLEISP ITFLTAQTLL
 301 MDLGQFLLFC HISSHQHDGM EAYVKVDSCP EEPQLRMKNN EEAEDYDDDL
 351 TDSEMDVVRV DDDNSPSFIQ IRSAKKHPK TWVHYIAAEE EDWDYAPLVL
 401 APDDRSYKSQ YLNNGPQRIG RKYKKVRFMA YTDETFKTRE AIQHESGILG
 451 PLYGEVGDV LLIIFKNQAS RPYNIYPHGI TDVRPLYSRR LPKGVKHLKD
 501 FPLPGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYYSSFVNME RDLASGLIGP
 551 LLICYKESVD QRGNQIMSDK RNVILFSVFD ENRSWYLLEN IQRFLPNPAG
 601 VQLEDPEFQA SNIMHSINGY VFDSLQLSVC LHEVAYWYIL SIGAQTDFLS
 651 VFFSGYTFKH KVMYEDTLTL PPFSGETVFM SMENPGLWIL GCHNSDFRNR
 701 GMTALLKVSS CDKNTGDYEE DSYEDISAYL LSKNNAIEPR SFSQNGAPGT
 751 SESATPESGP GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPGTSE
 801 SATPESGPGT STEPSEGSAP GSPAGSPTST EEGTSESATP ESGPGSEPAT
 851 SGSETPGTSE SATPESGPGS PAGSPTSTEE GSPAGSPTST EEGTSTEPSE
 901 GSAPGTSESA TPESGPGTSE SATPESGPGT SESATPESGP GSEPATSGSE
 951 TPGSEPATSG SETPGSPAGS PTSTEEGTST EPSEGSAPGT STEPSEGSAP
 1001 GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGTSTEP SEGSAPASSP PVLKRHQREI
 1051 TRTTLQSDQE EIDYDDTISV EMKKEDFDIY DEDENQSPRS FQKKTRHYFI
 1101 AAVERLWDYG MSSSPHVLNR RAQSGSVQPF KKVVFQEFTD GSFTQPLYRG
 1151 ELNEHLGLLG PYIRAEVEDN IMVTFRNQAS RPYSFYSSLI SYEEDQRQGA
 1201 EPRKNFVKPN ETKTYFWKVQ HHMAPTKDEF DCKAWAYFSD VDLEKDVHSG
 1251 LIGPLLVCHT NTLNPAHGRQ VTVQEFALFF TIFDETKSWY FTENMERNCR
 1301 APCNIQMEDP TFKENYRFHA INGYIMDTLP GLVMAQDQRI RWYLLSMGSN
 1351 ENIHSIHFSG HVFTVRKKEE YKMALYNLYP GVFEVTEMLP SKAGIWRVEC
 1401 LIGEHLHAGM STLFLVYSNK CQTPLGMASG HIRDFQITAS GQYQGWAPKL
 1451 ARLHYSGSIN AWSTKEPFSW IKVDLLAPMI IHGIKTQGAR QKFSSLYISQ
 1501 FIIMYSLDGK KWQTYRGNST GTLMVFFGNV DSSGIKHNI NPPIIARYIR
 1551 LHPTHYSIRS TLRMELMGCD LNSCSMPLGM ESKAISDAQI TASSYFTNMF
 1601 ATWSPSKARL HLQGRSNAWR PQVNNPKEWL QVDFQKTMKV TGVTTQGVKS
 1651 LLTSMYVKEF LISSSQDGHQ WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF TPVVNSLDPP
 1701 LLTRYLRIHP QSWVHQIALR MEVLGCEAQD LYDKTHTCPP CPAPELLGGP
 1751 SVFLFPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK
 1801 TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
 1851 AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
 1901 NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVH HEALHNHYTQ
 1951 KSLSLSPGK

Последовательность белка FVIII196 (двойная цепь FVIII_{FC} с тремя 144 АЕ ХТЕНs в аминокислоте 26, 1656 и 1900) (SEO ID NO: 74).

```

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL GELPVGAPGS
51 SPSASTGTGP GSSPSASTGT GPGASPGTSS TGSPGASPGT SSTGSPGSST
101 PSGATGSPGS SPSASTGTGP GASPGTSSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
151 TASSSPGSST PSGATGSPGS STPSGATGSP GASPGTSSTG SPASSDARFP
201 PRVPKSPFPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
251 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
301 GSHTYVWQVL KENGPMA SDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
351 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
401 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
451 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
501 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
551 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
601 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDLE LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
651 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
701 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
751 NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
801 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEDTLTLF PFSGETVFMS
851 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYYED SYEDISAYLL
901 SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQREITRTTL QGAPGTPGSG TASSSPGASP
951 GTSSTGSPGA SPGTSTGSP GASPGTSSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
1001 TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSTGSP GASPGTSSTG SPGSSTPSGA
1051 TGSPGSSTPS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SSDQEEIDYD DTISVEMKKE
1101 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLNRNRAQS
1151 SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
1201 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY FWKVQHMAP
1251 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSLGIGPL LVCHTNLNP AHGRQVTVQE
1301 FALFFTIFDE TKSIFYTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG SEPATSGSET
1351 PGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG
1401 TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGSP TSTEEGSPAG SPTSTEEGTS
1451 ESATPESGPG TSTEPSEGA PGASSAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
1501 MDTLPGLVMA QDQIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL
1551 YNLYPGVFET VEMPLSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
1601 GMASGHIRDF QITASGQYGQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
1651 LAPMIIHGIK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
1701 FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
1751 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
1801 PKEWLQVDFQ KTMKVTVGTT QGVKSLLTSM YVKEFLISSS QDGHQWTLFF
1851 QNGKVKVVFQ NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
1901 CEAQDLYDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
1951 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
2001 LNGKEYKCKV SNKALPAIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
2051 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD
2101 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

```

Последовательность белка FVIII199 (одноцепочечный FVIII_{FC} с тремя 144 АЕ ХТЕНs в аминокислоте 1656 и 1900) (SEQ ID NO: 75).

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
51 PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
151 GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
251 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHFTFLVRNH
301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
401 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR PYNIPYHGIT
501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
601 NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEDTLTLF PFSGETVFMS
701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYYED SYEDISAYLL
751 SKNNAIEPRS FSQNPVLRK HQAEITRTTL QGAPGTPGSG TASSSPGASP
801 GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
851 TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSTPSGA
901 TGSPGSSTPS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SSDQEEIDYD DTISVEMKKE
951 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLNRNAQSG
1001 SVPQFKKVVV QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
1051 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY FWKVQHHPAP
1101 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGGLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
1151 FALFFTIFDE TKSIFYTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG SEPATSGSET
1201 PGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG
1251 TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGSP TSTEEGSPAG SPTSTEEGTS
1301 ESATPESGPG TSTEPSEGA PGASSAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
1351 MDTLPLVMA QDQIRRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAI
1401 YNLYPGVFET VEMPLSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
1451 GMASGHIRDF QITASGQYQG WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
1501 LAPMIIHGIK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
1551 FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
1601 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
1651 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTI QGVKSLLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
1701 QNGKVKVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
1751 CEAQDLYDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
1801 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVTLVLHQDW
1851 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
1901 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGDS FFLYSKLTVD
1951 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

Последовательность белка FVIII 201 (одноцепочечный FVIIIc с тремя 144 АЕ XTENs в аминокислоте 26, 1656 & 1900) (SEO ID NO: 76).

```

1    MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL GELPVGAPGS
51   SPSASTGTGP GSSPSASTGT GPGASPGTSS TGSPGASPGT SSTGSPGSST
101  PSGATGSPGS SPSASTGTGP GASPGTSSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
151  TASSSPGSST PSGATGSPGS STPSGATGSP GASPGTSSTG SPASSDARFP
201  PRVPKSFPPN TSVVYKKTFL VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
251  DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
301  GSHTYVWQVL KENGPMA SDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
351  GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
401  HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
451  RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
501  EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
551  WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
601  TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR PYNIPHGIT
651  DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
701  YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
751  NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
801  HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FSGYTFKHK MVEYEDTLTLF PFSGETVFMS
851  MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
901  SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQAEITR TTL QGAPGTPGSG TASSSPGASP
951  GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
1001 TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSTPSGA
1051 TGSPGSSTPS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SSDQEEIDYD DTISVEMKKE
1101 DFDIYDE DEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLNRNAQSG
1151 SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
1201 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEP RKN FVKPNETKTY FWKVQH HMAP
1251 TKDEFDC KAW AYFSDVDLEK DVHSG LIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
1301 FALFFTIFDE TKS WYFTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG SEPATSGSET
1351 PGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG
1401 TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGSP TSTEEGSPAG SPTSTEEGTS
1451 ESATPESGPG TSTEPSEGS A PGASSAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
1501 MDTLPGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL
1551 YNLYPGVFET VEMPLSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
1601 GMASGHIRDF QITASGQYQG WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
1651 LAPMIIHG IK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
1701 FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
1751 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
1801 PKEWLQVDFQ KTMKVTVGTT QGVKSLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
1851 QNGKVKVVFQ NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
1901 CEAQDL YDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
1951 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
2001 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
2051 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDS DGS FFLYSKLTVD
2101 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

```

Последовательность белка FVIII 203 (одноцепочечный FVIII_{FC} с двумя AE XTENs; одним 288AE XTEN в домене В и одним 144 AE XTEN в аминокислоте 1900) (SEQ ID NO: 77).

```

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

Последовательность белка FVIII 204 (одноцепочечный FVIII_{Fc} с двумя AE XTENs; одним 288AE XTEN в домене В и одним 144 AE XTEN в аминокислоте 403) (SEQ ID NO: 78).

```

1    MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
51   PRVPKSFPPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
101  DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
151  GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
201  GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
251  HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
301  RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
351  EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
401  WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDGAPTSTEP SEGSA PGSPA GSPTSTEEGT
451  STEPSEGSA PGSTEPSEGS APGTSESATP ESGPGTSTEP SEGSA PGTSE
501  SATPESGPGS EPATSGSETP GTSTEPSEGS APGTSTEPSE GSAPGTSESA
551  TPESGPGTSE SATPESGPGA SSDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
601  TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDLE LIIFKNQASR PYNIPHGIT
651  DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
701  YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
751  NRSWYLTEIN QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
801  HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS
851  MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYDYE SYEDISAYLL
901  SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET PGTSESATPE
951  SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSA PG SPAGSPTSTE
1001 EGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG
1051 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGTS
1101 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP TSTEEGTSTE
1151 PSEGSA PGTS TEPSEGSA PG SEPATSGSET PGTSESATPE SGPGTSTEPS
1201 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
1251 EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVPPQF
1301 KVVVFQFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
1351 PYSFYSSLIS YEEDQRQGA EPRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
1401 CKAWAYFSDV DLEKDVHSLG IGPLLVCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT
1451 IFDETKSWYF TENMERN CRA PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
1501 LVMAQDQRI R WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
1551 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC QTPLGMASGH
1601 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
1651 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
1701 SSGIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL NSCSMPLGME
1751 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
1801 VDFQKTMKVT GVTTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK
1851 VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL
1901 YDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
1951 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
2001 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDEL TKNQVSLTCLV
2051 KGFYPSDIAV EWESNGQPN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
2101 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*

```

Последовательность белка FVIII 205 (одноцепочечный FVIII_{Fc} с двумя АЕ XTENs; одним 288АЕ XTEN в домене В и одним 144 АЕ XTEN в аминокислоте 18) (SEQ ID NO: 79).

```

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

```

Последовательность белка pSYN FVIII 266 (FVIII Fc с 42 AE-XTEN в аминокислоте 18 и 288 AE XTEN в домене B) SEO ID NO: 80).

```

1    MQIELSTCFF LCLLRFCSA TRYYLGAVE LSWDYMQGAP GSPAGSPTST
51   EEGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPASSS DLGELPVDAR FPPRPVKSFP
101  FNTSVVYKKT LFVEFTDHLF NIAKPRPPWM GLLGPTIQAE VYDTVVITLK
151  NMASHPVSLH AVGVSYWKAS EGAEYDDQTS QREKEDDKVF PGGSHTYVWQ
201  VLKENGPMAS DPLCLTYSYL SHVDLVKDLN SGLIGALLVC REGSLAKEKT
251  QTLHKFILLF AVFDEGKSWH SETKNSLMQD RDAASARAWP KMHTVNGYVN
301  RSLPGLIGCH RKSVMYWHVIG MGTTPEVHSI FLEGHTFLVR NHRQASLEIS
351  PITFLTAQTL LMDLGQFLF CHISSHQHDG MEAYVKVDSC PEEPQLRMKN
401  NEEAEDYDDD LTDSEMDVVR FDDDNPSFI QIRSVAKKHP KTWVHYIAAE
451  EEDWDYAPLV LAPDDRSYKS QYLNNGPQRI GRKYKKVRFM AYTDETFKTR
501  EAIQHESGIL GPLLYGEVGD TLLIIFKNQA SRPYNIYPHG ITDVRPLYSR
551  RLPKGVKHLK DFPILPGEIF KYKWTVTVED GPTKSDPRCL TRYYSFVNM
601  ERDLASGLIG PLLICYKESV DQRGNQIMSD KRNVLFSVF DENRSWYLTE
651  NIQRFLPNPA GVQLEDPEFQ ASNIMHSING YVFDLQLSV CLHEVAYWYI
701  LSIGAQTDFL SVFFSGYTFK HKMVYEDTLT LFPFSGETVF MSMENPGLWI
751  LGCHNSDFRN RGMTALLKVS SCDKNTGDYY EDSYEDISAY LLSKNNAIEP
801  RSFSQNGAPG TSESATPESG PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA
851  TSGSETPGTS ESATPESGPG TSTEPSEGS A PGSPAGSPTS TEEGTSESAT
901  PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG SPAGSPTSTE EGSPAGSPTS
951  TEEGTSTEPS EGSAPGTSES ATPESGPGTS ESATPESGPG TSESATPESG
1001 PGSEPATSGS ETPGSEPATSGS GSETPGSPAG SPTSTEEGTS TEPSEGSAPG
1051 TSTEPSEGS A PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGTSTE PSEGSAPASS
1101 PPVLKRHQAE ITRTTLQSDQ EEIDYDDTIS VEMKKEDFDI YDEDENQSPR
1151 SFQKKTRHYF IAAVERLWDY GMSSSPHVLN NRAQSGSV PQ FKKVVVFQEFT
1201 DGSFTQPLYR GELNEHLGLL GPYIRAEVED NIMVTFRNQA SRPYSFYSSL
1251 ISYEEDQRQG AEPRKNFVKP NETKTYFWKV QHHMAPTKDE FDCKAWAYFS
1301 DVDLEKDVHS GLIGPLLCH TNTLNPAHGR QVTVQEFALF FTIFDETKSW
1351 YFTENMERN C RAPCNQMED PTFKENYRFH AINGYIMDTL PGLVMAQDQR
1401 IRWYLLSMGS NENIHSIHFS GHVFTVRKKE EYKMALYNLY PGVFETVEML
1451 PSKAGIWRVE CLIGEHLHAG MSTLFLVYSN KCQTPLGMAS GHIRDFQITA
1501 SGQYQGWAPK LARLHYS GSI NAWSTKEPFS WIKVDLLAPM IIHGIKTQGA
1551 RQKFSSLYIS QFIIMYSLDG KKWQTYRGNS TGTLMVFFGN VDSSGIKHNI
1601 FNPPIIARYI RLHPHTYSIR STLRMELMGC DLNSCSMPLG MESKAISDAQ
1651 ITASSYFTNM FATWSPSKAR LHLQGRSNAW RPQVNNPK EW LQVDFQKTMK
1701 VTGVTTQGVK SLLTSMYVKE FLISSSQDGH QWTLFFQNGK VKVFQGNQDS
1751 FTPVVNSLDP PLLTRYLRH PQSWVHQIAL RMEVLGCEAQ DLYDKTHTCP
1801 PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
1851 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKKVSNKA
1901 LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
1951 AVEWESNGQP ENNYKTPPV LQSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV
2001 MHEALHNHYT QKSLSLSPGK *
```

Последовательность белка pSYN FVIII 267 (FVIII Fc с 72 AE-XTEN в аминокислоте 18 и 288 AE XTEN в домене B) SEQ ID NO: 81).

