

PATENTOVÝ SPIS

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSL OVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2000-3282**
(22) Přihlášeno: **10.03.1999**
(30) Právo přednosti: **10.03.1998 US 1998/37601**
(40) Zveřejněno: **17.01.2001**
(Věstník č. 1/2001)
(47) Uděleno: **18.08.2009**
(24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **23.09.2009**
(Věstník č. 38/2009)
(86) PCT číslo: **PCT/US1999/005193**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 1999/046274**

(11) Číslo dokumentu:

300 959

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C07H 21/04 (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
A61K 38/37 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

US 5 663 060; US 5 563 045; WO 97/49725.

(73) Majitel patentu:

EMORY UNIVERSITY, Atlanta, CA, US

(72) Původce:

Lollar John S., Decatur, GA, US

(74) Zástupce:

Ing. Eduard Hakr, Přístavní 24, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu:

**DNA kódující faktor VIII, proteinový produkt
exprimovaný touto DNA a způsob přípravy
faktoru VIII**

(57) Anotace:

Aminokyseliny ve specifických místech lidského faktoru VIII vytvářejí interakce s inhibičními protilátkami u pacientů s hemofilií, u kterých se vytvořily tyto protilátky po léčení faktorem VIII. Vynález poskytuje modifikovaný faktor VIII, kde je provedena substituce aminokyseliny v jednom nebo několika specifických místech. Modifikovaný faktor VIII není inhibován inhibičními protilátkami namířenými proti ep itopům domén A2 nebo C2. Modifikovaný faktor VIII je užitečný pro jedince trpící hemofilií, aby se zabránilo vzniku nebo působení inhibičních protilátek.

CZ 300959 B6

DNA kódující faktor VIII, proteinový produkt exprimovaný touto DNA a způsob přípravy faktoru VIII

5 Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká hybridního faktoru VIII, který má aminokyselinovou sekvenci lidského a zvířecího faktoru VIII, nebo má lidskou aminokyselinovou sekvenci faktoru VIII a sekvenci jinou než sekvenci faktoru VIII, a také se týká způsobu přípravy a použití tohoto faktoru.

Dosavadní stav techniky

15 Koagulace (srážení) krve začíná tím, že se destičky přichycují na řez ve stěně poraněné krevní cévy v místě poškození. Pak jsou v kaskádě enzymaticky regulovaných reakcí rozpustné molekuly fibrinogenu přeměněny působením enzymu trombinu na nerozpustné řetězce fibrinu, které drží destičky pohromadě ve sraženině. V každém kroku této kaskády je proteinový prekursor přeměněn na proteázu, která štěpí následující proteinový prekursor v řadě. Ve většině kroků jsou nutné kofaktory.

Faktor VIII cirkuluje jako inaktivní prekursor v krvi, vázaný těsně a nekovalentním způsobem na von Willebrandův faktor. Faktor VIII je proteolyticky aktivován trombinem nebo faktorem Xa, který ho disociuje od von Willebrandova faktoru a aktivuje jeho prokoagulační funkce v kaskádě. 25 Ve své aktivní formě je proteinový faktor VIIIa kofaktorem, který zvyšuje katalytickou účinnost faktoru IXa pro aktivaci faktoru X až o několik řádů.

Lidé s nedostatkem faktoru VIII nebo s protilátkami proti faktoru VIII, kteří nejsou léčeni faktorem VIII, trpí nekontrolovatelným vnitřním krvácením, které způsobuje celou řadu vážných symptomů od zánětlivých reakcí v kloubech až po předčasná úmrtí. Lidé trpící silnou hemofilií (hemofilici), kterých je v USA asi 10 000, mohou být léčeni infuzemi lidského faktoru VIII, který obnoví normální koagulační schopnost krve, pokud je podáván v dostatečném množství a frekvenci. Klasická definice faktoru VIII je skutečně taková, že je to látka přítomná v normální krevní plazmě, která opraví defekty srážlivosti v plazmě pocházející z jedinců trpících hemofilií A.

35 Rozvoj protilátek (inhibičních protilátek neboli inhibitorů), které inhibují aktivitu faktoru VIII, je vážnou komplikací při léčení pacientů trpících hemofilií. Autoprotilátky se vyvíjejí asi u 20 % pacientů s hemofilií A jako reakce na terapeutické infuze faktoru VIII. U dříve neléčených pacientů s hemofilií A, kteří tvoří inhibitory, se inhibitor vyvine přibližně za jeden rok léčení. Navíc autoprotilátky, které inaktivují faktor VIII, se příležitostně vyvíjejí i u jedinců s předtím normální hladinou faktoru VIII. Když je titr inhibitoru dostatečně nízký, lze zvládat potíže zvyšujícími se dávkami faktoru VIII. Avšak často je titr inhibitoru tak vysoký, že ho nelze překonat dávkami faktoru VIII. Alternativní strategií je obejít potřebu faktoru VIII v průběhu normální hemostázy užitím komplexních přípravků faktoru IX (např. KONYNE[®], Proplex[®]) nebo 45 rekombinantním lidským faktorem VIIIa. Navíc jelikož prasečí faktor VIII má obvykle podstatně nižší reaktivitu s inhibitory než lidský faktor VIII, užívá se přípravky obsahující částečně purifikovaný prasečí faktor VIII ((HYATEC[®]). Mnoho pacientů, u kterých se vyvinuly inhibiční protilátky k lidskému faktoru VIII, bylo úspěšně léčeno prasečím faktorem VIII, a tolerovalo tuto léčbu po dlouhý čas. Avšak podávání prasečího faktoru VIII není úplné řešení, neboť i na prasečí faktor VIII se po jedné nebo několika infuzích mohou vyvinout inhibitory.

Několik přípravků faktoru VIII získaného z plazmy různé čistoty je komerčně dostupných pro 55 léčení hemofilie A. Patří k nim částečně purifikovaný faktor VIII získaný z plazmy sloučené z několika dárců, která je ošetřena tepelně a také detergentem proti virům, ale obsahuje značné množství antigenních proteinů, faktor VIII purifikovaný pomocí monoklonálních protilátek, který

obsahuje nízkou hladinu antigenních nečistot a virových kontaminací, a nakonec rekombinantní lidský faktor VIII, který je nyní klinicky zkoušen. Naneštěstí je lidský faktor VIII za fyziologických koncentrací a pH nestabilní, je přítomen v krvi v mimořádně nízké koncentraci (0,2 µg/ml plazmy) a má velmi nízkou specifickou koagulační aktivitu.