```

1    MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQGAP TSESATPESG
51   PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
101  TSTEPSEGS A PGASSSDLGE LPVDARFPPR VPKSFPFNTS VVYKKTLFVE
151  FTDHLFNIAK PRPPWMGLLG PTIQAEVYDT VVITLKNMAS HPVSLHAVGV
201  SYWKASEGAE YDDQTSQREK EDDKVFPGGG HTYVWQVLKE NGPMASDPLC
251  LTYSYLSHVD LVKDLNSGLI GALLVCREGS LAKEKTQTLH KFIILLFAVFD
301  EGKSWHSETK NSLMQDRDAA SARAWPKMHT VNGYVNRSLP GLIGCHRKSV
351  YWHVIGMGTT PEVHSIFLEG HTFLVRNHRQ ASLEISPITF LTAQTLLMDL
401  GQFLLFCHIS SHQHDGMEAY VKVDSCPEEP QLRMKNNEEA EDYDDDLTDS
451  EMDVVRFDDD NSPSFIQIRS VAKKHPKTWV HYIAAEEEDW DYAPLV LAPD
501  DRSYKSQYLN NGPQRIGRKY KKVRFMAYTD ETFKTREAIQ HESGILGPLL
551  YGEVGDITLL IFKNQASRPY NIYPHGITDV RPLYSRRLPK GVKHLKDFPI
601  LPGEIFKYKW TVTVEDGPTK SDPRCLTRY Y SSFVNMERDL ASGLIGPLLI
651  CYKESVDQRG NQIMSDKRN V ILFSVFDENR SWYLTENIQR FLPNPAGVQL
701  EDPEFQASNI MHSINGYVFD SLQLSVCLHE VAYWYILSIG AQTDFLSVFF
751  SGYTFKHK MV YEDTLTLFPF SGETVFMSME NPGLWILGCH NSDFRNRGMT
801  ALLKVSSCDK NTGDYYEDSY EDISAYLLSK NNAIEPRSFS QNGAPGTSES
851  ATPESGPGSE PATSGSETPG TSESATPESG PGSEPATSGS ETPGTSESAT
901  PESGPGTSTE PSEGAPGSP AGSPTSTEEG TSESATPESG PGSEPATSGS
951  ETPGTSESAT PESGPGSPAG SPTSTEEGSP AGSPTSTEEG TSTEPSEGS A
1001 PGTSESATPE SGPSTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGSE PATSGSETPG
1051 SEPATSGSET PGSPAGSPTS TEEGTSTEPS EGSAPGTSTE PSEGAPGSE
1101 PATSGSETPG TSESATPESG PGTSTEPSEG SAPASSPPVL KRHQAEITRT
1151 TLQSDQEEID YDDTISVEMK KEDFDIYDED ENQSPRSFQK KTRHYFIAAV
1201 ERLWDYGMSS SPHVLRNRAQ SGSPVQFKKV VFQEFTDGSF TQPLYRGELN
1251 EHLGLLGPYI RAEVEDNIMV TFRNQASRPY SFYSSLISYE EDQRQGAEP R
1301 KNFVKPNETK TYFWKVQH HM APTKDEFDCK AWAYFSDVDL EKDVHSGLIG
1351 PLLVCHTNL NPAHGRQVTV QEFALFFTIF DETKSWYFTE NMERNCRAPC
1401 NIQMEDPTFK ENYRFHAING YIMDTLPGLV MAQDQRIRWY LLSMGSNENI
1451 HSIHFSGHVF TVRKKEEYKM ALYNLYPGVF ETVEMLPSKA GIWRVECLIG
1501 EHLHAGMSTL FLVYSNKCQT PLGMASGHIR DFQITASGQY GQWAPKLARL
1551 HYSGSINAW S TKEPFSWIKV DLLAPMIIHG IKTQGARQKF SSLYISQFII
1601 MYSLDGKKWQ TYRGNSTGTL MVFFGNVDSS GIKHNIFNPP IIARYIRLHP
1651 THYSIRSTLR MELMGCDLNS CSMP LGMESK AISDAQITAS SYFTNM FATW
1701 SPSKARLHLQ GRSNAWRPQV NNPKEWLQVD FQKTMKVTGV TTQGVKSLLT
1751 SMYVKEFLIS SSQDGHQWTL FFQNGKV KVF QGNQDSFTPV VNSLDPPLLT
1801 RYLRIHPQSW VHQIALRMEV LGCEAQDLYD KTHTCP PCPA PELLGGPSVF
1851 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
1901 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKALPAP IEKTISKAKG
1951 QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY
2001 KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSV MHEA LHNHYTQKSL
2051 SLSPGK*

```

Последовательность белка pSYN FVIII 268 (FVIII Fc с 144 AE-XTEN в аминокислоте 18) SEQ ID NO: 82).

```

1    MQIELSTCFF LCLLRCFSA TRYYLGAVE LSWDYMQGAP TSESATPESG
51   PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
101  TSTEPSEGS A PGSPAGSPTS TEEGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS
151  ESATPESGPG SPAGSPTSTE EGSPAGSPTS TEEGASSSDL GELPVDARFP
201  PRVPKSF PFN TSVVYKTLF VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
251  DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKA SEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
301  GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
351  GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
401  HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TPEVHSIFL EGHTFLVRNH
451  RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
501  EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
551  WVHYIAEEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
601  TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
651  DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
701  YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
751  NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
801  HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS
851  MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDY YED SYEDISAYLL
901  SKNNAIEPRS FSQNPVLKR HQAEITR TTL QSDQEEIDYD DTISVEMKKE
951  DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLRNRAQSG
1001 SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
1051 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEP RKN FVKPNETKTY FWKVQH HMAP
1101 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTN TLNP AHGRQVTVQE
1151 FALFFTIFDE TKS WYFTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
1201 MDTLPGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL
1251 YNLYPGVFET VEMLP SKAGI WRVECLIGE H LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
1301 GMASGHIRDF QITASGQYGQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
1351 LAPMIIHG I K TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
1401 FFGNV DSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHP TH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
1451 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
1501 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
1551 QNGKV KVFQG NQDSFTP VVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
1601 CEAQDLYDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
1651 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHN AKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
1701 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
1751 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDS DGS FFLYSKLTVD
1801 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

```

Последовательность белка pSYN FVIII 269 (FVIII Fc с 72 AE-XTEN в аминокислоте 18) SEQ ID NO: 83).

```

1    MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQGAP TSESATPESG
51   PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
101  TSTEPSEGS A PGASSSDLGE LPVDARFPPR VPKSFPEFNTS VVYKKTLEVE
151  FTDHLFNI AK PRPPWMGLLG PTIQAEVYDT VVITLKNMAS HPVSLHAVGV
201  SYWKASEGAE YDDQTSQREK EDDKVFPFGS HTYVWQVLKE NGPMASDPLC
251  LTYSYLSHVD LVKDLNSGLI GALLVCREGS LAKEKTQTLH KFI LLFAVFD
301  EGKSWHSETK NSLMQDRDAA SARAWPKMHT VNGYVNRSLP GLIGCHRKSV
351  YWHVIGMGTT PEVHSIFLEG HTFLVRNHRQ ASLEISPITF LTAQTLLMDL
401  GQFLLFCHIS SHQHDGMEAY VKVDSCPEEP QLRMKNNEEA EDYDDDLTDS
451  EMDVVRFD DD NSPSFIQIRS VAKKHPKTWV HYIAAEEEDW DYAPLV LAPD
501  DRSYKSQYLN NGPQRIGRKY KKVRFMAYTD ETFKTREAIQ HESGILGPLL
551  YGEVGD TLLI IFKNQASRPY NIYPHGITDV RPLYSRRLPK GVKHLKDFPI
601  LPGEIFKYKW TVTVEDGPTK SDRPCLTRY Y SSFVNMERDL ASGLIGPLLI
651  CYKESVDQRG NQIMSDKRN V ILFSVFDENR SWYL TENIQR FLPNPAGVQL
701  EDPEFQASNI MHSINGYVFD SLQLSVCLHE VAYWYILSIG AQTD FLSVFF
751  SGYTFKH KMV YEDTLTLFPF SGETVFM SME NPGLWILGCH NSDFRNRGMT
801  ALLKVSSCDK NTGDYYEDSY EDISAYLLSK NNAIEPRSF S QNPPVLKR HQ
851  AEITRTTLQS DQEEIDYDDT ISVEMKKEDF DIYDE DENQS PRSFQKKTRH
901  YFIAAVERLW DYGMSSSPHV LRNRAQSGSV PQFKKVVFQE FTDGSFTQPL
951  YRGELNEHLG LLGPYIRAEV EDNIMVTFRN QASRPYSFYS SLISYEEDQR
1001 QGAEPKRN FV KPNETKTYFW KVQH HMAPTK DEFDC KAWAY FSDVDLEKDV
1051 HSGLIGPLLV CHTNTLNPAH GRQVTVQEFA LFFTIFDETK SWYFTENMER
1101 NCRAPCNIQM EDPTFKENYR FHAINGYIMD TLPGLVMAQD QRIRWYLLSM
1151 GSNENIHSIH FSGHVFTVRK KEEYK MALYN LYPGVFETVE MLPSKAGIWR
1201 VECLIGEHLH AGMSTLFLVY SNKCQTPLGM ASGHIRDFQI TASGQYGQWA
1251 PKLARLHYS G SINAWSTKEP FSWIKVDLLA PMIIHGIKTQ GARQKFSSLY
1301 ISQFIIMYSL DGKKWQTYRG NSTGTLMVFF GNVDS SGIKH NIFNPPIAR
1351 YIRLHPHYS IRSTLRMELM GCDLNSCSMP LGMESKAISD AQITASSYFT
1401 NMFATWSPSK ARLHLQGRSN AWRPQVNNPK EWLQVDFQKT MKVTGVT TQG
1451 VKSLLTSMYV KEFLISSQD GHQWTLFFQN GKVKVFQGNQ DSFTPVVNSL
1501 DPPLLTRYLR IHPQSWVHQI ALRMEVLGCE AQDLYDKTHT CPPCPAPELL
1551 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH
1601 NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT
1651 ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG
1701 QPENNYKTTP PVLDS DGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH
1751 YTKSLSLSP GK*

```

Последовательность белка pSYN FVIII 271 (FVIII Fc с 42 AE-XTEN в аминокислоте 18) SEO ID NO: 84).

```

1    MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAVE LSWDYMQGAP GSPAGSPTST
51   EEGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPASSS DLGELPVDAR FPPRPVKSFP
101  FNTSVVYKKT LFVEFTDHLF NIAKPRPPWM GLLGPTIQAE VYDTVVITLK
151  NMASHPVSLH AVGVSYWKAS EGAEYDDQTS QREKEDDKVF PGGSHTYVWQ
201  VLKENGPMAS DPLCLTYSYL SHVDLVKDLN SGLIGALLVC REGSLAKEKT
251  QTLHKFILLF AVFDEGKSWH SETKNSLMQD RDAASARAWP KMHTVNGYVN
301  RSLPGLIGCH RKSIVYWHVIG MGTTPEVHSI FLEGHTFLVR NHRQASLEIS
351  PITFLTAQTL LMDLGQFLLF CHISSHQHDG MEAYVKVDSC PEEPQLRMKN
401  NEEAEDYDDD LTDSEMDVVR FDDDNSPSFI QIRSVAKKHP KTWVHYIAAE
451  EEDWDYAPLV LAPDDRSYKS QYLNNGPQRI GRKYKKVRFM AYTDETFKTR
501  EAIQHESGIL GPLLYGEVGD TLLIIFKNQA SRPYNIYPHG ITDVRPLYSR
551  RLPKGVKHLK DFPILPGEIF KYKWTVTVED GPTKSDPRCL TRYYSFVNM
601  ERDLASGLIG PLLICYKESV DQRGNQIMSD KRNVLFSVF DENRSWYLTE
651  NIQRFLPNPA GVQLEDPEFQ ASNIMHSING YVFDLQLSV CLHEVAYWYI
701  LSIGAQTDFL SVFFSGYTFK HKMVYEDTLT LFPFSGETVF MSMENPGLWI
751  LGCHNSDFRN RGMTALLKVS SCDKNTGDYY EDSYEDISAY LLSKNNAIEP
801  RSFSQNPPVL KRHQAEITRT TLQSDQEEID YDDTISVEMK KEDFDIYDED
851  ENQSPRSFQK KTRHYFIAAV ERLWDYGMSS SPHVLNRNAQ SGSVPQFKKV
901  VFQEFTDGSF TQPLYRGELN EHLGLLGPIY RAEVEDNIMV TFRNQASRPY
951  SFYSSLISYE EDQRQGAEPK KNFVKPNETK TYFWKVQHMM APTKDEFDCK
1001 AWAYFSDVDL EKDVHSGDIG PLLVCHTNL NPAHGRQVTV QEFALFFTIF
1051 DETKSWYFTE NMERNCRAPC NIQMEDPTFK ENYRFHAING YIMDTLPGLV
1101 MAQDQRIRWY LLSMGSNENI HSIHFSGHVF TVRKKEEYKM ALYNLYPGVF
1151 ETVEMLPSKA GIWRVECLIG EHLHAGMSTL FLVYSNKCQT PLGMASGHIR
1201 DFQITASGQY GQWAPKLARL HYSGSINAW SKEPFSEWIKV DLLAPMIIHG
1251 IKTQGARQKF SSYISQFII MYSLDGKKWQ TYRGNSTGTL MVFFGNVDSS
1301 GIKHNIFNPP IIARYIRLHP THYSIRSTLR MELMGCDLNS CSMPPLGMESK
1351 AISDAQITAS SYFTNMFATW SPSKARLHLQ GRSNAWRPQV NNPKEWLQVD
1401 FQKTMKVTGV TTQGVKSLLT SMYVKEFLIS SSQDGHQWTL FFQNGKVVKV
1451 QGNQDSFTPV VNSLDPPLLT RYLRIHPQSW VHQIALRMEV LGCEAQDLYD
1501 KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
1551 EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
1601 KVSINKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG
1651 FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTHPPVLDSG GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
1701 VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK*

```

Последовательность белка pSYN FVIII 272 (FVIII с 144 AE XTEN в аминокислоте 18 и 244 AE XTEN в домене В без Fc) SEQ ID NO: 85).

```

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

```

Последовательность белка pSYN-FVIII-161 (SEQ ID NO: 69) (1-1457 позиция аминокислотной последовательности FVIII; подчеркнутая область отображает регион Fc; подчеркивание изогнутой линией отображает расщепляемый линкер между первым Fc и фрагментом ФВ; область с двойным подчеркиванием отображает фрагмент ФВ; область жирным шрифтом отображает расщепляемый линкер между фрагментом ФВ и Fc).

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGA VE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
 51 PRVPKSF PFN TSVVYKKT LF VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
 101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVS YWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
 151 GSHTYVWQVL KENGPMASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 251 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
 301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
 351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
 401 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
 501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
 551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 601 NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL

651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MUYEDTLTLF PFSGETVFM
 701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYYED SYEDISAYLL
 751 SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQREITRTTL QSDQEEIDYD DTISVEMKKE
 801 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLRNRAQSG
 851 SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
 901 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY FWKVQHMAP
 951 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
 1001 FALFFTIFDE TKSUYFTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
 1051 MDTLPGLVMA QDQIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL
 1101 YNLYPGVFET VEMLPKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
 1151 GMASGHIRDF QITASGYGQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
 1201 LAPMIIHGK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
 1251 FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCNLNSCS
 1301 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
 1351 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
 1401 QNGKVVFQ QNDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
 1451 CEAQDLYDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
 1501 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
 1551 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPOVYTLPP SRDELTKNQV
 1601 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD
 1651 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGKRRRRSG GGGSGGGSG
 1701 GGGSGGGSG GGGSGGGSGR KRRKRSLSR PPMVKLVCPA DNLRAEGLEC
 1751 TKTCQNYDLE CMSMGCVSGC LCPPGMVRHE NRCVALERCP CFHQGKEYAP
 1801 GETVKIGCNT CVCRRKWNC TDHVCDATCS TIGMAHYLTF DGLKYLFPGE
 1851 CQYVLVDYC GSNPGTERIL VGNGKCSHPS VKCKKRVTL VEGGEIELED
 1901 GEVNVKRPKM DETHFEVVES GRYIILLGK ALSVVWDRHL SISVVLKQTY
 1951 QEKVCGLCGN FDGIQNNDLT SSNLQVEEDP VDFGNSWKVS SQCADTRKVP
 2001 LDSSPATCHN NIMKQTMVDS SCRILTSDFV QDCNKLVDPE PYLDVCIYDT
 2051 CSCSIGDCA AFCDTIAAYA HVCAQHGVV TWRTATLCPQ SCEERNLREN
 2101 GYEAEWRYNS CAPACQVTCQ HPEPLACPVO CVEGCHAHCP PGKILDELLO
 2151 TCVDPEDCPV CEVAGRRFAS GKKVTLNPSD PEHCQICHCD VVNLTCACQ
 2201 EPISGTSESA TPESGPGSEP ATSGSETPGT SESATPESGP GSEPATSGSE
 2251 TPGTSESATP ESGPGTSTEP SEGSAAGSPA GSPTSTEEGT SESATPESGP
 2301 GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGSPAGS PTSTEEGSPA GSPTSTEEGT
 2351 STEPSEGSAP GTSESATPES GPGTSESATP ESGPGTSESA TPESGPGSEP
 2401 ATSGSETPGS EPATSGSETP GSPAGSPTST EEGTSTEPSE GSAPGTSTEP
 2451 SEGSAAGSEP ATSGSETPGT SESATPESGP GTSTEPSEGS APDSGGGGSG
 2501 GGGSGGGSG GGGSGGGSL VPRGSGGDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF
 2551 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
 2601 EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
 2651 REPOVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
 2701 TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
SPGK

Последовательность белка pSYN-FVIII-170 (SEO ID NO: 71).

1 SLSCRPPMVK LVCPADNLRA EGLECTKTCQ NYDLECMSMG CVSGCLCPPG
 51 MVRHENRCVA LERCPCFHQG KEYAPGETVK IGCNTCVCRD RKWNCTDHVC
 101 DATCSTIGMA HYLTFDGLKY LFPGECQYVL VQDYCGSNPG TFRILVGNGK
 151 CSHPSVKCKK RVTILVEGGE IELFDGEVNV KRPMKDETHF EVVESGRYII
 201 LLLGKALSUV WDRHLSISVV LKQTYQEKVC GLCGNFDGIQ NNDLTSSNLQ
 251 VEEDPVDFGN SWKVSSQCAD TRKVPLDSSP ATCHNNIMKQ TMVDSSCRIL
 301 TSDVFQDCNK LVDPEPYLDV CIYDTCSCES IGDCAAFCDT IAAYAHVCAQ
 351 HGKVVWTRTA TLCPQSCEER NLRENGYEA WRYNSCAPAC QVTCQHPEPL
 401 ACPVQCVEGC HAHCPPGKIL DELLQTCVDP EDCPVCEVAG RRFASGKKVT
 451 LNPSDPEHCQ ICHCDVVNLT CEACQEPISG TSESATPESG PGSEPATSGS
 501 ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG TSTEPSEGS
 551 PGSPAGSPTS TEEGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
 601 SPAGSPTS EGSAGSPTS TEEGSTEPS EGSAPGTSES ATPESGPGTS
 651 ESATPESGPG TSESATPESG PGSEPATSGS ETPGSEPATS GSETPGSPAG
 701 SPTSTEEGTS TEPSEGSAPG TSTEPSEGS PGSEPATSGS ETPGTSESAT
 751 PESGPGTSTE PSEGSAPDSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSLVPRGS
 801 GGASATRRYY LGAVELSWDY MQSDLGELPV DARFPPRVPK SFPNTSVVY
 851 KKTLEFVEFTD HLFNIAKPRP PWMGLLGPTI QAEVYDTVVI TLKNMASHPV
 901 SLHAVGVSYW KASEGAEYDD QTSQREKEDD KVFPGGSHY VWQVLKENG
 951 MASDPLCLTY SYLSHVDLVK DLNSGLIGAL LVCREGLAK EKTQTLHKFI
 1001 LLFAVFDEGK SWHSETKNSL MQDRDAASAR AWPKMHTVNG YVNRSLPGLI
 1051 GCHRKSVYWH VIGMGTTPEV HSIFLEGHTF LVRNHRQASL EISPITFLTA
 1101 QTLLMDLGQF LLFCHISSHQ HDGMEAYVKV DSCPEEPQLR MKNNEEAEDY
 1151 DDDLTDSEMD VVRFDDDNSP SFIQIRSVAK KHPKTWVHYI AAEEEDWDYA
 1201 PLVLAPDDRS YKSQYLNNGP QRIGRKYKKV RFMAYTDETF KTREAIQHE
 1251 GILGPLLYGE VGDTLIIIFK NQASRPYNIY PHGITDVRPL YSRRLPKGVK
 1301 HLKDFPILPG EIFKYKWTVT VEDGPTKSDP RCLTRYYSF VNMERDLASG
 1351 LIGPLLYCYK ESVDQQRGNQI MSDKRNILF SVFDENRSWY LTENIQRFLP
 1401 NPAGVQLEDP EFQASNIMHS INGYVFDSLQ LSVCLHEVAY WYILSIGAQT
 1451 DFLSVFFSGY TFKHKMVYED TLTLFPFSGE TVFMSMENPG LWILGCHNSD

1501 FRNRGMTALL KVSSCDKNTG DYYEDSYEDI SAYLLSKNNA IEPRSFQNP
 1551 PVLKRHQREI TRTTLQSDQE EIDYDDTISV EMKKEDFDIY DEDENQSPRS
 1601 FQKKTRHYFI AAVERLWDYG MSSSPHVLRN RAQSGSVPQF KKVVVFQFTD
 1651 GSFTQPLYRG ELNEHLGLLG PYIRAEVEDN IMVTFRNQAS RPYSFYSSLI
 1701 SYEEDQRQGA EPRKNFVKPN ETCTYFWKVQ HHMAPTKDEF DCKAWAYFSD
 1751 VDLEKDVHSG LIGPLLVCHT NTLNPAHGRQ VTVQEFALFF TIFDETKSWY
 1801 FTENMERNCR APCNIQMEDP TFKENYRFHA INGYIMDTLP GLVMAQDQRI
 1851 RWYLLSMGSN ENIHSIHFSG HVFTVRKKEE YKMALYNLYP GVFTVEMLP
 1901 SKAGIWRVEC LIGEHLHAGM STLFLVYSNK CQTPLGMASG HIRDFQITAS
 1951 GQYGQWAPKL ARLHYSGSIN AWSTKEPFSW IKVDLLAPMI IHGIKTQGAR
 2001 QKFSSLYISQ FIMYSLDGK KWQTYRGNST GTLMVFFGNV DSSGIKHNIF
 2051 NPPIIARYIR LHPHTYSIRS TLRMELMGCD LNCSMPLGM ESKAISDAQI
 2101 TASSYFTNMF ATWSPSKARL HLQGRSNAWR PQVNNPKEWL QVDFQKTMKV
 2151 TGVTTQGVKS LLTSMYVKEF LISSSQDGHQ WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF
 2201 TPVVNSLDPP LLTRYLRIHP QSWVHQIALR MEVLGCEAQD LY

Нуклеотидная последовательность pSYN FVIII 310 (кодирующая FVIII с полной делецией домена В, за исключением 2 аминокислотных остатков и 288 АЕ-ХТЕН, вставленного после 742 а.к.) (SEO ID NO: 170).

1 ATGCAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TGCGATTCTG
 51 CTTTAGTGCC ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA CTGTCATGGG
 101 ACTATATGCA AAGTGATCTC GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCTT
 151 CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC ACCTCAGTCG TGTACAAAAA
 201 GACTCTGTTT GTAGAATTCA CGGATCACCT TTTCAACATC GCTAAGCCAA
 251 GGCCACCCTG GATGGGTCTG CTAGGTCCTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
 301 GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCAGTCT
 351 TCATGCTGTT GGTGTATCCT ACTGGAAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG
 401 ATGATCAGAC CAGTCAAAGG GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTTCCCTGGT
 451 GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCCTG AAAGAGAATG GTCCAATGGC
 501 CTCTGACCCA CTGTGCCTTA CCTACTCATA TCTTTCTCAT GTGGACCTGG
 551 TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCCTACTAGT ATGTAGAGAA
 601 GGGAGTCTGG CCAAGGAAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATACTACT
 651 TTTTGCTGTA TTTGATGAAG GGAAAAGTTG GCACTCAGAA ACAAAGAACT
 701 CCTTGATGCA GGATAGGGAT GCTGCATCTG CTCGGGCCTG GCCTAAAATG
 751 CACACAGTCA ATGGTTATGT AACAGGTCT CTGCCAGGTC TGATTGGATG
 801 CCACAGGAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGGAATGGGC ACCACTCCTG
 851 AAGTGCACTC AATATTCCTC GAAGGTCACA CATTTCTTGT GAGGAACCAT

901 CGCCAGGCGT CCTTGAAAT CTCGCAATA ACTTTCCTTA CTGCTCAAAC
 951 ACTCTTGATG GACCTTGAC AGTTTCTACT GTTTTGT CAT ATCTCTCCC
 1001 ACCAACATGA TGGCATGGAA GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG
 1051 GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA GAAGCGGAAG ACTATGATGA
 1101 TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT GATGACAACT
 1151 CTCCTTCCTT TATCCAAATT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAACT
 1201 TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT
 1251 AGTCCTCGCC CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG
 1301 GCCCTCAGCG GATTGGTAGG AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATAAC
 1351 ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT ATTCAGCATG AATCAGGAAT
 1401 CTTGGGACCT TTACTTTATG GGGAAGTTGG AGACACACTG TTGATTATAT
 1451 TTAAGAATCA AGCAAGCAGA CCATATAACA TCTACCCTCA CGGAATCACT
 1501 GATGTCCGTC CTTTGTATTC AAGGAGATTA CCAAAAGGTG TAAAACATTT
 1551 GAAGGATTTT CCAATTCTGC CAGGAGAAAAT ATTCAAATAT AAATGGACAG
 1601 TGA CTGTAGA AGATGGGCCA ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCGC
 1651 TATTACTCTA GTTTCGTTAA TATGGAGAGA GATCTAGCTT CAGGACTCAT
 1701 TGGCCCTCTC CTCATCTGCT ACAAAGAATC TG TAGATCAA AGAGGAAACC
 1751 AGATAATGTC AGACAAGAGG AATGTCATCC TGTTTCTGT ATTTGATGAG
 1801 AACCGAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTTC TCCCCAATCC
 1851 AGCTGGAGTG CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCTCC AACATCATGC
 1901 ACAGCATCAA TGGCTATGTT TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTTGTGTTG
 1951 CATGAGGTGG CATACTGGTA CATTCTAAGC ATTGGAGCAC AGACTGACTT
 2001 CCTTTCTGTC TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA ATGGTCTATG
 2051 AAGACACACT CACCCTATTC CCATTCTCAG GAGAACTGT CTTCATGTGC
 2101 ATGGA AAAACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACA ACT CAGACTTTTCG
 2151 GAACAGAGGC ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAACA
 2201 CTGGTGATTA TTACGAGGAC AGTTATGAAG ATATTTTCAGC ATACTTGCTG
 2251 AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAAGC TTCGGTACCT CAGAGTCTGC
 2301 TACCCCGAG TCAGGGCCAG GATCAGAGCC AGCCACCTCC GGGTCTGAGA
 2351 CACCCGGGAC TTCCGAGAGT GCCACCCCTG AGTCCGGACC CGGGTCCGAG
 2401 CCCGCCACTT CCGGCTCCGA AACTCCCGGC ACAAGCGAGA GCGCTACCCC
 2451 AGAGTCAGGA CCAGGAACAT CTACAGAGCC CTCTGAAGGC TCCGCTCCAG
 2501 GGTCCCCAGC CGGCAGTCCC ACTAGCACCG AGGAGGGAAC CTCTGAAAGC
 2551 GCCACACCCG AATCAGGGCC AGGTCTGAG CCTGCTACCA GCGGCAGCGA
 2601 GACACCAGGC ACCTCTGAGT CCGCCACACC AGAGTCCGGA CCCGGATCTC
 2651 CCGCTGGGAG CCCACCTCC ACTGAGGAGG GATCTCCTGC TGGCTCTCCA
 2701 ACATCTACTG AGGAAGGTAC CTAACCGAG CCATCCGAGG GATCAGCTCC
 2751 CGGCACCTCA GAGTCGGCAA CCCC GGAGTC TGGACCCGGA ACTTCCGAAA

2801 GTGCCACACC AGAGTCCGGT CCCGGGACTT CAGAATCAGC AACACCCGAG
 2851 TCCGGCCCTG GGTCTGAACC CGCCACAAGT GGTAGTGAGA CACCAGGATC
 2901 AGAACCTGCT ACCTCAGGGT CAGAGACACC CGGATCTCCG GCAGGCTCAC
 2951 CAACCTCCAC TGAGGAGGGC ACCAGCACAG AACCAAGCGA GGGCTCCGCA
 3001 CCCGGAACAA GCACTGAACC CAGTGAGGGT TCAGCACCCG GCTCTGAGCC
 3051 GGCCACAAGT GGCAGTGAGA CACCCGGCAC TTCAGAGAGT GCCACCCCCG
 3101 AGAGTGGCCC AGGCACTAGT ACCGAGCCCT CTGAAGGCAG TGCGCCAGCC
 3151 TCGAGCGAAA TAACTCGTAC TACTCTTCAG TCAGATCAAG AGGAAATCGA
 3201 TTATGATGAT ACCATATCAG TTGAAATGAA GAAGGAAGAT TTTGACATTT
 3251 ATGATGAGGA TGAAAATCAG AGCCCCCGCA GCTTTCAAAA GAAAACACGA
 3301 CACTATTTTA TTGCTGCAGT GGAGAGGCTC TGGGATTATG GGATGAGTAG
 3351 CTCCCCACAT GTTCTAAGAA ACAGGGGCTCA GAGTGGCAGT GTCCCTCAGT
 3401 TCAAGAAAGT TGTTTTCCAG GAATTTACTG ATGGCTCCTT TACTCAGCCC
 3451 TTATACCGTG GAGAACTAAA TGAACATTTG GGAATCCTGG GGCCATATAT
 3501 AAGAGCAGAA GTTGAAGATA ATATCATGGT AACTTTCAGA AATCAGGCCT
 3551 CTCGTCCCTA TTCCTTCTAT TCTAGCCTTA TTTCTTATGA GGAAGATCAG
 3601 AGGCAAGGAG CAGAACCTAG AAAAAACTTT GTCAAGCCTA ATGAAACCAA
 3651 AACTTACTTT TGGAAGTGC AACATCATAT GGCACCCACT AAAGATGAGT
 3701 TTGACTGCAA AGCCTGGGCT TATTTCTCTG ATGTTGACCT GGAAAAAGAT
 3751 GTGCACTCAG GCCTGATTGG ACCCCTTCTG GTCTGCCACA CTAACACACT
 3801 GAACCCTGCT CATGGGAGAC AAGTGACAGT ACAGGAATTT GCTCTGTTTT
 3851 TCACCATCTT TGATGAGACC AAAAGCTGGT ACTTCACTGA AAATATGGAA
 3901 AGAAACTGCA GGGCTCCCTG CAATATCCAG ATGGAAGATC CCACTTTTAA
 3951 AGAGAATTAT CGCTTCCATG CAATCAATGG CTACATAATG GATACACTAC
 4001 CTGGCTTAGT AATGGCTCAG GATCAAAGGA TTCGATGGTA TCTGCTCAGC
 4051 ATGGGCAGCA ATGAAAACAT CCATTCTATT CATTTCACTG GACATGTGTT
 4101 CACTGTACGA AAAAAAGAGG AGTATAAAAT GGCACGTGAC AATCTCTATC
 4151 CAGGTGTTTT TGAGACAGTG GAAATGTTAC CATCCAAAGC TGGAATTTGG
 4201 CGGGTGGAAT GCCTTATTGG CGAGCATCTA CATGCTGGGA TGAGCACACT
 4251 TTTTCTGGTG TACAGCAATA AGTGTGACAG TCCCCTGGGA ATGGCTTCTG
 4301 GACACATTAG AGATTTTCAG ATTACAGCTT CAGGACAATA TGGACAGTGG
 4351 GCCCCAAAGC TGGCCAGACT TCATTATTCC GGATCAATCA ATGCCTGGAG
 4401 CACCAAGGAG CCCTTTTCTT GGATCAAGGT GGATCTGTTG GCACCAATGA
 4451 TTATTCACGG CATCAAGACC CAGGGTGCCC GTCAGAAGTT CTCCAGCCTC
 4501 TACATCTCTC AGTTTATCAT CATGTATAGT CTTGATGGGA AGAAGTGGCA
 4551 GACTTATCGA GGAAATTCCA CTGGAACCTT AATGGTCTTC TTTGGCAATG
 4601 TGGATTATC TGGAATAAAA CACAATATTT TTAACCCTCC AATTATTGCT
 4651 CGATACATCC GTTTGCACCC AACTCATTAT AGCATTCGCA GCACTCTTCG

4701 CATGGAGTTG ATGGGCTGTG ATTTAAATAG TTGCAGCATG CCATTGGGAA
 4751 TGGAGAGTAA AGCAATATCA GATGCACAGA TTAGTGCTTC ATCCTACTTT
 4801 ACCAATATGT TTGCCACCTG GTCTCCTTCA AAAGCTCGAC TTCACCTCCA
 4851 AGGGAGGAGT AATGCCTGGA GACCTCAGGT GAATAATCCA AAAGAGTGGC
 4901 TGCAAGTGGA CTTCCAGAAG ACAATGAAAG TCACAGGAGT AACTACTCAG
 4951 GGAGTAAAAT CTCTGCTTAC CAGCATGTAT GTGAAGGAGT TCCTCATCTC
 5001 CAGCAGTCAA GATGGCCATC AGTGGACTCT CTTTTTTCAG AATGGCAAAG
 5051 TAAAGGTTTT TCAGGGAAAT CAAGACTCCT TCACACCTGT GGTGAACTCT
 5101 CTAGACCCAC CGTTACTGAC TCGCTACCTT CGAATTCACC CCCAGAGTTG
 5151 GGTGCACCAG ATTGCCCTGA GGATGGAGGT TCTGGGCTGC GAGGCACAGG
 5201 ACCTCTACGA CAAAACCTCAC ACATGCCCAC CGTGCCCAGC TCCAGAACTC
 5251 CTGGGCGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC CCAAAACCCA AGGACACCCT
 5301 CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACATG CGTGGTGCTG GACGTGAGCC
 5351 ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT ACGTGGACGG CGTGGAGGTG
 5401 CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG CAGTACAACA GCACGTACCG
 5451 TGTGGTCAGC GTCCTCACCG TCCTGCACCA GGAAGTGGTG AATGGCAAGG
 5501 AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGCCC TCCCAGCCCC CATCGAGAAA
 5551 ACCATCTCCA AAGCCAAAGG GCAGCCCCGA GAACCACAGG TGTACACCCT
 5601 GCCCCATCC CGGGATGAGC TGACCAAGAA CCAGGTCAGC CTGACCTGCC
 5651 TGGTCAAAGG CTTCTATCCC AGCGACATCG CCGTGGAGTG GGAGAGCAAT
 5701 GGGCAGCCGG AGAACAATA CAAGACCACG CCTCCCGTGT TGGACTCCGA
 5751 CGGCTCCTTC TTCCTCTACA GCAAGCTCAC CGTGGACAAG AGCAGGTGGC
 5801 AGCAGGGGAA CGTCTTCTCA TGCTCCGTGA TGCATGAGGC TCTGCACAAC
 5851 CACTACACGC AGAAGAGCCT CTCCCTGTCT CCGGGTAAAT GA

Последовательность белка pSYN FVIII 310 (FVIII с полной делецией домена В, за исключением 2 аминокислотных остатков и 288 AE-XTEN, вставленного после 742 а.к.) (SEQ ID NO: 171).

1 ATRRYYLGA V ELSWDYMQSD LGELPVDARF PPRVPKSPF NTSVVYKCTL
 51 FVEFTDHLFN IAKPRPPWMG LLGPTIQAEV YDTVVTILKN MASHPVS LHA
 101 VGVSYWKASE GA EYDDQTSQ REKEDDKVFP GGSHTYVWQV LKENGPMASD
 151 PLCLTYSYLS HVDLVKDLNS GLIGALLVCR EGSLAKEKTQ TLHKFILLFA
 201 VFDEGKSWHS ETKNSLMQDR DAASARAWPK MHTVNGYVNR SLPGLIGCHR
 251 KSVYWHVIGM GTTPEVHSIF LEGHTFLVRN HRQASLEISP ITFLTAQTLL
 301 MDLGQFLLFC HISSHQHDGM EAYVKVDSCP EEPQLRMKNN EEAEDYDDDL
 351 TDSEMDVVR FDDD NPSFIQ IRSVAKKHPK TWVHYIAAEE EDWDYAPLVL

401 APDDRSYKSQ YLNNGPQRIG RKYKKVRFMA YTDETFKTRE AIQHESGILG
 451 PLLYGEVGD T LLIIFKNQAS RPYNIYPHGI TDVRPLYSRR LPKGVKHLKD
 501 FPILPGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYYSSFVNME RDLASGLIGP
 551 LLICYKESVD QRGNQIMSDK RNVILFSVFD ENRSWYLTEN IQRFLPNPAG
 601 VQLEDPEFQA SNIMHSINGY VFDSLQLSVC LHEVAYWYIL SIGAQTDFLS
 651 VFFSGYTFKH KMYEDTLTL PPFSGETVFM SMENPGLWIL GCHNSDFRNR
 701 GMTALLKVSS CDKNTGDYEE DSYEDISAYL LSKNNAIEPR SFGTSESATP
 751 ESGPGSEPAT SGSETPGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP GTSESATPES
 801 GPGTSTEPSE GSAPGSPAGS PTSTEEGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP
 851 GTSESATPES GPGSPAGSPT STEEGSPAGS PTSTEEGTST EPSEGSAPGT
 901 SESATPESGP GTSESATPES GPGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPGSEP
 951 ATSGSETPGS PAGSPTSTEE GTSTEPSEGS APTSTEPSE GSAPGSEPAT
 1001 SGSETPGTSE SATPESGPGT STEPSEGSAP ASSEITRTTL QSDQEEIDYD
 1051 DTISVEMKKE DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP
 1101 HVLNRNAQSG SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA
 1151 EVEDNIMVTF RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY
 1201 FWKVQHHPMAP TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP
 1251 AHGRQVTVQE FALFFTIFDE TKSIFYTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN
 1301 YRFHAINGYI MDTLPGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV
 1351 RKKEEYKMAL YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL
 1401 VYSNKCQTPL GMASGHIRDF QITASGQYGQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK
 1451 EPFSWIKVDL LAPMIIHGIK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY
 1501 RGNSTGTLMV FFGNVDSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME
 1551 LMGC DLNSCS MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR
 1601 SNAWRPQVNN PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLLTSM YVKEFLISSS
 1651 QDGHQWTLFF QNGKVKVFGQ NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH
 1701 QIALRMEVLG CEAQDLYDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI
 1751 SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV
 1801 SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP
 1851 SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS
 1901 FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

Нуклеотидная последовательность pSYN FVIII 312 (кодирующая FVIII с полной делецией домена В, за исключением 5 аминокислотных остатков и 288 АЕ-ХТЕН, вставленного после а.к. 745- В5 версия) (SEQ ID NO: 172).