5

Hemofilici vyžadují denní náhradu faktoru VIII, aby se zabránilo krvácení a výsledné deformující artropatii hemofiliků. Avšak dodávky jsou nedostatečné a objevují se problémy při terapeutickém použití v důsledku obtíží při izolaci a purifikaci, imunigenicity, a také nutnosti odstranit riziko infekce AIDS a hepatitidy. Avšak ani použití rekombinantního lidského faktoru VIII nebo částečně purifikovaného prasečího faktoru VIII neřeší zcela tyto problémy.

10

Problémy spojené s všeobecně užívanými komerčně dostupnými přípravky faktoru VIII získanými z plazmy stimulovaly významný zájem na vývoji lepšího přípravku faktoru VIII. Existuje potřeba účinnější molekuly faktoru VIII, tak aby jedna molekula poskytla více koagulační aktivity, aby přitom tato molekula faktoru VIII byla stabilní při vybraném rozsahu pH a fyziologických koncentracích, aby dále měla sníženou schopnost indukovat tvorbu inhibičních protilátek a ještě navíc, aby tato molekula faktoru VIII unikla rozpoznání imunitním systémem pacienta, který již vyvinul protilátky proti lidskému faktoru VIII.

15

20

Předkládaný vynález proto poskytuje faktor VIII, který napravuje hemofilii u pacientů s deficitem faktoru VIII nebo s inhibitory faktoru VIII.

Předkládaný vynález se dále týká léčení hemofilie.

Vynález také poskytuje faktor VIII, který je stabilní při vybraném pH a fyziologické koncentraci.

25

Předkládaný vynález poskytuje faktor VIII, který má vyšší koagulační aktivitu než lidský faktor VIII.

A dále vynález poskytuje faktor VIII, proti kterému se tvoří méně protilátek.

Podstata vynálezu

30

Předkládaný vynález poskytuje izolovanou purifikovanou hybridní molekulu faktoru VIII a její fragmenty s koagulační aktivitou, včetně hybridního faktoru VIII, který má aminokyselinovou sekvenci faktoru VIII odvozenou z člověka a prasete nebo jiného savce odlišného od člověka (dále označovaného stručně jako „zvíře“). A také, ve druhém provedení vynálezu, včetně hybridního ekvivalentu faktoru VIII, který má aminokyselinovou sekvenci faktoru VIII odvozenou z člověka nebo zvířete nebo obou a aminokyselinovou sekvenci, která nemá žádnou sekvenční identitu s faktorem VIII (aminokyselinová sekvence jiná než sekvence faktoru VIII), výhodně substituovanou v antigenním a/nebo imunogenním úseku faktoru VIII. Odborník sezná, že na základě předkládaného vynálezu je možno připravit četné konstrukty hybridního faktoru VIII, jako je např. (příčemž tento výčet není omezující) lidský/zvířecí faktor VIII s vyšší koagulační aktivitou než má lidský faktor VIII („vyšší koagulační aktivita“), neimmunogenní lidský/ekvivalentní faktor VIII, neantigenní lidský/ekvivalentní faktor VIII nebo lidský/zvířecí faktor VIII, neimmunogenní lidský/zvířecí nebo lidský/ekvivalentní faktor VIII mající vyšší koagulační aktivitu, neantigenní lidský/zvířecí nebo lidský/zvířecí/ekvivalentní faktor VIII mající vyšší koagulační aktivitu, neantigenní neimmunogenní lidský/ekvivalentní a/nebo lidský/zvířecí/ekvivalentní faktor VIII, a neantigenní neimmunogenní lidský/zvířecí/ekvivalentní faktor VIII mající vyšší koagulační aktivitu.

45

50

Molekula hybridního faktoru VIII je připravena izolací a rekombinací podjednotek nebo domén lidského a zvířecího faktoru VIII, nebo metodami genového inženýrství z genů lidského a zvířecího faktoru VIII.

Ve výhodném provedení předkládaného vynálezu jsou metody genového inženýrství užity k náhradě elementů lidského faktoru VIII příslušnými elementy zvířecího faktoru VIII, čímž

vznikne hybridní molekula lidského/zvířecího faktoru VIII. V druhém výhodném provedení vynálezu jsou metody genového inženýrství užity k nahrazení jedné nebo několika aminokyselin v lidském nebo zvířecím faktoru VIII nebo v hybridním lidském/zvířecím faktoru VIII aminokyselinami, které nemají známou sekvenční identitu s faktorem VIII, výhodně sekvencí aminokyselin, která má menší imunoreaktivitu s přirozeně se vyskytujícími inhibičními protilátkami proti faktoru VIII (neantigenní aminokyselinové sekvence) a/nebo je méně náchylná k vyvolání tvorby protilátek proti faktoru VIII (neimunogenní aminokyselinová sekvence) než sekvence lidského faktoru VIII. Příkladem aminokyselinové sekvence, která může být užita k nahrazení imunogenní nebo antigenní sekvence je sekvence alaninových zbytků.

Alternativně, jedna nebo několik domén nebo částečných domén faktoru VIII jsou izolovány a purifikovány z lidské nebo zvířecí plazmy a hybridní lidský/zvířecí faktor VIII se připraví smícháním domén nebo částečných domén z jednoho druhu s doménami nebo částečnými doménami druhého druhu. Hybridní molekuly se pak izolují iontovou výměnnou chromatografií.

Vynález popisuje způsoby přípravy vysoce purifikovaného faktoru VIII, které obsahují následující kroky:

- a) izolace podjednotek lidského faktoru VIII získaného z plazmy a izolace podjednotek zvířecího faktoru VIII získaného z plazmy, po které následuje rekonstituce koagulační aktivity smícháním lidských a zvířecích podjednotek, a dále následuje izolace hybridního lidského/zvířecího faktoru VIII iontovou výměnnou chromatografií,
- b) izolace domén nebo částečných domén lidského faktoru VIII získaného z plazmy a domén nebo částečných domén zvířecího faktoru VIII získaného z plazmy, po které následuje rekonstituce koagulační aktivity smícháním lidských a zvířecích domén, a dále následuje izolace hybridního lidského/zvířecího faktoru VIII iontovou výměnnou chromatografií,
- c) konstrukce domén nebo částečných domén zvířecího faktoru VIII technologií rekombinantní DNA a rekombinantní výměna domén zvířecího a lidského faktoru VIII, aby vznikla hybridní molekula lidského/zvířecího faktoru VIII s koagulační aktivitou,
- d) vytvoření hybridního lidského/zvířecího faktoru VIII nahrazením specifických aminokyselinových zbytků faktoru VIII jednoho druhu odpovídajícími jedinečnými aminokyselinovými zbytky faktoru VIII druhého druhu, nebo
- e) vytvoření hybridního ekvivalentu molekuly faktoru VIII mající lidskou nebo zvířecí aminokyselinovou sekvenci nebo obě, kde specifické aminokyselinové zbytky faktoru VIII jsou nahrazeny aminokyselinovými zbytky, které nemají žádnou známou sekvenční identitu s faktorem VIII, metodou místně cílené mutageneze.