```

1      ATGCAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TCGGATTCTG
51     CTTTAGTGCC ACCAGAAGAT АТАССТGGG TGCAGTGGAA CTGTCATGGG
101    АТАТАТGCA AAGTGATCTC GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCTT
151    CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC ACCTCAGTCG TGTACAAAAA
201    GACTCTGTTT GTAGAATTCA CGGATCACCT TTTCAACATC GCTAAGCCAA
251    GGCCACCCTG GATGGGTCTG CTAGGTCCTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
301    GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCAGTCT
351    TCATGCTGTT GGTGTATCCT ACTGGAAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG
401    ATGATCAGAC CAGTCAAAGG GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTTCCCTGGT
451    GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCCTG AAAGAGAATG GTCCAATGGC
501    CTCTGACCCA CTGTGCCTTA CCTACTCATA TCTTTCTCAT GTGGACCTGG
551    TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCCTACTAGT ATGTAGAGAA
601    GGGAGTCTGG CCAAGGAAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATACTACT
651    TTTTGCTGTA TTTGATGAAG GGAAAAGTTG GCACTCAGAA ACAAAGAACT
701    CCTTGATGCA GGATAGGGAT GCTGCATCTG CTCGGGCCTG GCCTAAAATG
751    CACACAGTCA ATGGTTATGT AAACAGGTCT CTGCCAGGTC TGATTGGATG
801    CCACAGGAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGAATGGGC ACCACTCCTG
851    AAGTGCACTC AATATTCCTC GAAGGTCACA CATTTCTTGT GAGGAACCAT
901    CGCCAGGCGT CTTGGAAAT CTCGCCAATA ACTTTCCTTA CTGCTCAAAC
951    ACTCTTGATG GACCTTGAC AGTTTCTACT GTTTTGTCAT ATCTCTCCC
1001   ACCAACATGA TGGCATGGAA GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG
1051   GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA GAAGCGGAAG ACTATGATGA
1101   TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT GATGACAACT
1151   CTCCTTCCTT TATCCAAATT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAACT
1201   TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT
1251   AGTCCTCGCC CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG
1301   GCCCTCAGCG GATTGGTAGG AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATAС
1351   ACAGATGAAA CCTTТАAGAC TCGTGAAGCT ATTCAGCATG AATCAGGAAT
1401   CTTGGGACCT TACTTTATG GGGAAGTTGG AGACACACTG TTGATTATAT
1451   TТАAGАATCA AGCAAGCAGA CCATATAACA TCTACCCTCA CGGAATCACT
1501   GATGTCCGTC CTTTGTATTC AAGGAGATTA CCAAAAGGTG TAAAACATTT
1551   GAAGGATTTT CCAATTCTGC CAGGAGAAAT ATTCAAATAT AAATGGACAG
1601   TGACTGTAGA AGATGGGCCA ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCGC
1651   TATTACTCTA GTTTCGTТАA TATGGAGAGA GATCTAGCTT CAGGACTCAT
1701   TGGCCCTCTC CTCATCTGCT АСAAAGAATC TGТАGATCAA AGAGGAAACC
1751   AGATAATGTC AGACAAGAGG AATGTCATCC TGTTTTCTGT ATTTGATGAG
1801   AACCGAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTTC TCCCAATCC
1851   AGCTGGAGTG CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCTCC AACATCATGC
1901   ACAGCATCAA TGGCTATGTT TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTTGTTTG

```

1951 CATGAGGTGG CATACTGGTA CATTCTAAGC ATTGGAGCAC AGACTGACTT
 2001 CCTTTCTGTC TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA ATGGTCTATG
 2051 AAGACACACT CACCCTATTC CCATTCTCAG GAGAACTGT CTTCATGTCG
 2101 ATGGAAAACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACAACCT CAGACTTTCC
 2151 GAACAGAGGC ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAACA
 2201 CTGGTGATTA TTACGAGGAC AGTTATGAAG ATATTTTCAGC ATACTTGCTG
 2251 AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAAGC TTCTCTCAAA ACGGTACCTC
 2301 AGAGTCTGCT ACCCCCGAGT CAGGGCCAGG ATCAGAGCCA GCCACCTCCG
 2351 GGTCTGAGAC ACCCGGGACT TCCGAGAGTG CCACCCCTGA GTCCGGACCC
 2401 GGGTCCGAGC CCGCCACTTC CGGCTCCGAA ACTCCCGGCA CAAGCGAGAG
 2451 CGTACCCCA GAGTCAGGAC CAGGAACATC TACAGAGCCC TCTGAAGGCT
 2501 CCGTCCAGG GTCCCCAGCC GGCAGTCCCA CTAGCACCGA GGAGGGAACC
 2551 TCTGAAAGCG CCACACCCGA ATCAGGGCCA GGGTCTGAGC CTGCTACCAG
 2601 CGGCAGCGAG ACACCAGGCA CCTCTGAGTC CGCCACACCA GAGTCCGGAC
 2651 CCGGATCTCC CGCTGGGAGC CCCACCTCCA CTGAGGAGGG ATCTCCTGCT
 2701 GGCTCTCAA CATCTACTGA GGAAGGTACC TCAACCGAGC CATCCGAGGG
 2751 ATCAGCTCCC GGCACCTCAG AGTCGGCAAC CCCGGAGTCT GGACCCGGAA
 2801 CTTCCGAAAG TGCCACACCA GAGTCCGGTC CCGGGAATTC AGAATCAGCA
 2851 ACACCCGAGT CCGGCCCTGG GTCTGAACCC GCCACAAGTG GTAGTGAGAC
 2901 ACCAGGATCA GAACCTGCTA CCTCAGGGTC AGAGACACCC GGATCTCCGG
 2951 CAGGCTCACC AACCTCCACT GAGGAGGGCA CCAGCACAGA ACCAAGCGAG
 3001 GGCTCCGCAC CCGGAACAAG CACTGAACCC AGTGAGGGTT CAGCACCCGG
 3051 CTCTGAGCCG GCCACAAGTG GCAGTGAGAC ACCCGGCACT TCAGAGAGTG
 3101 CCACCCCGA GAGTGGCCCA GGCAGTAGTA CCGAGCCCTC TGAAGGCAGT
 3151 GCGCCAGCCT CGAGCGAAAT AACTCGTACT ACTCTTCAGT CAGATCAAGA
 3201 GGAAATCGAT TATGATGATA CCATATCAGT TGAAATGAAG AAGGAAGATT
 3251 TTGACATTTA TGATGAGGAT GAAAATCAGA GCCCCGCAG CTTTCAAAAG
 3301 AAAACACGAC ACTATTTTAT TGCTGCAGTG GAGAGGCTCT GGGATTATGG
 3351 GATGAGTAGC TCCCCACATG TTCTAAGAAA CAGGGCTCAG AGTGGCAGTG
 3401 TCCCTCAGTT CAAGAAAGTT GTTTTCCAGG AATTTACTGA TGGCTCCTTT
 3451 ACTCAGCCCT TATACCGTGG AGAACTAAAT GAACATTTGG GACTCCTGGG
 3501 GCCATATATA AGAGCAGAAG TTGAAGATAA TATCATGGTA ACTTTCAGAA
 3551 ATCAGGCCTC TCGTCCCTAT TCCTTCTATT CTAGCCTTAT TTCTTATGAG
 3601 GAAGATCAGA GGCAAGGAGC AGAACCTAGA AAAAAGTTTG TCAAGCCTAA
 3651 TGAAACCAAA ACTTACTTTT GGAAAGTGCA ACATCATATG GCACCCACTA
 3701 AAGATGAGTT TGAAGTCAAA GCCTGGGCTT ATTTCTCTGA TGTTGACCTG
 3751 GAAAAAGATG TGAAGTCAAG CCTGATTGGA CCCCTTCTGG TCTGCCACAC
 3801 TAACACACTG AACCTGCTC ATGGGAGACA AGTGACAGTA CAGGAATTTG

3851 CTCTGTTTTT CACCATCTTT GATGAGACCA AAAGCTGGTA CTTCAGTGAA
 3901 AATATGGAAA GAAACTGCAG GGCTCCCTGC AATATCCAGA TGGAAAGATCC
 3951 CACTTTTAAA GAGAATTATC GCTTCCATGC AATCAATGGC TACATAATGG
 4001 ATACACTACC TGGCTTAGTA ATGGCTCAGG ATCAAAGGAT TCGATGGTAT
 4051 CTGCTCAGCA TGGGCAGCAA TGAAAACATC CATTCTATTC ATTTCACTGG
 4101 ACATGTGTTC ACTGTACGAA AAAAAGAGGA GTATAAAATG GCACTGTACA
 4151 ATCTCTATCC AGGTGTTTTT GAGACAGTGG AAATGTTACC ATCCAAAGCT
 4201 GGAATTTGGC GGGTGGAATG CCTTATTGGC GAGCATCTAC ATGCTGGGAT
 4251 GAGCACACTT TTTCTGGTGT ACAGCAATAA GTGTCAGACT CCCCTGGGAA
 4301 TGGCTTCTGG ACACATTAGA GATTTTCAGA TTACAGCTTC AGGACAATAT
 4351 GGACAGTGGG CCCCAAAGCT GGCCAGACTT CATTATTCCG GATCAATCAA
 4401 TGCCTGGAGC ACCAAGGAGC CCTTTTCTTG GATCAAGGTG GATCTGTTGG
 4451 CACCAATGAT TATTCACGGC ATCAAGACCC AGGGTGCCCC TCAGAAGTTC
 4501 TCCAGCCTCT ACATCTCTCA GTTTATCATC ATGTATAGTC TTGATGGGAA
 4551 GAAGTGGCAG ACTTATCGAG GAAATTCAC TGGAACCTTA ATGGTCTTCT
 4601 TTGGCAATGT GGATTCATCT GGGATAAAAC ACAATATTTT TAACCCTCCA
 4651 ATTATGCTC GATACATCCG TTGACACCA ACTCATTATA GCATTGCGAG
 4701 CACTCTTCGC ATGGAGTTGA TGGGCTGTGA TTAAATAGT TGCAGCATGC
 4751 CATTGGGAAT GGAGAGTAAA GCAATATCAG ATGCACAGAT TACTGCTTCA
 4801 TCCTACTTTA CCAATATGTT TGCCACCTGG TCTCCTTCAA AAGCTCGACT
 4851 TCACCTCCAA GGGAGGAGTA ATGCCTGGAG ACCTCAGGTG AATAATCCAA
 4901 AAGAGTGGCT GCAAGTGGAC TTCCAGAAGA CAATGAAAGT CACAGGAGTA
 4951 ACTACTCAGG GAGTAAAATC TCTGCTTACC AGCATGTATG TGAAGGAGTT
 5001 CCTCATCTCC AGCAGTCAAG ATGGCCATCA GTGGACTCTC TTTTTCAGA
 5051 ATGGCAAAGT AAAGGTTTTT CAGGGAAATC AAGACTCCTT CACACCTGTG
 5101 GTGAACTCTC TAGACCCACC GTTACTGACT CGCTACCTTC GAATTCACCC
 5151 CCAGAGTTGG GTGCACCAGA TTGCCCTGAG GATGGAGGTT CTGGGCTGCG
 5201 AGGCACAGGA CCTCTACGAC AAAACTCACA CATGCCACC GTGCCACGT
 5251 CCAGAACTCC TGGGCGGACC GTCAGTCTTC CTCTTCCCCC CAAAACCCAA
 5301 GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTCACATGC GTGGTGGTGG
 5351 ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC
 5401 GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG
 5451 CACGTACCGT GTGGTCAGCG TCCTACCGT CCTGCACCAG GACTGGCTGA
 5501 ATGGCAAGGA GTACAAGTGC AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC
 5551 ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT
 5601 GTACACCCTG CCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC
 5651 TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG
 5701 GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGTT
 5751 GGACTCCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA
 5801 GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT
 5851 CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCTC CGGGTAAATG

Последовательность белка pSYN FVIII 312 (FVIII с полной делецией домена В, за исключением 5 аминокислотных остатков и 288 AE-XTEN, вставленного после а.к. 745- В5 версия) (SEO ID NO: 173).

```

1   ATRRYYLGA V ELSWDYMQSD LGELPVDARF PPRVPKSFPF NTSVVYKCTL
51  FVEFTDHLFN IAKPRPPWMG LLGPTIQAEV YDTVVITLKN MASHPVS LHA
101 VGVSYWKASE GA EYDDQTSQ REKEDDKVFP GGSHTYVWQV LKENGPMASD
151 PLCLTYSYLS HVDLVKDLNS GLIGALLVCR EGSLAKEKTQ TLHKFILLFA
201 VFDEGKSWHS ETKNSLMQDR DAASARAWPK MHTVNGYVNR SLPGLIGCHR
251 KSVYWHVIGM GTTPEVHSIF LEGHTFLVRN HRQASLEISP ITFLTAQTLL
301 MDLGQFLLFC HISSHQHDGM EAYVKVDSCP EEPQLRMKNN EEAEDYDDDL
351 TDSEMDVVR FDDD NSPSFIQ IRSVAKKHPK TWVHYIAAEE EDWDYAPLVL
401 APDDRSYKSQ YLNGPQRIG RKYKKVRFMA YDDETFKTRE AIQHESGILG
451 PLLYGEVGDT LLIIFKNQAS RPYNIYPHGI TDVRPLYSR RLPKGVKHLKD
501 FPILPGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYYSFVNME RDLASGLIGP
551 LLI CYKESVD QRG NQIMSDK RNVILFSVFD ENRSWYLTEN IQRFLPNPAG
601 VQLEDPEFQA SNIMHSINGY VFDSLQLSVC LHEVAYWYIL SIGAQTDFLS
651 VFFSGYTFKH K MVYEDTLTL FPFSGETVFM SMENPGLWIL GCHNSDFRNR
701 GMTALLKVSS CDKNTGDY YE DSYEDISAYL LSKNNAIEPR SFSQNGTSES
751 ATPESGPGSE PATSGSETPG TSESATPESG PGSEPATSGS ETPGTSESAT
801 PESGPGTSTE PSEG SAPGSP AGSPTSTEEG TSESATPESG PGSEPATSGS
851 ETPGTSESAT PESGPGSPAG SPTSTEEGSP AGSPTSTEEG TSTEPSEGA
901 PGTSESATPE SGP GTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGSE PATSGSETPG
951 SEPATSGSET PGSPAGSPTS TEEGTSTEPS EGSAPGTSTE PSEG SAPGSE
1001 PATSGSETPG TSESATPESG PGTSTEPSEG SAPASSEITR TTLQSDQEEI
1051 DYDDTISVEM KKEDFDIYDE DENQSPRSFQ KKTRHYFIAA VERLWDYGMS
1101 SSPHVLRNRA QSGSV PQFKK VVFQEFTDGS FTQPLYRGEL NEHLGLLGPY
1151 IRAEVEDNIM VTFRNQASRP YSFYSSLISY EEDQRQGAEP RKNFVKPNET
1201 KTYFWKVQHH MAPTKDEFDC KAWAYFSDVD LEKDVHSGLI GPLLVCHTNT
1251 LNPAHGRQVT VQEFALFFT I FDETKSWYFT ENMERNCRAP CNIQMEDPTF
1301 KENYRFHAIN GYIMDTLPGL VMAQDQRIRW YLLSMGSNEN IHSIHFSGHV
1351 FTVRKKEEYK MALYNLYPGV FETVEMLPSK AGIWRVECLI GEHLHAGMST
1401 LFLVYSNKCQ TPLGMASGHI RDFQITASGQ YGQWAPKLAR LHYSGSINAW
1451 STKEPFSWIK VDLLAPMIIH GIKTQGARQK FSSLYISQFI IMYSLDGKKW
1501 QTYRGNSTGT LMVFFGNVDS SGIKH NIFNP PIIARYIRLH PTHYSIRSTL
1551 RMELMGCDLN SCSMPLGMES KAISDAQITA SSYFTNMFAT WSPSKARLHL
1601 QGRSNAWRPQ VNNPKEWLQV DFQKTMKVTG VTTQGVKSLL TSMYVKEFLI
1651 SSSQDGHQWT LFFQNGKVKV FQGNQDSFTP VVNSLDPPLL TRYLR IHPQS
1701 WVHQIALRME VLGCEAQDLY DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT
1751 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
1801 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
1851 LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
1901 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSV MHE ALHNHYTQKS LSLSPGK*

```

Нуклеотидная последовательность pSYN ФВ059 (кодирующая ФВ D'D3-Fc с кислотным участком 2 (a2) сайта тромбина в линкере) (SEQ ID NO: 196).

```

1   ATGATTCCTG CCAGATTTGC CGGGGTGCTG CTTGCTCTGG CCCTCATTTT
51  GCCAGGGACC CTTTGTGCAG AAGGAACTCG CGGCAGGTCA TCCACGGCCC
101 GATGCAGCCT TTTCGGAAGT GACTTCGTCA ACACCTTTGA TGGGAGCATG
151 TACAGCTTTG CGGGATACTG CAGTTACCTC CTGGCAGGGG GCTGCCAGAA
201 ACGCTCCTTC TCGATTATTG GGGACTTCCA GAATGGCAAG AGAGTGAGCC
251 TCTCCGTGTA TCTTGGGGAA TTTTTTGACA TCCATTTGTT TGTCAATGGT
301 ACCGTGACAC AGGGGGACCA AAGAGTCTCC ATGCCCTATG CCTCCAAAGG
351 GCTGTATCTA GAAACTGAGG CTGGGTACTA CAAGCTGTCC GGTGAGGCCT
401 ATGGCTTTGT GGCCAGGATC GATGGCAGCG GCAACTTTCA AGTCCTGCTG
451 TCAGACAGAT ACTTCAACAA GACCTGCGGG CTGTGTGGCA ACTTTAACAT
501 CTTTGCTGAA GATGACTTTA TGACCCAAGA AGGGACCTTG ACCTCGGACC
551 CTTATGACTT TGCCAACTCA TGGGCTCTGA GCAGTGGAGA ACAGTGGTGT
601 GAACGGGCAT CTCCTCCCAG CAGCTCATGC AACATCTCCT CTGGGGAAAT
651 GCAGAAGGGC CTGTGGGAGC AGTGCCAGCT TCTGAAGAGC ACCTCGGTGT
701 TTGCCCCTG CCACCCTCTG GTGGACCCCG AGCCTTTTGT GGCCCTGTGT
751 GAGAAGACTT TGTGTGAGTG TGCTGGGGGG CTGGAGTGCG CCTGCCCTGC
801 CCTCCTGGAG TACGCCCCGA CCTGTGCCCA GGAGGGAATG GTGCTGTACG
851 GCTGGACCGA CCACAGCGCG TGCAGCCCAG TGTGCCCTGC TGGTATGGAG
901 TATAGGCAGT GTGTGTCCCC TTGCGCCAGG ACCTGCCAGA GCCTGCACAT
951 CAATGAAATG TGTCAGGAGC GATGCGTGGA TGGCTGCAGC TGCCCTGAGG
1001 GACAGCTCCT GGATGAAGGC CTCTGCGTGG AGAGCACCGA GTGTCCCTGC
1051 GTGCATTCCG GAAAGCGCTA CCCTCCCGGC ACCTCCCTCT CTCGAGACTG
1101 CAACACCTGC ATTTGCCGAA ACAGCCAGTG GATCTGCAGC AATGAAGAAT

```

1151 GTCCAGGGGA GTGCCTTGTC ACTGGTCAAT CCCACTTCAA GAGCTTTGAC
 1201 AACAGATACT TCACCTTCAG TGGGATCTGC CAGTACCTGC TGGCCCGGA
 1251 TTGCCAGGAC CACTCCTTCT CCATTGTCAT TGAGACTGTC CAGTGTGCTG
 1301 ATGACCGCGA CGCTGTGTGC ACCCGCTCCG TCACCGTCCG GCTGCCTGGC
 1351 CTGCACAACA GCCTTGTGAA ACTGAAGCAT GGGGCAGGAG TTGCCATGGA
 1401 TGGCCAGGAC ATCCAGCTCC CCCTCCTGAA AGGTGACCTC CGCATCCAGC
 1451 ATACAGTGAC GGCTCCGTG CGCCTCAGCT ACGGGGAGGA CCTGCAGATG
 1501 GACTGGGATG GCCGCGGGAG GCTGCTGGTG AAGCTGTCCC CCGTCTATGC
 1551 CGGGAAGACC TGCGGCCTGT GTGGGAATTA CAATGGCAAC CAGGGCGACG
 1601 ACTTCCTTAC CCCCTCTGGG CTGGCGGAGC CCCGGGTGGA GGACTTCGGG
 1651 AACGCCTGGA AGCTGCACGG GGAAGTCCAG GACCTGCAGA AGCAGCACAG
 1701 CGATCCCTGC GCCCTCAACC CGCGCATGAC CAGGTTCTCC GAGGAGGCGT
 1751 GCGCGGTCCT GACGTCCCCC ACATTCGAGG CCTGCCATCG TGCCGTCAGC
 1801 CCGCTGCCCT ACCTGCGGAA CTGCCGCTAC GACGTGTGCT CCTGCTCGGA
 1851 CGGCCGCGAG TGCCTGTGCG GCGCCCTGGC CAGCTATGCC GCGGCCTGCG
 1901 CGGGGAGAGG CGTGCGCGTC GCGTGGCGCG AGCCAGGCCG CTGTGAGCTG
 1951 AACTGCCCCA AAGGCCAGGT GTACCTGCAG TGCGGGACCC CCTGCAACCT
 2001 GACCTGCCGC TCTCTCTTT ACCCGGATGA GGAATGCAAT GAGGCCTGCC
 2051 TGGAGGGCTG CTTCTGCCCC CCAGGGCTCT ACATGGATGA GAGGGGGGAC
 2101 TGCGTGCCCA AGGCCAGTG CCCCTGTTAC TATGACGGTG AGATCTTCCA
 2151 GCCAGAAGAC ATCTTCTCAG ACCATCACAC CATGTGCTAC TGTGAGGATG
 2201 GCTTCATGCA CTGTACCATG AGTGGAGTCC CCGGAAGCTT GCTGCCTGAC
 2251 GCTGTCCCTCA GCAGTCCCCT GTCTCATCGC AGCAAAAGGA GCCTATCCTG
 2301 TCGGCCCCC ATGGTCAAGC TGGTGTGTCC CGCTGACAAC CTGCGGGCTG
 2351 AAGGGCTCGA GTGTACCAA ACCTGCCAGA ACTATGACCT GGAGTGCATG
 2401 AGCATGGGCT GTGTCTCTGG CTGCCTCTGC CCCCCGGGCA TGGTCCGGCA
 2451 TGAGAACAGA TGTGTGGCCC TGGAAGGTG TCCCTGCTTC CATCAGGGCA
 2501 AGGAGTATGC CCCTGGAGAA ACAGTGAAGA TTGGCTGCAA CACTTGTGTC
 2551 TGTCGGGACC GGAAGTGAA CTGCACAGAC CATGTGTGTG ATGCCACGTG
 2601 CTCCACGATC GGCATGGCCC ACTACCTCAC CTTGACGGG CTCAAATACC
 2651 TGTTCCCCCG GGAGTGCCAG TACGTTCTGG TGCAGGATTA CTGCGGCAGT
 2701 AACCCTGGGA CCTTTCGGAT CCTAGTGGGG AATAAGGGAT GCAGCCACCC
 2751 CTCAGTGAAA TGCAAGAAAC GGGTCACCAT CCTGGTGGAG GGAGGAGAGA
 2801 TTGAGCTGTT TGACGGGGAG GTGAATGTGA AGAGGCCCAT GAAGGATGAG
 2851 ACTCACTTTG AGGTGGTGGA GTCTGGCCGG TACATCATTC TGCTGCTGGG
 2901 CAAAGCCCTC TCCGTGGTCT GGGACCGCCA CCTGAGCATC TCCGTGGTCC
 2951 TGAAGCAGAC ATACCAGGAG AAAGTGTGTG GCCTGTGTGG GAATTTTGAT
 3001 GGCATCCAGA ACAATGACCT CACCAGCAGC AACCTCCAAG TGGAGGAAGA

3051 CCCTGTGGAC TTTGGGAACT CCTGGAAAGT GAGCTCGCAG TGTGCTGACA
 3101 CCAGAAAAGT GCCTCTGGAC TCATCCCCTG CCACCTGCCA TAACAACATC
 3151 ATGAAGCAGA CGATGGTGGA TTCCTCCTGT AGAATCCTTA CCAGTGACGT
 3201 CTTCCAGGAC TGCAACAAGC TGGTGGACCC CGAGCCATAT CTGGATGTCT
 3251 GCATTTACGA CACCTGCTCC TGTGAGTCCA TTGGGGACTG CGCCGCATTC
 3301 TGCGACACCA TTGCTGCCTA TGCCCACGTG TGTGCCCAGC ATGGCAAGGT
 3351 GGTGACCTGG AGGACGGCCA CATTGTGCCC CCAGAGCTGC GAGGAGAGGA
 3401 ATCTCCGGGA GAACGGGTAT GAGGCTGAGT GGCGCTATAA CAGCTGTGCA
 3451 CCTGCCTGTC AAGTCACGTG TCAGCACCTT GAGCCACTGG CCTGCCCTGT
 3501 GCAGTGTGTG GAGGGCTGCC ATGCCCACTG CCCTCCAGGG AAAATCCTGG
 3551 ATGAGCTTTT GCAGACCTGC GTTGACCCTG AAGACTGTCC AGTGTGTGAG
 3601 GTGGCTGGCC GCGTTTTGC CTCAGGAAAG AAAGTCACCT TGAATCCAG
 3651 TGACCCTGAG CACTGCCAGA TTTGCCACTG TGATGTTGTC AACCTCACCT
 3701 GTGAAGCCTG CCAGGAGCCG ATATCGGGCG CGCCAACATC AGAGAGCGCC
 3751 ACCCCTGAAA GTGGTCCCGG GAGCGAGCCA GCCACATCTG GGTCGGAAAC
 3801 GCCAGGCACA AGTGAGTCTG CAACTCCCGA GTCCGGACCT GGCTCCGAGC
 3851 CTGCCACTAG CGGCTCCGAG ACTCCGGGAA CTTCCGAGAG CGCTACACCA
 3901 GAAAGCGGAC CCGGAACCAG TACCGAACCT AGCGAGGGCT CTGCTCCGGG
 3951 CAGCCCAGCC GGCTCTCCTA CATCCACGGA GGAGGGCACT TCCGAATCCG
 4001 CCACCCCGGA GTCAGGGCCA GGATCTGAAC CCGCTACCTC AGGCAGTGAG
 4051 ACGCCAGGAA CGAGCGAGTC CGCTACACCG GAGAGTGGGC CAGGGAGCCC
 4101 TGCTGGATCT CCTACGTCCA CTGAGGAAGG GTCACCAGCG GGCTCGCCCA
 4151 CCAGCACTGA AGAAGGTGCC TCGATATCTG ACAAGAACAC TGGTGATTAT
 4201 TACGAGGACA GTTATGAAGA TATTTAGCA TACTTGCTGA GTAAAAACAA
 4251 TGCCATTGAA CCAAGAAGCT TCTCTGACAA AACTCACACA TGCCCACCGT
 4301 GCCCAGCTCC AGAACTCCTG GCGCGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCA
 4351 AAACCCAAGG ACACCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT
 4401 GGTGGTGGAC GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG
 4451 TGGACGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG
 4501 TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTGAGCGTC CTCACCGTCC TGCACCAGGA
 4551 CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC
 4601 CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA
 4651 CCACAGGTGT ACACCTGCC CCCATCCCGG GATGAGCTGA CCAAGAACCA
 4701 GGTGAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG
 4751 TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT
 4801 CCCGTGTTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA AGCTCACCGT
 4851 GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC
 4901 ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
 4951 GGTAAATGA

Последовательность белка pSYN ФВ059 (ФВ D'D3-Fc с а2 участком сайта тромбина FVIII в линке-ре) - подчеркнутая область жирным шрифтом отображает а2 участок (SEQ ID NO: 197).

```

1    MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFVNTFDGSM
51   YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
101  TVTQGDQRVS MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL
151  SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
201  ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
251  EKTLCCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDTHSA CSPVCPAGME
301  YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTPCPC
351  VHSBKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD
401  NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIETV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
451  LHNSLVKLKH GAGVAMDGQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQM
501  DWDGRGRLLV KLSVPYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
551  NAWKLHGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
601  PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCEL
651  NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
701  CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
751  AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVC PADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
801  SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
851  CRDRKWNTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ YVLVQDYCGS
901  NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTLVE GGEIELFDGE VNVKRPMDKE
951  THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
1001 GIQNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI
1051 MKQTMVDSSC RILTSDVFQD CNKLVDPEPY LDVCIYDTCS CESIGDCAAF
1101 CDTIAAYAHV CAQHGVVTV RTATLCPQSC EERNLRENGY EAEWRYNSCA
1151 PACQVTCQHP EPLACPVQCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGAPTESA
1251 TPESGPGSEP ATSGSETPGT SESATPESGP GSEPATSGSE TPGTSESATP
1301 ESGPGTSTEP SEGSA PGSPA GSPTSTEEGT SESATPESGP GSEPATSGSE
1351 TPGTSESATP ESGPGSPAGS PTSTEEGSPA GSPTSTEEGA SISDKNTGDY
1401 YEDSYEDISA YLLSKNNAIE PRSFSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP
1451 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ
1501 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE
1551 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTPP
1601 PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTKSLSLSP
1651  GK*

```

Нуклеотидная последовательность pSYN ФВ062 (кодирующая ФВ D'D3-Fc без сайта тромбина в линкере) (SEQ ID NO: 198).