Stanovení celé DNA sekvence kódující prasečí faktor VIII, která je zde uvedena, poprvé umožnilo syntézu prasečího faktoru VIII plné délky expresí DNA kódující prasečí faktor VIII ve vhodné hostitelské buňce. Purifikovaný rekombinantní prasečí faktor VIII je proto jedním aspektem předkládaného vynálezu. DNA kódující každou z domén prasečího faktoru VIII stejně tak jako každý její specifický fragment mohou být podobně exprimovány, buďto samostatně, nebo v kombinaci s DNA kódující lidský faktor VIII, čímž se vytvoří hybridní lidský/zvířecí faktor VIII popsáný v předkládaném vynálezu. Kromě toho prasečí faktor VIII (fVIII) mající deletovanou (odstraněnou) celou nebo část B-domény (prasečí fVIII bez B domény) je dostupný jako další aspekt předkládaného vynálezu, a sice užitím exprese DNA kódující prasečí fVIII, která má delecí jednoho nebo několika kodonů v B-doméně.

Některá provedení hybridního nebo hybridního ekvivalentního faktoru VIII podle předkládaného vynálezu mají specifickou aktivitu vyšší než prasečí faktor VIII. Některá provedení hybridního nebo hybridního ekvivalentního faktoru VIII mají stejnou nebo nižší imunoreaktivitu s inhibičními protilátkami proti faktoru VIII a/nebo menší imunogenicitu pro člověka nebo zvíře, ve srovnání s lidským nebo prasečím faktorem VIII.

Předkládaný vynález také poskytuje farmaceutický přípravek pro léčení pacientů trpících deficiencí faktoru VIII, který obsahuje hybridní nebo hybridní ekvivalentní faktor VIII.

Popis obrázků

- 5 Obrázky 1A až 1H společně poskytují porovnání sekvencí nukleových kyselin lidského, prasečího a myšího faktoru VIII.

Podrobný popis vynálezu

- Pokud není výslovně uvedeno jinak, termín „faktor VIII“ v předkládané přihlášce označuje
 10 jakoukoliv funkční proteinovou molekulu faktoru VIII z jakéhokoli zvířete, jakýkoliv hybridní faktor VIII nebo modifikovaný faktor VIII, termíny „hybridní faktor VIII“ nebo „hybridní protein“ označují jakoukoliv funkční proteinovou molekulu faktoru VIII nebo její fragment obsahující aminokyselinovou sekvenci faktoru VIII člověka, prasete a/nebo jiného druhu savce kromě člověka nebo prasete. K takovým kombinacím patří (příčemž tento výčet není omezující)
 15 jakýkoliv z hybridních molekul faktorů VIII nebo jejich fragmentů: 1) lidská/prasečí, 2) lidská/savčí kromě lidské a prasečí, jako např. lidská/myší, 3) prasečí/savčí kromě lidské a prasečí, jako např. myší/psí. K takovým kombinacím patří také např. hybridní ekvivalentní molekuly faktoru VIII nebo jejich fragmenty, jak budou definovány dále, obsahující aminokyselinovou sekvenci faktoru VIII hybridního, lidského, prasečího, savčího jiného než lidského, savčího jiného než
 20 prasečího původu, kde byla provedena substituce sekvencí, která nemá žádnou známou sekvenční identitu s faktorem VIII. K takovým hybridním kombinacím patří také aminokyselinová sekvence faktoru VIII odvozená z více než dvou druhů, jako je např. lidská/prasečí/myší, nebo ze dvou a více druhů, kde byla provedena substituce sekvencí, která nemá žádnou známou sekvenční identitu s faktorem VIII. Pokud není výslovně uvedeno jinak, termín „hybridní faktor VIII“
 25 zahrnuje i fragmenty hybridního faktoru VIII, které mohou být užity, jak bude popsáno dále v jednom provedení vynálezu, jako sondy pro výzkumné účely nebo jako diagnostická činidla.

- Termín „savčí faktor VIII“ v tomto popisu zahrnuje faktor VIII s aminokyselinovou sekvencí odvozenou z kteréhokoli savce kromě člověka. Termín „zvíře“ zde označuje prase a jakéhokoli
 30 jiného savce kromě člověka.

- Termín „fúzní protein“ nebo „fúzní faktor VIII nebo jeho fragment“ označují produkt hybridního genu, kde je kódující sekvence pro jeden protein extenzivně změněna, např. fúzí její části s kódující sekvencí druhého proteinu z jiného genu, aby vznikl hybridní gen, který kóduje fúzní protein.
 35 Fúzní protein je tedy v tomto popisu podsoubor celého souboru hybridních proteinů faktoru VIII zde popisovaných.

- „Odpovídající“ sekvence nukleové kyseliny, nebo aminokyselinová sekvence nebo obě, je sekvence přítomná v místě molekuly faktoru VIII nebo hybridního faktoru VIII nebo jeho fragmentu, které má stejnou strukturu a/nebo funkci jako místo molekuly faktoru VIII jiného druhu, ačkoliv počet nukleotidů nebo aminokyselin nemusí být nutně identický. Sekvence „odpovídající“ jiné sekvenci faktoru VIII v podstatě odpovídá takové sekvenci, a hybridizuje za stringentních podmínek s takovou sekvencí, která je uvedena v tomto popisu vynálezu. Sekvence „odpovídající“ jiné sekvenci faktoru VIII zahrnuje také sekvenci, která vede k expresi faktoru VIII nebo
 40 hybridního prokoagulačního faktoru podle předkládaného vynálezu nebo jeho fragmentu a hybridizovala by se sekvencí podle vynálezu nebýt redundance v genetickém kódu.

- „Jedinečná“ aminokyselina nebo aminokyselinový zbytek nebo aminokyselinová sekvence znamená aminokyselinovou sekvenci nebo zbytek v molekule faktoru VIII jednoho druhu, která
 50 je odlišná od homologního zbytku nebo sekvence v molekule faktoru VIII jiného druhu.