```

1   ATGATTCTG CCAGATTTGC CGGGGTGCTG CTTGCTCTGG CCCTCATTTT
51  GCCAGGGACC CTTTGTGCAG AAGGAACTCG CGGCAGGTCA TCCACGGCCC
101 GATGCAGCCT TTTCGGAAGT GACTTCGTCA ACACCTTTGA TGGGAGCATG
151 TACAGCTTTG CGGGATACTG CAGTTACCTC CTGGCAGGGG GCTGCCAGAA
201 ACGCTCCTTC TCGATTATTG GGGACTTCCA GAATGGCAAG AGAGTGAGCC
251 TCTCCGTGTA TCTTGGGGAA TTTTGTGACA TCCATTTGTT TGTCAATGGT
301 ACCGTGACAC AGGGGGACCA AAGAGTCTCC ATGCCCTATG CCTCCAAAGG
351 GCTGTATCTA GAAACTGAGG CTGGGTACTA CAAGCTGTCC GGTGAGGCCT
401 ATGGCTTTGT GGCCAGGATC GATGGCAGCG GCAACTTTCA AGTCCTGCTG
451 TCAGACAGAT ACTTCAACAA GACCTGCGGG CTGTGTGGCA ACTTAAACAT
501 CTTTGCTGAA GATGACTTTA TGACCCAAGA AGGGACCTTG ACCTCGGACC
551 CTTATGACTT TGCCAACTCA TGGGCTCTGA GCAGTGGAGA ACAGTGGTGT
601 GAACGGGCAT CTCCTCCAG CAGCTCATGC AACATCTCCT CTGGGGAAAT
651 GCAGAAAGGC CTGTGGGAGC AGTGCCAGCT TCTGAAGAGC ACCTCGGTGT
701 TTGCCCCTG CCACCCTCTG GTGGACCCCG AGCCTTTTGT GGCCCTGTGT
751 GAGAAGACTT TGTGTGAGTG TGCTGGGGGG CTGGAGTGCG CCTGCCCTGC
801 CCTCCTGGAG TACGCCCCGA CCTGTGCCCA GGAGGGAATG GTGCTGTACG
851 GCTGGACCGA CCACAGCGCG TGCAGCCCAG TGTGCCCTGC TGGTATGGAG
901 TATAGGCAGT GTGTGTCCCC TTGCGCCAGG ACCTGCCAGA GCCTGCACAT
951 CAATGAAATG TGTCAGGAGC GATGCGTGGA TGGCTGCAGC TGCCCTGAGG
1001 GACAGTCCTT GGATGAAGGC CTCTGCGTGG AGAGCACCGA GTGTCCCTGC
1051 GTGCATTCCG GAAAGCGCTA CCCTCCCGGC ACCTCCCTCT CTCGAGACTG
1101 CAACACCTGC ATTTGCCGAA ACAGCCAGTG GATCTGCAGC AATGAAGAAT
1151 GTCCAGGGGA GTGCCTTGTC ACTGGTCAAT CCCACTTCAA GAGCTTTGAC
1201 AACAGATACT TCACCTTCAG TGGGATCTGC CAGTACCTGC TGGCCCCGGA
1251 TTGCCAGGAC CACTCCTTCT CCATTGTCAT TGAGACTGTC CAGTGTGCTG
1301 ATGACCGCGA CGCTGTGTGC ACCCGCTCCG TCACCGTCCG GCTGCCTGGC
1351 CTGCACAACA GCCTTGTAAG ACTGAAGCAT GGGGCAGGAG TTGCCATGGA
1401 TGGCCAGGAC ATCCAGCTCC CCTCCTGAA AGGTGACCTC CGCATCCAGC
1451 ATACAGTGAC GGCCTCCGTG CGCCTCAGCT ACGGGGAGGA CCTGCAGATG
1501 GACTGGGATG GCCGCGGGAG GCTGCTGGTG AAGCTGTCCC CCGTCTATGC
1551 CGGGAAGACC TGCAGCCTGT GTGGGAATTA CAATGGCAAC CAGGGCGACG
1601 ACTTCCTTAC CCCCTCTGGG CTGGCGGAGC CCCGGGTGGA GGACTTCGGG

```

1651 AACGCCTGGA AGCTGCACGG GGACTGCCAG GACCTGCAGA AGCAGCACAG
 1701 CGATCCCTGC GCCCTCAACC CGCGCATGAC CAGGTTCTCC GAGGAGGCGT
 1751 GCGCGGTCCT GACGTCCCCC ACATTCGAGG CCTGCCATCG TGCCGTCAGC
 1801 CCGCTGCCCT ACCTGCGGAA CTGCCGCTAC GACGTGTGCT CCTGCTCGGA
 1851 CGGCCGCGAG TGCCTGTGCG GCGCCCTGGC CAGCTATGCC GCGGCCTGCG
 1901 CGGGGAGAGG CGTGCGCGTC GCGTGCGCG AGCCAGGCCG CTGTGAGCTG
 1951 AACTGCCCCG AAGGCCAGGT GTACCTGCAG TCGGGGACCC CCTGCAACCT
 2001 GACCTGCCGC TCTCTCTTT ACCCGGATGA GGAATGCAAT GAGGCCTGCC
 2051 TGGAGGGCTG CTTCTGCCCC CCAGGGCTCT ACATGGATGA GAGGGGGGAC
 2101 TCGTGCCCA AGGCCAGTG CCCCTGTTAC TATGACGGTG AGATCTTCCA
 2151 GCCAGAAGAC ATCTTCTCAG ACCATCACAC CATGTGCTAC TGTGAGGATG
 2201 GCTTCATGCA CTGTACCATG AGTGGAGTCC CCGGAAGCTT GCTGCCTGAC
 2251 GCTGTCCTCA GCAGTCCCCT GTCTCATCGC AGCAAAGGA GCCTATCCTG
 2301 TCGGCCCCC ATGGTCAAGC TGGTGTGTCC CGCTGACAAC CTGCGGGCTG
 2351 AAGGGCTCGA GTGTACCAA ACGTGCCAGA ACTATGACCT GGAGTGCATG
 2401 AGCATGGGCT GTGTCTCTGG CTGCCTCTGC CCCCCGGGCA TGGTCCGGCA
 2451 TGAGAACAGA TGTGTGGCCC TGGAAAGGTG TCCCTGCTTC CATCAGGGCA
 2501 AGGAGTATGC CCCTGGAGAA ACAGTGAAGA TTGGCTGCAA CACTTGTGTC
 2551 TGTCGGGACC GGAAGTGGA CTGCACAGAC CATGTGTGTG ATGCCACGTG
 2601 CTCCACGATC GGCATGGCCC ACTACCTCAC CTTCGACGGG CTCAAATACC
 2651 TGTTCCTCGG GGAGTGCCAG TACGTTCTGG TGCAGGATTA CTGCGGCAGT
 2701 AACCCTGGGA CCTTTCGGAT CCTAGTGGGG AATAAGGGAT GCAGCCACCC
 2751 CTCAGTGAAA TGCAAGAAAC GGGTCACCAT CCTGGTGGAG GGAGGAGAGA
 2801 TTGAGCTGTT TGACGGGGAG GTGAATGTGA AGAGGCCCAT GAAGGATGAG
 2851 ACTCACTTTG AGGTGGTGGA GTCTGGCCGG TACATCATTC TGCTGCTGGG
 2901 CAAAGCCCTC TCCGTGGTCT GGGACCGCCA CCTGAGCATC TCCGTGGTCC
 2951 TGAAGCAGAC ATACCAGGAG AAAGTGTGTG GCCTGTGTGG GAATTTTGAT
 3001 GGCATCCAGA ACAATGACCT CACCAGCAGC AACCTCCAAG TGGAGGAAGA
 3051 CCCTGTGGAC TTTGGGAACT CCTGGAAAGT GAGCTCGCAG TGTGCTGACA
 3101 CCAGAAAAGT GCCTCTGGAC TCATCCCCTG CCACCTGCCA TAACAACATC
 3151 ATGAAGCAGA CGATGGTGGA TTCCTCCTGT AGAATCCTTA CCAGTGACGT
 3201 CTTCCAGGAC TGCAACAAGC TGGTGGACCC CGAGCCATAT CTGGATGTCT
 3251 GCATTTACGA CACCTGCTCC TGTGAGTCCA TTGGGGACTG CGCCGCATTC
 3301 TGCGACACCA TTGCTGCCTA TGCCCACGTG TGTGCCCAGC ATGGCAAGGT
 3351 GGTGACCTGG AGGACGGCCA CATTGTGCCC CCAGAGCTGC GAGGAGAGGA
 3401 ATCTCCGGGA GAACGGGTAT GAGGCTGAGT GGCGCTATAA CAGCTGTGCA
 3451 CCTGCCTGTC AAGTCACGTG TCAGCACCTT GAGCCACTGG CCTGCCCTGT
 3501 GCAGTGTGTG GAGGGCTGCC ATGCCCACTG CCCTCCAGGG AAAATCCTGG

3551 ATGAGCTTTT GCAGACCTGC GTTGACCCTG AAGACTGTCC AGTGTGTGAG
 3601 GTGGCTGGCC GGCCTTTTGC CTCAGGAAAG AAAGTCACCT TGAATCCCAG
 3651 TGACCCTGAG CACTGCCAGA TTTGCCACTG TGATGTTGTC AACCTCACCT
 3701 GTGAAGCCTG CCAGGAGCCG ATATCGGGCG CGCCAACATC AGAGAGCGCC
 3751 ACCCCTGAAA GTGGTCCCGG GAGCGAGCCA GCCACATCTG GGTGCGAAAC
 3801 GCCAGGCACA AGTGAGTCTG CAACTCCCGA GTCCGGACCT GGCTCCGAGC
 3851 CTGCCACTAG CGGCTCCGAG ACTCCGGGAA CTTCCGAGAG CGCTACACCA
 3901 GAAAGCGGAC CCGGAACCAG TACCGAACCT AGCGAGGGCT CTGCTCCGGG
 3951 CAGCCCAGCC GGCTCTCCTA CATCCACGGA GGAGGGCACT TCCGAATCCG
 4001 CCACCCCGGA GTCAGGGCCA GGATCTGAAC CCGCTACCTC AGGCAGTGAG
 4051 ACGCCAGGAA CGAGCGAGTC CGCTACACCG GAGAGTGGGC CAGGGAGCCC
 4101 TGCTGGATCT CCTACGTCCA CTGAGGAAGG GTCACCAGCG GGCTCGCCCA
 4151 CCAGCACTGA AGAAGGTGCC TCGAGCGACA AAATCACA ACATGCCACC
 4201 TGCCAGCTC CAGAACTCCT GGGCGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCC
 4251 AAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACATGCG
 4301 TGGTGGTGGA CGTGAGCCAC GAAGACCCTG AGGTCAAGTT CAACTGGTAC
 4351 GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCGC GGGAGGAGCA
 4401 GTACAACAGC ACGTACCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTC CTGCACCAGG
 4451 ACTGGCTGAA TGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCAA CAAAGCCCTC
 4501 CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA
 4551 ACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GGATGAGCTG ACCAAGAACC
 4601 AGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTATCCCAG CGACATCGCC
 4651 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACGCC
 4701 TCCCGTGTTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCG
 4751 TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG
 4801 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC
 4851 GGGTAAATGA

Последовательность белка pSYN ФВ062 (ФВ D'D3-Fc без сайта тромбина в линкере) (SEQ ID NO: 199).

1 MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFNVTDFGSM
 51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
 101 TVTQGDQ RVS MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL
 151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
 201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
 251 EKTLCCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDHSA CSPVCPAGME

301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTTEPC
 351 VHSRKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD
 401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIETV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
 451 LHNSLVKLKH GAGVAMDGQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQM
 501 DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTSPG LAEPRVEDFG
 551 NAWKLHGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
 601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCEL
 651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCT SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
 701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
 751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVC PADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
 801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
 851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGEQ YVLVQDYCGS
 901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE VNVKRPMKDE
 951 THFEVVEGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
 1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI
 1051 MKQTMVDSSC RILTSDVFQD CNKLVDP EY LDVCIYDTCS CESIGDCAAF
 1101 CDTIAAYAHV CAQHGVVTV RTATLCPQSC EERNLRENGY EAEWRYNSCA
 1151 PACQVTCQHP EPLACPVCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
 1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGAPTSESA
 1251 TPESGPGSEP ATSGSETPGT SESATPESGP GSEPATSGSE TPGTSESATP
 1301 ESGPGTSTEP SEGSA PGSPA GSPTSTEEGT SESATPESGP GSEPATSGSE
 1351 TPGTSESATP ESGPGSPAGS PTSTEEGSPA GSPTSTEEGA SSDKTHTCPP
 1401 CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY
 1451 VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL
 1501 PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA
 1551 VEWESNGQPE NNYKTTTPVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM
 1601 HEALHNHYTQ KSLSLSPGK*

Нуклеотидная последовательность pSYN ФВ073 (кодирующая ФВ D1D2D'D3 - 144 АЕ XTEN-укороченный а2 сайта тромбина FVIII-Fc) (SEQ ID NO: 174).

1 ATGATTCCTG CCAGATTTGC CGGGGTGCTG CTTGCTCTGG CCCTCATTTT