„Specifická aktivita“ označuje aktivitu, která napraví koagulační defekt v plazmě s nedostatkem lidského faktoru VIII. Specifická aktivita je měřena v jednotkách srážlivosti krve na miligram

celkového proteinu faktoru VIII ve standardním testu, kde se koagulační čas lidské plazmy deficitní na faktor VIII srovnává s koagulačním časem normální lidské plazmy. Jedna jednotka aktivity faktoru VIII je aktivita přítomná v jednom mililitru normální lidské plazmy. V testu čím je kratší čas vytvoření sraženiny tím větší je aktivita faktoru VIII, který je testován. Hybridní lidský/prasečí faktor VIII projevuje koagulační aktivitu v testu na lidský faktor VIII. Tato aktivita, stejně jako aktivita ostatních molekul hybridního faktoru VIII nebo jejich fragmentů, je menší, shodná nebo i větší než aktivita faktoru VIII získaného z plazmy nebo rekombinantního faktoru VIII.

Nukleotidová sekvence cDNA lidského faktoru VIII a predikovaná aminokyselinová sekvence jsou zde uvedeny jako sekvence id. č. 1 a sekvence id. č. 2. Faktor VIII je syntetizován jako jednořetězcový protein přibližné velikosti 300 kDa s vnitřní sekvenční homologií, která definuje sekvenci „domény“ $\text{NH}_2\text{-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH}$. V molekule faktoru VIII termín „doména“ označuje souvislou sekvenci aminokyselin, která je definována vnitřní aminokyselinovou identitou a místy proteolytického štěpení trombinem. Pokud není uvedeno jinak, domény faktoru VIII zahrnují následující aminokyselinové zbytky, když je sekvence přiřazena aminokyselinové sekvenci lidského faktoru VIII (sekvence id. č. 2): A1, zbytky Ala1-Arg372, A2, zbytky Ser373-Arg740, B, zbytky Ser741-Arg1648, A3, zbytky Ser1690-Ile2032, C1, zbytky Arg2033-Asn2172, C2, zbytky Ser2173-Tyr2332. Sekvence A3-C1-C2 zahrnuje zbytky Ser1690-Tyr2332. Zbývající sekvence, zbytky Glu1649-Arg1689, je označována obvykle jako lehký řetězec aktivačního peptidu faktoru VIII. Faktor VIII je proteolyticky aktivován trombinem nebo faktorem Xa, který ho disociuje od von Willebrandova faktoru a vytváří faktor VIIIa, který má prokoagulační funkci. Biologická funkce faktoru VIIIa je zvyšovat katalytickou účinnost faktoru IXa pro aktivaci faktoru X o několik řádů. Trombinem aktivovaný faktor VIIIa je heterotrimer A1/A2/A3-C1-C2 velikosti 160 kDa, který tvoří komplex s faktorem IXa a faktorem X na povrchu destiček nebo monocytů. Termín „částečná doména“ označuje v popisu předkládaného vynálezu souvislou sekvenci aminokyselin tvořící část domény.

„Podjednotky“ lidského a zvířecího faktoru VIII jsou těžké a lehké řetězce proteinu. Těžký řetězec proteinu obsahuje tři domény, A1, A2 a B. Lehký řetězec faktoru VIII obsahuje také tři domény, a sice A3, C1 a C2.

Hybridní faktor VIII nebo jeho fragment může být připraven:

- 1) nahrazením lidských nebo zvířecích podjednotek (těžké i lehké řetězce) odpovídajícími zvířecími nebo lidskými podjednotkami izolovaných z plazmy,
- 2) nahrazením lidských nebo zvířecích domén (A1, A2, A3, B, C1, C2) odpovídajícími zvířecími nebo lidskými doménami,
- 3) nahrazením částí lidských nebo zvířecích domén částmi zvířecích nebo lidských domén,
- 4) nahrazením odpovídajících lidských nebo zvířecích aminokyselin alespoň jednou specifickou sekvencí obsahující jednu nebo několik jedinečných zvířecích nebo lidských aminokyselin, nebo
- 5) nahrazením alespoň jedné sekvence zahrnující jednu nebo několik specifických aminokyselin v lidském, zvířecím nebo hybridním faktoru VIII nebo jeho fragmentu aminokyselinovou sekvencí, která nemá žádnou známou sekvenční identitu s faktorem VIII.

„Hybridní faktor VIII bez B-domény“, „hybridní ekvivalentní faktor VIII“ nebo jejich fragmenty jsou jakékoliv faktory VIII popisované v této přihlášce postrádající B-doménu nebo jejich fragmenty.

Termíny „epitop“, „antigenní místo“ a „antigenní determinanta“ jsou užívány v tomto popisu jako synonyma a definují úsek lidského, zvířecího, hybridního nebo hybridního ekvivalentního faktoru VIII nebo jeho fragmentu, který je specificky rozpoznáván protilátkou. Obsahuje jakýkoliv počet aminokyselin a je závislý na primární, sekundární i terciární struktuře proteinu. Ve

smyslu předkládaného vynálezu, hybridní faktor VIII, ekvivalentní hybridní faktor VIII nebo jejich fragmenty, které obsahují alespoň jeden epitop, mohou být užity jako diagnostická činidla v testech, které budou popsány dále. V některých provedeních předkládaného vynálezu není hybridní nebo ekvivalentní hybridní faktor VIII nebo jejich fragment křížově reaktivní nebo je méně křížově reaktivní s přirozeně se vyskytujícími protilátkami inhibujícími faktor VIII ve srovnání s lidským nebo prasečím faktorem VIII.

Termín „imunogenní místo“ je definován jako úsek lidského nebo zvířecího faktoru VIII, hybridního nebo ekvivalentního hybridního faktoru VIII nebo jejich fragmentu, které specificky vyvolá tvorbu protilátek proti lidskému nebo zvířecímu faktoru VIII, hybridnímu nebo ekvivalentnímu hybridnímu faktoru VIII nebo jejich fragmentu u člověka nebo zvířete, jak se dá zjistit rutinním testem, jako je např. radioimunotest, ELISA nebo test „Bethesda“ popsaný v předkládaném vynálezu. Obsahuje jakýkoliv počet aminokyselin a je závislý na primární, sekundární i terciární struktuře proteinu. V některých provedeních předkládaného vynálezu není hybridní nebo ekvivalentní hybridní faktor VIII nebo jejich fragment imunogenní nebo je méně imunogenní pro člověka nebo zvíře ve srovnání s lidským nebo prasečím faktorem VIII.