 51 GCCAGGACC CTTTGTGCAG AAGGAACTCG CGGCAGGTCA TCCACGGCCC
 101 GATGCAGCCT TTTCGGAAGT GACTTCGTCA ACACCTTTGA TGGGAGCATG
 151 TACAGCTTTG CGGGATACTG CAGTTACCTC CTGGCAGGGG GCTGCCAGAA
 201 ACGCTCCTTC TCGATTATTG GGGACTTCCA GAATGGCAAG AGAGTGAGCC
 251 TCTCCGTGTA TCTTGGGGAA TTTTGTGACA TCCATTTGTT TGTCATGGT

301 ACCGTGACAC AGGGGGACCA AAGAGTCTCC ATGCCCTATG CCTCCAAAGG
 351 GCTGTATCTA GAAACTGAGG CTGGGTACTA CAAGCTGTCC GGTGAGGCCT
 401 ATGGCTTTGT GGCCAGGATC GATGGCAGCG GCAACTTTCA AGTCTGTCTG
 451 TCAGACAGAT ACTTCAACAA GACCTGCGGG CTGTGTGGCA ACTTTAACAT
 501 CTTTGCTGAA GATGACTTTA TGACCCAAGA AGGGACCTTG ACCTCGGACC
 551 CTTATGACTT TGCCAACTCA TGGGCTCTGA GCAGTGGAGA ACAGTGGTGT
 601 GAACGGGCAT CTCCTCCCAG CAGCTCATGC AACATCTCCT CTGGGGAAAT
 651 GCAGAAGGGC CTGTGGGAGC AGTGCCAGCT TCTGAAGAGC ACCTCGGTGT
 701 TTGCCCCTG CCACCTCTG GTGGACCCCG AGCCTTTTGT GGCCCTGTGT
 751 GAGAAGACTT TGTGTGAGTG TGCTGGGGGG CTGGAGTGCG CCTGCCCTGC
 801 CCTCTGGAG TACGCCCAGA CCTGTGCCCA GGAGGGAATG GTGCTGTACG
 851 GCTGGACCGA CCACAGCGCG TGCAGCCCAG TGTGCCCTGC TGGTATGGAG
 901 TATAGGCAGT GTGTGTCCCC TTGCGCCAGG ACCTGCCAGA GCCTGCACAT
 951 CAATGAAATG TGTCAGGAGC GATGCGTGGA TGGCTGCAGC TGCCCTGAGG
 1001 GACAGCTCCT GGATGAAGGC CTCTGCGTGG AGAGCACCGA GTGTCCCTGC
 1051 GTGCATTCCG GAAAGCGCTA CCCTCCCGGC ACCTCCCTCT CTCGAGACTG
 1101 CAACACCTGC ATTTGCCGAA ACAGCCAGTG GATCTGCAGC AATGAAGAAT
 1151 GTCCAGGGGA GTGCCTTGTC ACTGGTCAAT CCCACTTCAA GAGCTTTGAC
 1201 AACAGATACT TCACCTTCAG TGGGATCTGC CAGTACCTGC TGGCCCCGGA
 1251 TTGCCAGGAC CACTCCTTCT CCATTGTCAT TGAGACTGTC CAGTGTGCTG
 1301 ATGACCGCGA CGCTGTGTGC ACCCGCTCCG TCACCGTCCG GCTGCCTGGC
 1351 CTGCACAACA GCCTTGTAAG ACTGAAGCAT GGGGCAGGAG TTGCCATGGA
 1401 TGGCCAGGAC ATCCAGCTCC CCCTCCTGAA AGGTGACCTC CGCATCCAGC
 1451 ATACAGTGAC GGCCTCCGTG CGCCTCAGCT ACGGGGAGGA CCTGCAGATG
 1501 GACTGGGATG GCCGCGGGAG GCTGCTGGTG AAGCTGTCCC CCGTCTATGC
 1551 CGGGAAGACC TGCGGCCTGT GTGGGAATTA CAATGGCAAC CAGGGCGACG
 1601 ACTTCCTTAC CCCCTCTGGG CTGGCGGAGC CCCGGGTGGA GGACTTCGGG
 1651 AACGCCTGGA AGCTGCACGG GGACTGCCAG GACCTGCAGA AGCAGCACAG
 1701 CGATCCCTGC GCCCTCAACC CGCGCATGAC CAGGTTCTCC GAGGAGGCGT
 1751 GCGCGGTCCT GACGTCCCCC ACATTCGAGG CCTGCCATCG TGCCGTGAGC
 1801 CCGCTGCCCT ACCTGCGGAA CTGCCGCTAC GACGTGTGCT CCTGCTCGGA
 1851 CGGCCGCGAG TGCCTGTGCG GCGCCCTGGC CAGCTATGCC GCGGCCTGCG
 1901 CGGGGAGAGG CGTGCGCGTC GCGTGGCGCG AGCCAGGCCG CTGTGAGCTG
 1951 AACTGCCCCA AAGGCCAGGT GTACCTGCAG TCGGGGACCC CCTGCAACCT
 2001 GACCTGCCGC TCTCTCTTT ACCCGGATGA GGAATGCAAT GAGGCCTGCC
 2051 TGGAGGGCTG CTTCTGCCCC CCAGGGCTCT ACATGGATGA GAGGGGGGAC
 2101 TGCGTGCCCA AGGCCAGTG CCCCTGTTAC TATGACGGTG AGATCTTCCA
 2151 GCCAGAAGAC ATCTTCTCAG ACCATCACAC CATGTGCTAC TGTGAGGATG

2201 GCTTCATGCA CTGTACCATG AGTGGAGTCC CCGGAAGCTT GCTGCCTGAC
 2251 GCTGTCTCA GCAGTCCCCT GTCTCATCGC AGCAAAAGGA GCCTATCCTG
 2301 TCGGCCCCC ATGGTCAAGC TGGTGTGTCC CGCTGACAAC CTGCGGGCTG
 2351 AAGGGCTCGA GTGTACCAA ACGTGCCAGA ACTATGACCT GGAGTGCATG
 2401 AGCATGGGCT GTGTCTCTGG CTGCCTCTGC CCCCCGGGCA TGGTCCGGCA
 2451 TGAGAACAGA TGTGTGGCCC TGGAAAGGTG TCCCTGCTTC CATCAGGGCA
 2501 AGGAGTATGC CCCTGGAGAA ACAGTGAAGA TTGGCTGCAA CACTTGTGTC
 2551 TGTCGGGACC GGAAGTGGA CTGCACAGAC CATGTGTGTG ATGCCACGTG
 2601 CTCCACGATC GGCATGGCCC ACTACCTCAC CTTCGACGGG CTCAAATACC
 2651 TGTTCCCCCG GGAGTGCCAG TACGTTCTGG TGCAGGATTA CTGCGGCAGT
 2701 AACCCTGGGA CCTTTCGGAT CCTAGTGGGG AATAAGGGAT GCAGCCACCC
 2751 CTCAGTGAAA TGCAAGAAAC GGGTCACCAT CCTGGTGGAG GGAGGAGAGA
 2801 TTGAGCTGTT TGACGGGGAG GTGAATGTGA AGAGGCCCAT GAAGGATGAG
 2851 ACTCACTTTG AGGTGGTGGA GTCTGGCCGG TACATCATTC TGCTGCTGGG
 2901 CAAAGCCCTC TCCGTGGTCT GGGACCGCCA CCTGAGCATC TCCGTGGTCC
 2951 TGAAGCAGAC ATACCAGGAG AAAGTGTGTG GCCTGTGTGG GAATTTTGAT
 3001 GGCATCCAGA ACAATGACCT CACCAGCAGC AACCTCCAAG TGGAGGAAGA
 3051 CCCTGTGGAC TTTGGGAACT CCTGGAAAGT GAGCTCGCAG TGTGCTGACA
 3101 CCAGAAAAGT GCCTCTGGAC TCATCCCCTG CCACCTGCCA TAACAACATC
 3151 ATGAAGCAGA CGATGGTGGA TTCCTCCTGT AGAATCCTTA CCAGTGACGT
 3201 CTTCCAGGAC TGCAACAAGC TGGTGGACCC CGAGCCATAT CTGGATGTCT
 3251 GCATTTACGA CACCTGCTCC TGTGAGTCCA TTGGGGACTG CGCCGCATTC
 3301 TGCGACACCA TTGCTGCCTA TGCCCACGTG TGTGCCCAGC ATGGCAAGGT
 3351 GGTGACCTGG AGGACGGCCA CATTGTGCCC CCAGAGCTGC GAGGAGAGGA
 3401 ATCTCCGGGA GAACGGGTAT GAGGCTGAGT GGCCTATAA CAGCTGTGCA
 3451 CCTGCCTGTC AAGTCACGTG TCAGCACCTT GAGCCACTGG CCTGCCCTGT
 3501 GCAGTGTGTG GAGGGCTGCC ATGCCACTG CCCTCCAGGG AAAATCCTGG
 3551 ATGAGCTTTT GCAGACCTGC GTTGACCCTG AAGACTGTCC AGTGTGTGAG
 3601 GTGGCTGGCC GGCCTTTTGC CTCAGGAAAG AAAGTCACCT TGAATCCCAG
 3651 TGACCCTGAG CACTGCCAGA TTTGCCACTG TGATGTTGTC AACCTCACCT
 3701 GTGAAGCCTG CCAGGAGCCG GGCCTGCCAA CATCAGAGAG CGCCACCCCT
 3751 GAAAGTGGTC CCGGAGCGA GCCAGCCACA TCTGGGTCGG AAACGCCAGG
 3801 CACAAGTGAG TCTGCAACTC CCGAGTCCGG ACCTGGCTCC GAGCCTGCCA
 3851 CTAGCGGCTC CGAGACTCCG GGAACCTCCG AGAGCGCTAC ACCAGAAAGC
 3901 GGACCCGGA CCAGTACCGA ACCTAGCGAG GGCTCTGCTC CGGGCAGCCC
 3951 AGCCGGCTCT CCTACATCCA CGGAGGAGGG CACTCCGAA TCCGCCACCC
 4001 CGGAGTCAGG GCCAGGATCT GAACCCGCTA CCTCAGGCAG TGAGACGCCA
 4051 GGAACGAGCG AGTCCGCTAC ACCGAGAGT GGGCCAGGGA GCCCTGCTGG

4101 ATCTCCTACG TCCACTGAGG AAGGGTCACC AGCGGGCTCG CCCACCAGCA
 4151 CTGAAGAAGG TGCCTCGAGC GGCGGTGGAG GATCCGGTGG CGGGGGATCC
 4201 GGTGGCGGGG GATCCGGTGG CGGGGGATCC GGTGGCGGGG GATCCGGTGG
 4251 CGGGGGATCC ATTGAACCAA GAAGCTTCTC TGGCAGCGGA GGCACAAAAA
 4301 CTCACACATG CCCACCGTGC CCAGCTCCAG AACTCCTGGG CGGACCGTCA
 4351 GTCTTCCTCT TCCCCCAAAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC
 4401 CCCTGAGGTC ACATGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG
 4451 TCAAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA
 4501 AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT
 4551 CACCGTCCTG CACCAGGACT GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG
 4601 TCTCCAACAA AGCCCTCCCA GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAGCC
 4651 AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA
 4701 TGAGCTGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT
 4751 ATCCCAGCGA CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC
 4801 AACTACAAGA CCACGCCTCC CGTGTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCCT
 4851 CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT
 4901 TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG
 4951 AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAATGA

Последовательность белка pSYN ФВ073 (ФВ D1D2D'D3- 144 AE XTEN- укороченный а2 сайта тромбина-Fc) (SEO ID NO:175).

1 MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFNVTFDGSM
 51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
 101 TVTQGDQRV MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL
 151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
 201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
 251 EKTLCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDHSA CSPVCPAGME
 301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLEDEG LCVESTTEPC
 351 VHSGKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD
 401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIETV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
 451 LHNSLVKLKH GAGVAMDGQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQM
 501 DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
 551 NAWKLHGDCQ DLQKQHS DPCALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
 601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCCL
 651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
 701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD

751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
 801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
 851 CRDRKWNTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ YVLVQDYCGS
 901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTLVE GGEIELFDGE VNVKRPMKDE
 951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
 1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI
 1051 MKQTMVDSSC RILTSDVFQD CNKLVDPPEY LDVCIYDTCS CESIGDCAAF
 1101 CDTIAAYAHV CAQHGVVTV RTATLCPQSC EERNLRENGY EAEWRYNSCA
 1151 PACQVTCQHP EPLACPVQCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
 1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP GAPTSESATP
 1251 ESGPGSEPAT SGSETPGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP GTSESATPES
 1301 GPGTSTEPSE GSAPGSPAGS PTSTEEGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP
 1351 GTSESATPES GPGSPAGSPT STEEGSPAGS PTSTEEGASS GGGGSGGGGS
 1401 GGGGSGGGGS GGGGSGGGGS IEPFSFGSG GDKTHTCPPC PAPELLGGPS
 1451 VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT
 1501 KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA
 1551 KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN
 1601 NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK
 1651 SLSLSPGK*