Termíny „molekula hybridního faktoru VIII nebo její fragment“ nebo „hybridní faktor VIII nebo jeho fragment“ a „ekvivalentní hybridní faktor VIII nebo jeho fragment“ označují aktivní faktor VIII nebo molekulu hybridního faktoru VIII nebo jejich fragmenty, kde alespoň jedna sekvence obsahující jeden nebo několik specifických aminokyselinových zbytků lidského nebo zvířecího faktoru VIII nebo jejich fragmentu byla nahrazena alespoň jednou sekvencí obsahující jeden nebo několik aminokyselinových zbytků, která nemá žádnou známou sekvenční identitu se sekvencí lidského nebo zvířecího faktoru VIII. Sekvence obsahující jednu nebo více aminokyselin, která nemá žádnou známou sekvenční identitu se sekvencí lidského nebo zvířecího faktoru VIII je označována také jak „aminokyselinová sekvence odlišná od faktoru VIII“. Ve výhodném provedení je aminokyselinová sekvence, která nemá žádnou známou sekvenční identitu s faktorem VIII, sekvence alaninových zbytků. V jiném výhodném provedení vynálezu specifická sekvence faktoru VIII, která je nahrazena sekvencí bez známé sekvenční identity s faktorem VIII, obsahuje antigenní místo, které je imunoreaktivní s přirozeně se vyskytujícími inhibičními protilátkami proti faktoru VIII, takže výsledná ekvivalentní hybridní molekula faktoru VIII nebo její fragment jsou méně imunoreaktivní nebo vůbec nereagují s inhibičními protilátkami proti faktoru VIII. Ještě v dalším výhodném provedení specifická sekvence faktoru VIII, která je nahrazena sekvencí bez známé sekvenční identity s faktorem VIII, obsahuje imunogenní místo, které vyvolává tvorbu inhibičních protilátek proti faktoru VIII u člověka nebo zvířete, takže výsledná molekula ekvivalentního hybridního faktoru VIII nebo její fragment jsou méně imunogenní.

„Deficience faktoru VIII“ nebo „nedostatek faktoru VIII“ označují nedostatečnou srážlivost způsobenou tvorbou defektního faktoru VIII, nedostatečnou či nulovou tvorbou faktoru VIII nebo částečnou či úplnou inhibicí faktoru VIII inhibičními faktory. Hemofilie A je typ deficience faktoru VIII, který je důsledkem poruchy X-vázaného genu a nepřítomnosti nebo nedostatku proteinu faktoru VIII, který je tímto genem kódován.

„Diagnostický test“ označuje testy, které nějakým způsobem využívají interakce antigen–proti-látka pro detekci a/nebo kvantifikaci množství konkrétní protilátky, která je přítomna v testovaném vzorku jako pomocný prostředek k výběru vhodné terapie. DNA hybridního nebo ekvivalentního hybridního faktoru VIII nebo její fragment, nebo příslušný protein z ní exprimovaný mohou být použity k nahrazení odpovídajících reakčních činidel v dosud známých testech, přičemž modifikovaný test se užije k detekci a kvantifikaci protilátek proto faktoru VIII. Je to právě užití těchto činidel, a sice DNA hybridního nebo ekvivalentního hybridního faktoru VIII nebo jejího fragmentu, nebo příslušného proteinu z ní exprimovaného, které dovolují modifikovat dosud známé testy pro detekci protilátek proti lidskému nebo zvířecímu faktoru VIII nebo hybridnímu lidskému/zvířecímu faktoru VIII. K takovým testům patří, aniž by výčet byl limitující, ELISA test, imunodifúzní test a imunopřenos („imunoblot“). Metody vhodné k provádění těchto testů jsou odborníkům dostatečně známy. Hybridní nebo ekvivalentní hybridní faktor VIII

nebo jeho fragment, který obsahuje alespoň jeden epitop proteinu, může být užit jako diagnostické činidlo. Příklady testů, kde se užívá hybridní nebo ekvivalentní hybridní faktor VIII nebo jeho fragment jsou test „Bethesda“ a antikoagulační test.

5 Obecný popis použitých postupů

Patent US 5 364 771 popisuje novou molekulu hybridního lidského/prasečího faktoru VIII s koagulační aktivitou, ve které byly určité prvky molekuly lidského nebo zvířecího faktoru VIII nahrazeny odpovídajícími prvky molekuly faktoru VIII jiného druhu. Patent US 5 663 060 a
10 přihláška WO 95/24427 popisují prokoagulační hybridní lidský/zvířecí ekvivalentní faktor VIII, kde byly určité prvky molekuly faktoru VIII jednoho druhu nahrazeny odpovídajícími prvky molekuly faktoru VIII jiného druhu.

Předkládaný vynález poskytuje molekuly hybridního lidského/zvířecího, zvířecího/zvířecího a
15 ekvivalentního faktoru VIII a jejich fragmenty, a dále nukleovou kyselinu kódující takové hybridní molekuly, z nichž některé mají větší koagulační aktivitu ve standardních koagulačních testech než vysoce purifikovaný lidský faktor VIII a/nebo jsou méně imunoreaktivní s inhibičními protilátkami proti lidskému nebo prasečímu faktoru VIII než lidský nebo prasečí faktor VIII a/nebo jsou méně imunogenní pro člověka nebo zvíře než lidský nebo prasečí faktor VIII. Tyto
20 hybridní molekuly faktoru VIII lze zkonstruovat užitím následujících postupů.

Předkládaný vynález popisuje přinejmenším pět typů aktivních molekul hybridního lidského/prasečího nebo ekvivalentního hybridního faktoru VIII nebo jejich fragmenty a sekvence nukleové kyseliny, které kódují tyto hybridní faktory VIII a také způsoby jejich přípravy:

- 25 1) nahrazením lidských nebo prasečích podjednotek (těžké i lehké řetězce) odpovídajícími prasečími nebo lidskými podjednotkami,
- 2) nahrazením jedné nebo několika lidských nebo prasečích domén (A1, A2, A3, B, C1, C2) odpovídajícími prasečími nebo lidskými doménami,
- 3) nahrazením souvislé části jedné nebo několika lidských nebo prasečích domén odpovídajícími částmi prasečích nebo lidských domén,
30 4) nahrazením odpovídajících lidských nebo prasečích sekvencí alespoň jednou specifickou sekvencí obsahující jeden nebo několik jedinečných aminokyselinových zbytků lidského nebo prasečího faktoru VIII, nebo
- 5) nahrazením alespoň jedné specifické sekvence obsahující jednu nebo několik amino
35 kyselin v lidském, prasečím nebo hybridním lidském/prasečím faktoru VIII alespoň jednou aminokyselinovou sekvencí obsahující jednu nebo několik aminokyselin, která nemá žádnou známou sekvenční identitu s faktorem VIII (tj. aminokyselinovou sekvencí odlišnou od sekvence faktoru VIII).

40 Stejnými postupy lze připravit přinejmenším pět typů aktivních molekul hybridního lidského/savčího jiného než lidského a prasečího nebo ekvivalentního hybridního faktoru VIII nebo jejich fragmenty a sekvence nukleové kyseliny, které kódují tyto hybridní faktory VIII a také způsoby jejich přípravy:

- 45 1) nahrazením lidských nebo savčích jiných než lidských a prasečích podjednotek (těžké i lehké řetězce) odpovídajícími savčími jinými než lidskými a prasečími nebo lidskými podjednotkami,
- 2) nahrazením jedné nebo několika lidských nebo savčích jiných než lidských a prasečích domén (A1, A2, A3, B, C1, C2) odpovídajícími prasečími nebo lidskými doménami,
- 3) nahrazením souvislé části jedné nebo několika lidských nebo savčích jiných než lidských
50 a prasečích domén odpovídajícími částmi savčích jiných než lidských a prasečích nebo lidských domén,

- 4) nahrazením odpovídajících lidských nebo savčích jiných než lidských a prasečích sekvencí alespoň jednou specifickou sekvencí obsahující jeden nebo několik jedinečných aminokyselinových zbytků lidského nebo savčího jiného než lidského a prasečího faktoru VIII, nebo
- 5) nahrazením alespoň jedné specifické sekvence obsahující jednu nebo několik aminokyselin v lidském, savčím jiném než lidském a prasečím nebo hybridním lidském/savčím jiném než lidském faktoru VIII alespoň jednou aminokyselinovou sekvencí obsahující jednu nebo několik aminokyselin, která nemá žádnou známou sekvenční identitu s faktorem VIII (tj. aminokyselinovou sekvencí odlišnou od sekvence faktoru VIII).

10

Dále je odborníkovi ihned zřejmé, že stejné postupy lze užít k přípravě alespoň pěti typů aktivních molekul hybridního faktoru VIII nebo jejich fragmentů, které odpovídají typům uvedeným v bodech 1 až 5 ve dvou předcházejících odstavcích, kdy hybridní faktor VIII obsahuje aminokyselinové sekvence faktoru VIII ze dvou nebo více savců vyjma člověka, např. hybridní prasečí/myší faktor VIII, a dále obsahuje aminokyselinové sekvence odlišné od sekvence faktoru VIII.

15

Hybridní lidské/zvířecí, zvířecí/zvířecí a ekvivalentní molekuly faktoru VIII nebo jejich fragmenty uvedené pod body 1 až 3 se připravují izolací podjednotek, domén nebo souvislých částí domén z faktoru VIII získaného z plazmy, po které následuje rekonstituce a purifikace. Hybridní lidské/zvířecí, zvířecí/zvířecí a ekvivalentní molekuly faktoru VIII nebo jejich fragmenty uvedené pod body 3 až 5 se připravují technikami rekombinantní DNA (tj. genového inženýrství). Hybridní molekuly mohou obsahovat menší či větší procento lidské sekvence ve srovnání se zvířecí sekvencí, v závislosti na původu jednotlivých úseků, jak bude popsáno ještě podrobněji dále.

20

Jelikož současné údaje ukazují, že B doména nemá žádný inhibiční epitop a nemá žádný známý vliv na funkci faktoru VIII, v některých provedeních předkládaného vynálezu je B doména odstraněna z aktivního hybridního nebo ekvivalentního hybridního faktoru VIII nebo jeho fragmentu (faktor VIII je pak označován jako „B (-) faktor VIII“) připraveného způsobem podle vynálezu.

25

V příkladu 4 je ukázáno, že hybridní lidský/prasečí faktor VIII obsahující prasečí těžký řetězec a lidský lehký řetězec, který odpovídá prvnímu typu hybridů uvedených výše, má větší specifickou koagulační aktivitu ve standardním koagulačním testu než lidský faktor VIII. Hybridní lidský/zvířecí nebo ekvivalentní faktor VIII, ať již má vyšší, stejnou nebo nižší aktivitu než lidský faktor VIII, je užitečný pro léčení pacientů s tvorbou inhibitorů, neboť tyto inhibitory reagují méně s hybridním nebo ekvivalentním faktorem VIII než s původním lidským nebo prasečím faktorem VIII.

30

Příprava molekuly hybridního faktoru VIII rekonstitucí izolovaných podjednotek lidského a zvířecího faktoru VIII

40

Předkládaný vynález poskytuje molekuly hybridního lidského/zvířecího faktoru VIII nebo jejich fragmenty, sekvence nukleových kyselin kódující tyto hybridní molekuly a způsoby jejich přípravy a izolace a dále metody pro charakterizaci jejich koagulační aktivity. Jedna z metod, která je modifikovaným postupem publikovaným Fay, P.J. et al., J. Biol. Chem. 265: 6197, 1990 a Lollar, J.S. et al., J. Biol. Chem. 263: 10451, 1988, obsahuje izolaci podjednotek (tj. těžký řetězec a lehký řetězec) lidského a zvířecího faktoru VIII, po které následuje rekombinace lidského těžkého řetězce a zvířecího lehkého řetězce nebo lidského lehkého řetězce a zvířecího těžkého řetězce.

45

50

Izolace jak lidských, tak i zvířecích jednotlivých podjednotek zahrnuje disociaci dimeru těžký řetězec/lehký řetězec. To lze provést např. chelatací vápníku pomocí kyseliny etylendiaminotetraoctové (EDTA) následované monoSTM HPLC (Pharmacia-LKB, Piscataway, NJ). Hybridní

molekuly lidského/zvířecího faktoru VIII se pak rekonstituují z izolovaných podjednotek v přítomnosti vápníku. Hybridní faktory VIII lidský lehký řetězec/zvířecí těžký řetězec nebo zvířecí těžký řetězec/lidský lehký řetězec jsou izolovány od nezreagovaných těžkých řetězců pomocí postupu monoSTM HPLC (Pharmacia-LKB, Piscataway, NJ) pro izolaci prasečího faktoru VIII, jak byl popsán v Lollar, J.S. et al., Blood 71: 137-143, 1988.

Tyto metody, které byly použity v jednom provedení předkládaného vynálezu k přípravě aktivního hybridního lidského/prasečího faktoru VIII (což je popsáno v následujících příkladech) poskytly aktivní hybridní molekulu faktoru VIII lidský lehký řetězec/prasečí těžký řetězec, která vykazovala více než šestkrát vyšší prokoagulační aktivitu než lidský faktor VIII.