Предшествующее описание конкретных вариантов реализации изобретения настолько полно раскрывает общий характер изобретения, что другие могут, применяя знания в данной области техники, легко модифицировать и/или адаптировать для различных применений такие конкретные варианты реализации изобретения, без излишнего экспериментирования, не отступая от общей концепции настоящего изобретения. Таким образом, такие адаптации и модификации предназначены для того, чтобы находиться в пределах смысла и диапазона эквивалентов раскрытых вариантов реализации изобретения, основанных на обучении и руководстве, представленном в данном документе. Следует иметь в виду, что фразеология и терминология используется здесь в целях описания, а не ограничения, таким образом, терминология или фразеология настоящего описания должна интерпретироваться специалистами в данной области техники с учетом представленных указаний и руководства.

Другие варианты реализации настоящего изобретения понятны специалистам в данной области с учетом настоящего описания и практического осуществления настоящего изобретения, описанного в настоящем документе. Предполагается, что описание и примеры следует рассматривать только как иллюстративные, причем истинный объем и сущность настоящего изобретения указаны в следующей формуле изобретения.

Все патенты и публикации, цитируемые в данном описании в полном объеме, включены в текст путем ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Химерный белок, содержащий

(i) первую полипептидную цепь, которая содержит в направлении от ее N-конца до ее C-конца

(a) белок фактора VIII ("FVIII"), содержащий N-концевую часть и C-концевую часть;

причем N-концевая часть белка FVIII содержит домен A1, домен A2 и часть домена B полноразмерного зрелого FVIII (SEQ ID NO: 65);

причем N-концевая часть содержит аминокислотную последовательность из остатков 1-745 из SEQ ID NO: 65, слитую с первой последовательностью XTEN, встроенной непосредственно ниже аминокислоты 745 из SEQ ID NO: 65; и

причем C-концевая часть содержит домен A3, домен C1 и домен C2 таким образом, чтобы C-концевая часть содержала остатки 1690-2332 из SEQ ID NO: 65;

(b) первый фрагмент Fc, причем первая последовательность XTEN содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и

(ii) вторую полипептидную цепь, которая содержит в направлении от ее N-конца до ее C-конца

(a) белок фактора фон Виллебранда ("ФВ"), содержащий домен D' и домен D3 из ФВ, причем белок ФВ содержит аланиновую замену в остатках, соответствующих остаткам 1099 и 1142 из SEQ ID NO: 21;

(b) вторую последовательность XTEN, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, причем вторая последовательность XTEN содержит менее 288 аминокислотных остатков;

(c) расщепляемый линкер, содержащий область a2 FVIII, которая содержит аминокислотную после-

довательность от Glu720 до Arg740, соответствующую SEQ ID NO: 65, причем область a2 поддается расщеплению тромбином; и

(d) второй фрагмент Fc, причем первая полипептидная цепь соединена со второй полипептидной цепью через первый фрагмент Fc и второй фрагмент Fc.

2. Химерный белок по п.1, отличающийся тем, что С-концевая часть белка FVIII содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 95% идентичную остаткам 1641-2332 из SEQ ID NO: 65.

3. Химерный белок по п.2, отличающийся тем, что вторая последовательность XTEN имеет длину около 144 аминокислотных остатков.

4. Химерный белок по п.3, отличающийся тем, что вторая последовательность XTEN состоит из аминокислотной последовательности, имеющей длину от 144 аминокислотных остатков до 287 аминокислотных остатков.

5. Химерный белок по п.3, отличающийся тем, что первый фрагмент Fc соединен со вторым фрагментом Fc ковалентной связью.

6. Химерный белок по п.5, отличающийся тем, что первый фрагмент Fc соединен со вторым фрагментом Fc дисульфидной связью.

7. Химерный белок по п.1, отличающийся тем, что первый фрагмент Fc и второй фрагмент Fc являются одинаковыми.

8. Химерный белок по п.7, отличающийся тем, что первый фрагмент Fc и второй фрагмент Fc являются производными от IgG1 человека.

9. Химерный белок по п.8, отличающийся тем, что белок ФВ состоит из домена D' и домена D3.

10. Химерный белок по п.8, отличающийся тем, что белок ФВ дополнительно содержит домен D1 и D2 из ФВ.

11. Химерный белок по п.10, отличающийся тем, что белок ФВ дополнительно содержит сигнальный пептид ФВ.

12. Химерный белок по п.11, отличающийся тем, что белок FVIII дополнительно содержит сигнальный пептид FVIII.

13. Химерный белок по п.7, отличающийся тем, что первый фрагмент Fc соединен со вторым фрагментом Fc двумя дисульфидными связями.

14. Химерный белок по п.1, отличающийся тем, что расщепляемый линкер содержит область a2 FVIII, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную с SEQ ID NO: 106.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая химерный белок по любому из пп.1-14 и фармацевтически приемлемый носитель.

16. Химерный белок, содержащий

(i) первую полипептидную цепь, которая содержит в направлении от ее N-конца до ее С-конца

(а) белок фактора VIII ("FVIII"), содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична с SEQ ID NO: 67, с первой последовательностью XTEN, встроенной непосредственно ниже остатка, соответствующего остатку 745 из SEQ ID NO: 67; и

(b) первый фрагмент Fc;

причем первая последовательность XTEN содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; и

(ii) вторую полипептидную цепь, которая содержит в направлении от ее N-конца до ее С-конца

(а) белок фактора фон Виллебранда ("ФВ"), содержащий домен D' и домен D3 из ФВ, причем белок ФВ содержит аланиновую замену в остатках, соответствующих остаткам 1099 и 1142 из SEQ ID NO: 21;

(b) вторую последовательность XTEN, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, причем вторая последовательность XTEN содержит менее 288 аминокислотных остатков;

(с) расщепляемый линкер, содержащий область a2 FVIII, которая содержит аминокислотную последовательность от Glu720 до Arg740, соответствующую SEQ ID NO: 65, причем область a2 поддается расщеплению тромбином; и

(d) второй фрагмент Fc, причем первый фрагмент Fc соединен со вторым фрагментом Fc дисульфидной связью.

17. Химерный белок по п.16, отличающийся тем, что вторая последовательность XTEN имеет длину около 144 аминокислотных остатков.

18. Химерный белок по п.16, отличающийся тем, что вторая последовательность XTEN состоит из аминокислотной последовательности, имеющей длину от 144 аминокислотных остатков до 287 аминокислотных остатков.

19. Химерный белок по п.16, отличающийся тем, что первый фрагмент Fc и второй фрагмент Fc являются одинаковыми.

20. Химерный белок по п.19, отличающийся тем, что первый фрагмент Fc и второй фрагмент Fc являются производными от IgG1 человека.

21. Химерный белок по п.20, отличающийся тем, что белок ФВ состоит из домена D' и домена D3.

22. Химерный белок по п.20, отличающийся тем, что белок ФВ дополнительно содержит домен D1

и D2 из ФВ.

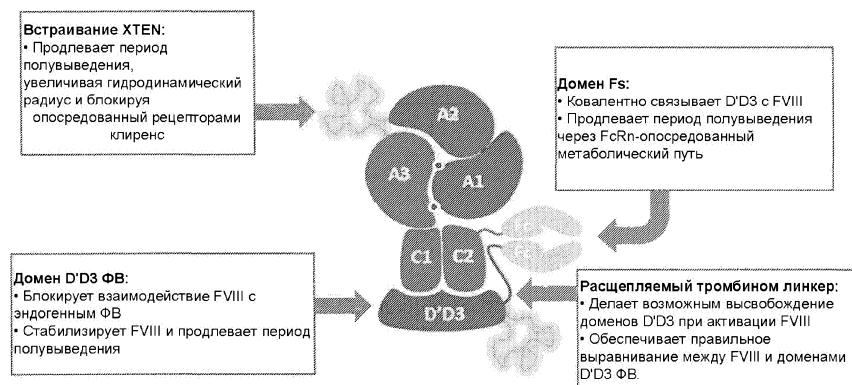
23. Химерный белок по п.22, отличающийся тем, что белок ФВ дополнительно содержит сигнальный пептид ФВ.

24. Химерный белок по п.23, отличающийся тем, что белок FVIII дополнительно содержит сигнальный пептид FVIII.

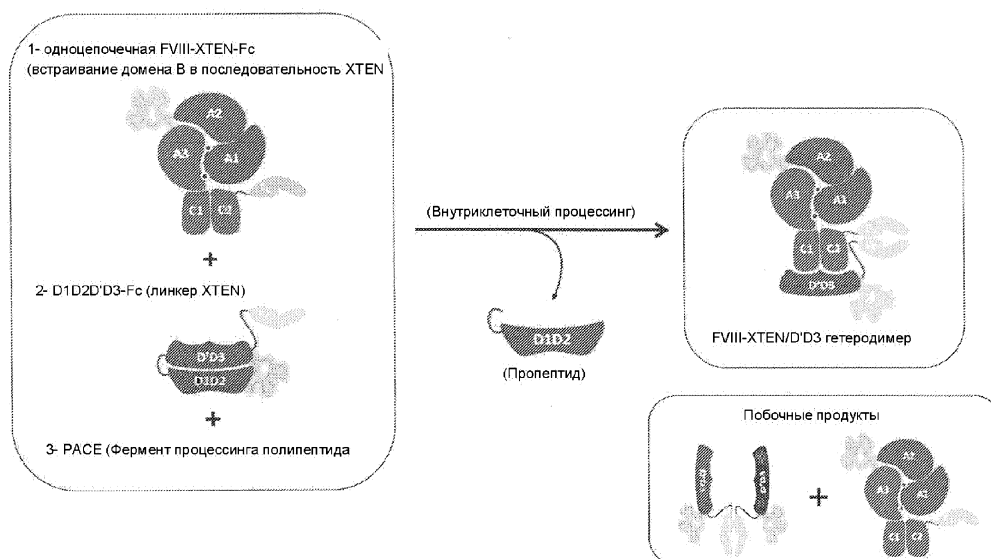
25. Химерный белок по п.24, отличающийся тем, что первый фрагмент Fc соединен со вторым фрагментом Fc двумя дисульфидными связями.

26. Химерный белок по п.17, отличающийся тем, что расщепляемый линкер содержит область $\alpha 2$ FVIII, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную с SEQ ID NO: 106.

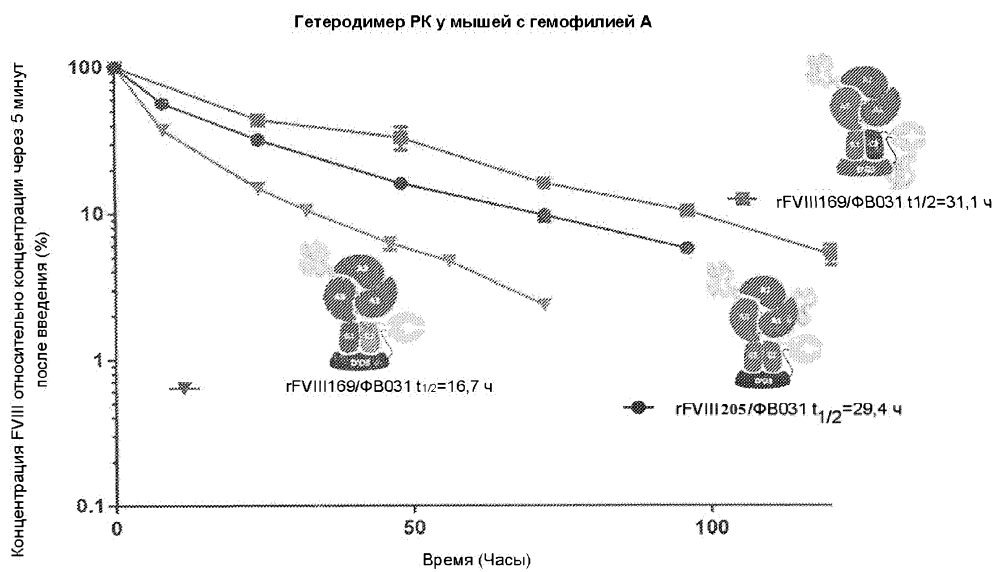
27. Фармацевтическая композиция, содержащая химерный белок по любому из пп.16-27 и фармацевтически приемлемый носитель.



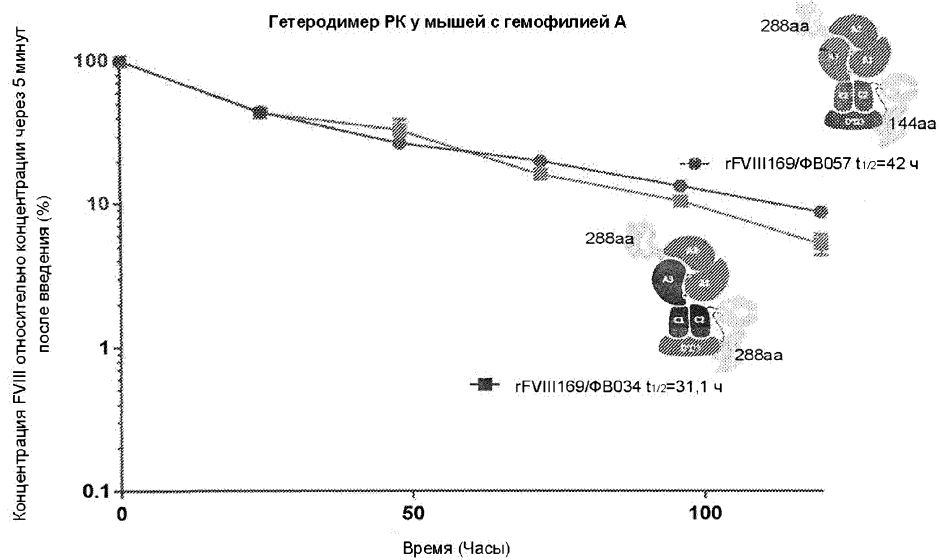
Фиг. 1



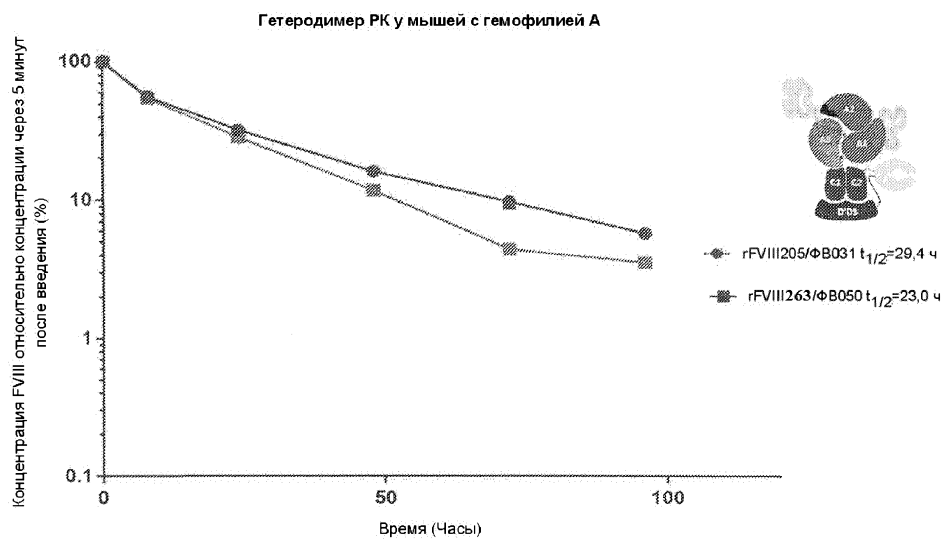
Фиг. 2



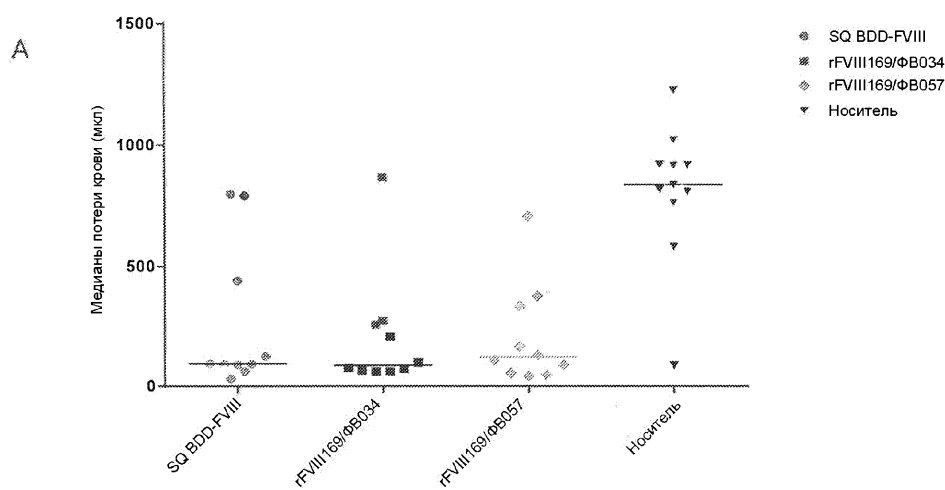
Фиг. 3



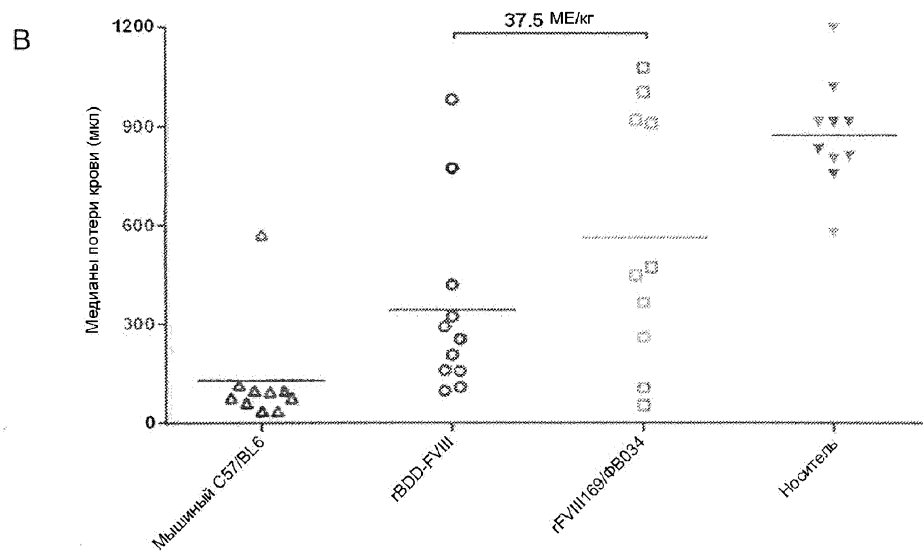
Фиг. 4



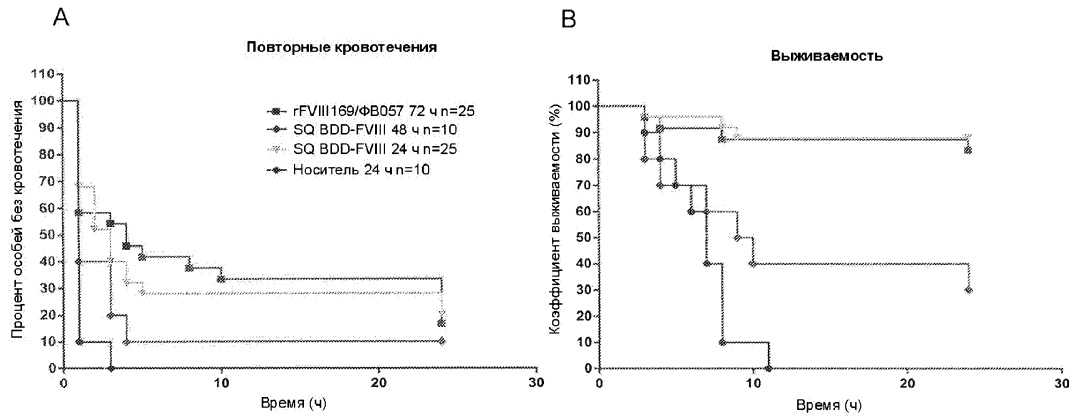
Фиг. 5



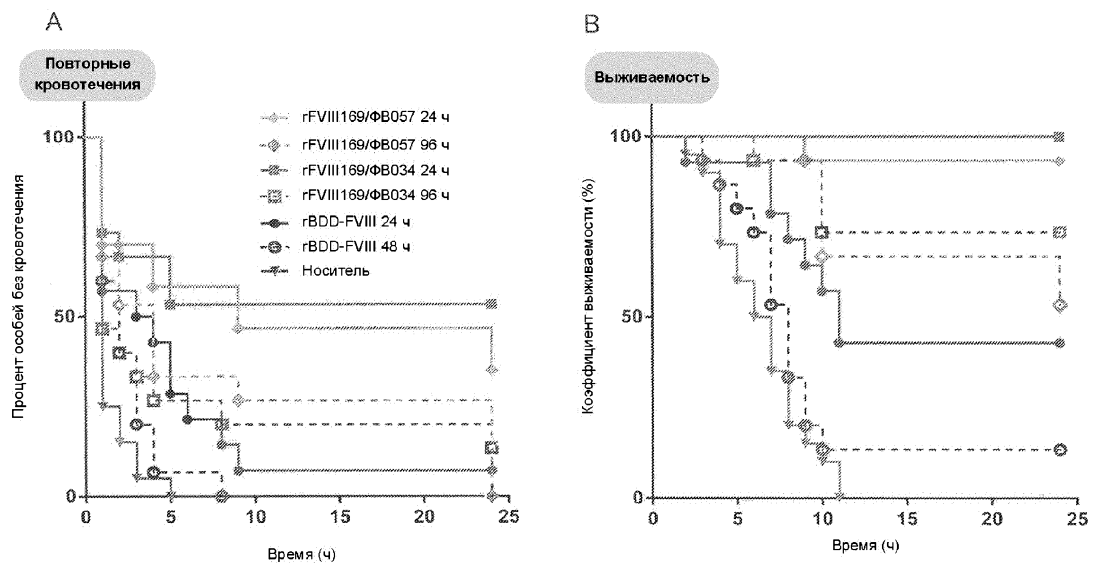
Фиг. 6А



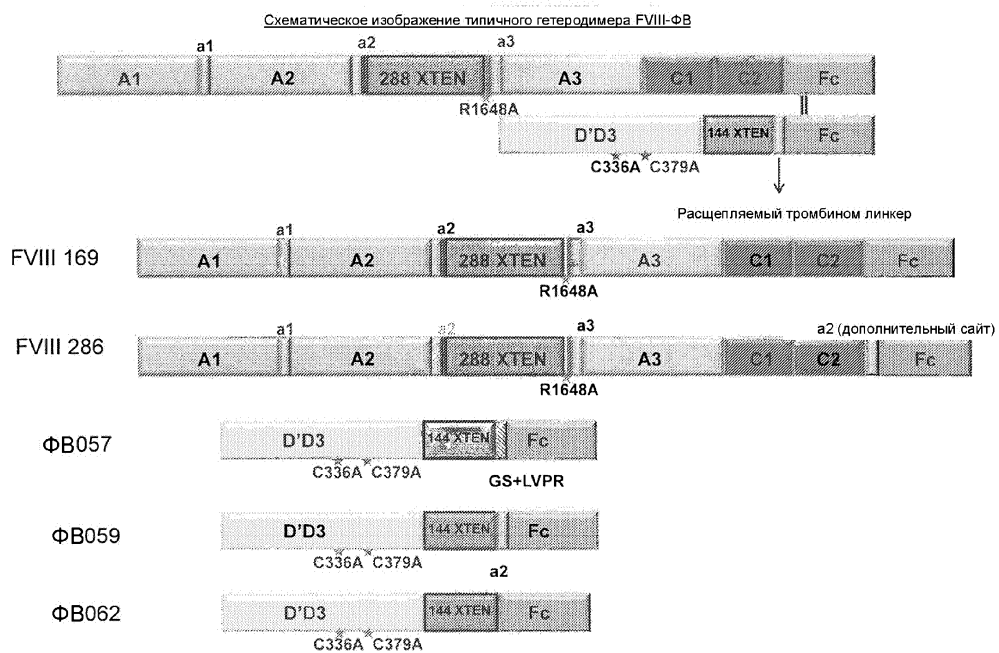
Фиг. 6В



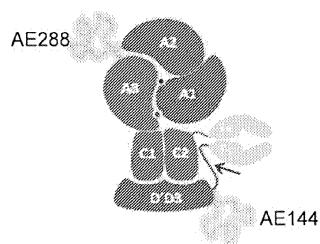
Фиг. 7



Фиг. 8



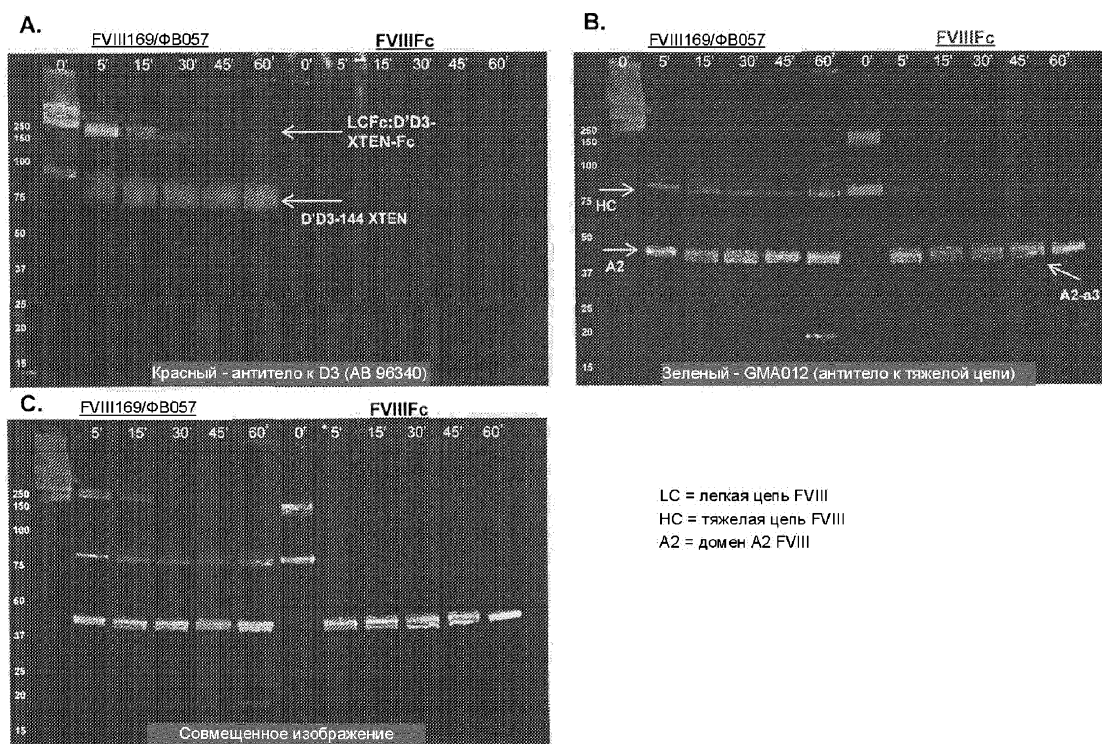
Фиг. 9



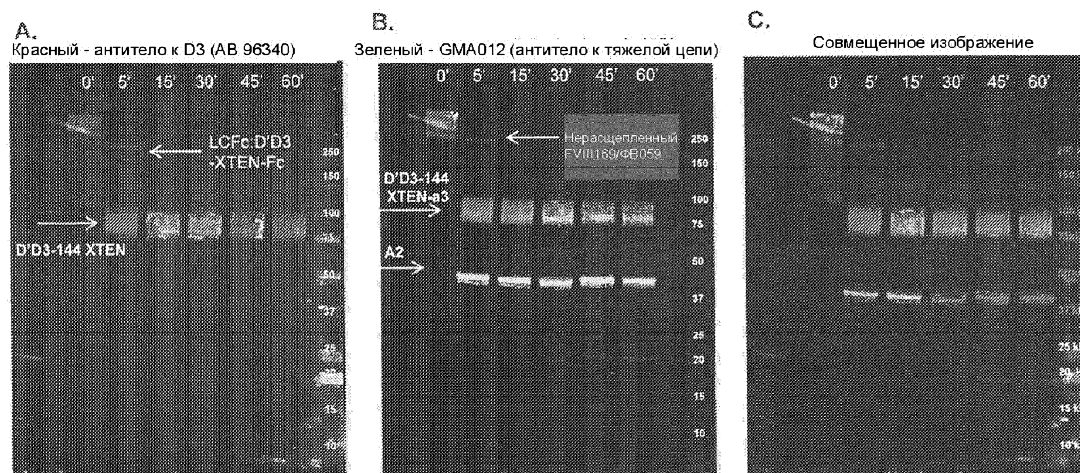
FVIII169/ФВ057 - сайт LVPR в линкере
 FVIII169/ФВ059 - а2 сайт в линкере
 FVIII169/ФВ059а - укороченный сайт а2 в линкере
 FVIII169/ФВ073 - фрагмент а2 в линкере

Комплекс ~312 кДа

Фиг. 10

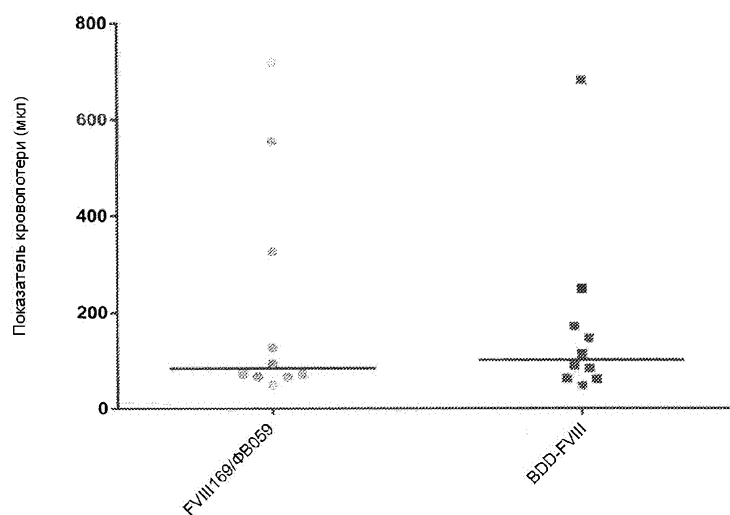


Фиг. 11



Фиг. 12

Мгновенная эффективность FVIII169/ФВ059 у мышей с гемофилией А при 75 МЕ/кг



Фиг. 13



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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