Jiné hybridní molekuly faktoru VIII, např. lidské/savčí jiné než lidské a prasečí, lze připravit, izolovat a charakterizovat stejným způsobem. Dále je odborníkovi ihned zřejmé, že stejné postupy lze užít k přípravě, izolaci a charakterizaci aktivity hybridního zvířecího/zvířecího faktoru VIII, jako je např. hybridní prasečí/myší faktor VIII, který obsahuje lehký řetězec nebo těžký řetězec jednoho biologického druhu kombinovaný s těžkým řetězcem nebo lehkým řetězcem jiného druhu.

Příprava molekuly hybridního faktoru VIII rekonstitucí izolovaných domén lidského a zvířecího faktoru VIII

Předkládaný vynález poskytuje molekuly hybridního lidského/zvířecího faktoru VIII se substitučními doménami nebo jejich fragmenty, sekvence nukleových kyselin kódující tyto hybridní molekuly a způsoby jejich přípravy a izolace a dále metody pro charakterizaci jejich koagulační aktivity. Jedna z metod obsahuje izolaci jedné nebo několika domén lidského a jedné nebo několika domén zvířecího faktoru VIII, po které následuje rekombinace lidských a zvířecích domén, takže vznikne hybridní lidský/zvířecí faktor VIII s koagulační aktivitou, jak to popsali Lollar, P. et al., J. Biol. Chem. 267(33): 23652-23657 (25. listopadu 1992) pro hybridní lidský/prasečí faktor VIII.

Předkládaný vynález specificky poskytuje hybridní lidský/prasečí faktor VIII, kde lidská doména A2 je nahrazena prasečí doménou A2, což ilustruje příklad, jak se může konstruovat doménově substituovaný hybridní lidský/savčí jiný než lidský a prasečí faktor VIII. Savčí, jiné než lidské a prasečí dimery a lidské dimery A1/A3-C1-C2 získané z plazmy jsou izolovány disociací domény A2 z faktoru VIIIA. To se provádí např. v přítomnosti NaOH a poté zředěním směsi a elucí dimerů pomocí monoSTM HPLC (Pharmacia-LKB, Piscataway, NJ). Doména A2 je izolována od faktoru VIIIA jako menšinová složka v monoSTM HPLC. Hybridní molekuly lidského/zvířecího faktoru VIII jsou pak rekonstituovány smícháním stejného objemu domény A2 jednoho biologického druhu a dimerů A1/A3-C1-C2 jiného druhu.

Hybridní lidské/zvířecí faktory VIII nebo jejich fragmenty s jednou nebo více substitucemi domén jsou izolovány ze směsi nezreagovaných dimerů a domén A2 pomocí postupu monoSTM HPLC (Pharmacia-LKB, Piscataway, NJ) pro izolaci prasečího faktoru VIII, jak byl popsán v Lollar, J.S. et al., Blood 71: 137-143, 1988. Rutinní postupy lze také užít k izolaci domén A1, A3, C1, C2 a B faktoru VIII jednoho biologického druhu, z nichž pak jedna nebo několik mohou nahradit odpovídající doménu faktoru VIII jiného druhu. Odborníkovi je ihned zřejmé, že stejné postupy lze užít k přípravě, izolaci a charakterizaci aktivity hybridního zvířecího/zvířecího faktoru VIII, jako je např. hybridní prasečí/myší faktor VIII.

Tyto postupy, popsané ještě podrobněji v následujících příkladech, poskytly molekuly hybridního faktoru VIII s prokoagulační aktivitou.

Příprava molekul hybridního faktoru VIII metodami genové inženýrství rekombinací sekvencí kódujících podjednotky, domény nebo části domén lidského, zvířecího a hybridního faktoru VIII

Nahrazování podjednotek, domén nebo souvislých částí domén

Předkládaný vynález poskytuje aktivní rekombinantní hybridní lidský/zvířecí a hybridní ekvivalentní faktor VIII a jeho fragmenty, kde byly nahrazeny podjednotky, domény nebo aminokyseliny, sekvenční nukleových kyselin kódujících tyto hybridní molekuly, způsoby jejich
 5 přípravy a izolace a dále způsoby charakterizace jejich koagulačních, imunoreaktivních a imunogenních vlastností.

Lidský gen faktoru VIII byl izolován a exprimován v savčích buňkách, jak popsali Toole, J.J. et al., Nature 312: 342–347, 1984 (Genetics Institute), 1984, Gitschier, J. et al., Nature 312: 326–330, 1984 (genetech), Wood, W.I. et al., Nature 312: 330–337, 1984 (Genetech), Vehar, G.A. et al., Nature 312:337–342, 1984 (Genetech), a dále v patentových přihláškách WO 87/04187, WO 88/08035, WO 88/03558 a v patentu US 4 757 006, a na základě známé cDNA byla dedukována aminokyselinová sekvenční. Patent US 4 965 199 udělený Caponovi et al.
 10 popisuje rekombinantní metodu přípravy savčího faktoru VIII v savčích hostitelských buňkách a purifikaci lidského faktoru VIII. Byla popsána exprese lidského faktoru VIII v CHO buňkách (buňky ovarií čínské křečka) a BHKC (fetální ledvinové křeččí buňky). Lidský faktor VIII byl modifikován tak, že byla odstraněna celá nebo část B-domény (patent US 4 868 112) a byl učiněn pokus nahradit tuto doménu B faktoru VIII B doménou lidského faktoru V (patent
 15 US 5 004 803). Sekvenční cDNA kódující lidský faktor VIII a predikovaná aminokyselinová sekvenční jsou zde uvedeny jako sekvenční id. č. 1 a 2.

Prasečí faktor VIII byl izolován a purifikován z plazmy (Fass, D.N. et al., Blood 59: 594, 1982). Částečná aminokyselinová sekvenční prasečího faktoru VIII odpovídající úseku N–konce lehkého
 25 řetězce mající homologii s ceruloplazminem a koagulačním faktorem V a zcela nesprávně umístěný byl popsán Church et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6934, 1984. Toole J.J. et al., Nature 312: 342–347, 1984 popsal částečné sekvenčování fragmentů ze čtyřech aminokyselin z N–koncového úseku prasečího faktoru VIII, ale nijak necharakterizoval polohu těchto fragmentů v molekule faktoru VIII. Aminokyselinová sekvenční domén B a části domény A2 byly publikovány v Toole, J.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5939–5942, 1986. cDNA kódující
 30 úplnou doménu A2 prasečího faktoru VIII a predikovaná aminokyselinová sekvenční a také hybridní lidský/prasečí faktor VIII, kde jsou substituovány všechny domény, všechny podjednotky a specifické sekvenční aminokyselin byly popsány v přihlášce vynálezu US 07/864 004 nazvané „Hybridní lidský/prasečí faktor VIII“ podané 7. dubna 1992 původci John S. Lollar a
 35 Marshall S. Runge, na jejímž základě byl udělen 15. listopadu 1994 patent US 5 364 771 a dále také WO 93/20093. Sekvenční cDNA kódující doménu A2 prasečího faktoru VIII mající sekvenční identitu se zbytky 373–740 zralého lidského faktoru VIII uvedeného jako sekvenční id. č. 1, je zde uvedena jako sekvenční id. č. 3 a predikovaná aminokyselinová sekvenční jako sekvenční id. č. 4. Nedávno byly popsány v mezinárodní přihlášce WO 94/11503 nukleotidové a odpovídající
 40 aminokyselinové sekvenční domén A1 a A2 prasečího faktoru VIII a chimérický faktor VIII, kde prasečí A1 a/nebo A2 doména nahrazuje odpovídající lidskou doménu.

Jak prasečí, tak i lidský faktor VIII jsou izolovány z plazmy jako protein složený ze dvou podjednotek. Podjednotky, známé jako lehký a těžký řetězec, jsou navzájem spojeny nekovalentními
 45 vazbami, které vyžadují přítomnost vápníku nebo jiného divalentního iontu kovu. Těžký řetězec faktoru VIII obsahuje tři domény A1, A2 a B, které jsou spojeny kovalentně. Lehký řetězec obsahuje také tři domény, označované A3, C1 a C2. B doména nemá žádnou známou biologickou funkci a lze ji z molekuly odstranit buďto proteolyticky, nebo metodami rekombinantní DNA, aniž by se měřitelně změnila vlastnosti faktoru VIII. Lidský rekombinantní faktor VIII má
 50 obdobnou strukturu a funkci jako lidský faktor VIII izolovaný z plazmy, i když není glykosylován, pokud není exprimován v savčích buňkách.

Lidský a prasečí aktivovaný faktor VIII (tj. faktor VIIIa) mají tři podjednotky díky štěpení těžkého řetězce mezi doménami A1 a A2. Tato struktura se označuje A1/A2/A3–C1–C2. Lidský
 55 faktor VIIIa není stabilní v podmínkách, které stabilizují prasečí faktor VIIIa, pravděpodobně

díky slabší asociaci podjednotky A2 lidského faktoru VIIIa. Disociace podjednotky A2 lidského i prasečího faktoru VIIIa je spojena se ztrátou aktivity molekuly faktoru VIII.

Použitím sond pro dosud známé sekvence částí molekuly prasečího faktoru VIII je možné standardními postupy sekvencovat ty části prasečího faktoru VIII, které ještě nebyly sekvencovány. Tyto standardní postupy jsou popsány např. v publikacích Weis, J.H., Construction of Recombinant DNA Libraries, Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1991, a Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989, jejichž pomocí lze konstruovat hybridy plné délky.

Předkládaný vynález specificky poskytuje jako příklad výhodného provedení aktivní rekombinantní hybridní lidský/prasečí faktor VIII se substituovanou doménou A2, sekvencí nukleové kyseliny kódující tento hybridní faktor VIII a způsoby jeho přípravy, izolace a charakterizace jeho aktivity. Postupy, kterými byly připraveny tyto hybridní molekuly lze užít také k přípravě rekombinantního hybridního lidského/prasečího faktoru VIII nebo jeho fragmentů, který má nahrazeny podjednotky, souvislé části domén nebo domény jiné než A2. Odborníkovi je také zřejmé, že tyto postupy ukazují, jak je možné připravit i jiné další molekuly rekombinantního hybridního lidského/savčího jiného než lidského a prasečího nebo rekombinantního hybridního zvířecího/zvířecího faktoru VIII, kde jsou nahrazeny podjednotky, domény nebo souvislé části domén.

Rekombinantní hybridní lidský/prasečí faktor VIII byl připraven z lidské cDNA (Biogen, Inc.) a prasečí cDNA popsané v předkládaném vynálezu, které kódují relevantní sekvence faktoru VIII. Ve výhodném provedení vynálezu faktor VIII kódovaný cDNA obsahuje domény A1–A2–A3–C1–C2, postrádá celou doménu B a odpovídá tak aminokyselinovým zbytkům 1–740 a 1649–2332 jednořetězcového lidského faktoru VIII (viz sekvence id. č. 2) podle číslování dle Wood et al., Nature 312:330–337, 1984.

Jednotlivé podjednotky, domény nebo souvislé části domén lidského nebo prasečího faktoru VIII lze nahradit odpovídajícími prasečími nebo lidskými podjednotkami, doménami nebo souvislými částmi domén, které byly klonovány a byly k takové substituci použity pomocí odborníkovi známých technik mutagenese. Např. Lubin, I.M. et al., J. Biol. Chem. 269 (12):8639–8641, 1994 popisují, metody substituce lidské domény A2 prasečí doménou s využitím vhodných restričních míst. Další metody pro substituci jakéhokoliv zvoleného úseku cDNA faktoru VIII jednoho biologického druhu úsekem cDNA faktoru VIII jiného druhu jsou např. metoda „splicing by overlap extension“ (SOE), kterou popsali Horton et al., Meth. Enzymol. 217: 270–279, 1993.

cDNA kódující podjednotky, domény nebo části domén faktoru VIII nebo celé hybridní cDNA byly klonovány do vektorů pro dočasnou expresi aktivní proteinové molekuly hybridního lidského/prasečího faktoru VIII v buněčných kulturách, a sice v oboru známými metodami, které jsou popsány např. v Selden, R.F., Introduction of DNA into mammalian cells, v Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., 1991.

Ve výhodném provedení cDNA kódující hybridní lidský/prasečí faktor VIII, kde prasečí sekvence kóduje doménu nebo část domény, např. doménu A2 nebo její část, byla vložena do savčího expresního vektoru jako je např. ReNeo, a byl tak vytvořen konstrukt hybridního faktoru VIII. Předběžná charakterizace hybridního faktoru VIII byla provedena tak, že hybridní cDNA byla vložena do savčího expresního vektoru ReNeo a hybridní protein byl přechodně exprimován v buňkách COS–7. Pak bylo možno stanovit, zda je exprimován aktivní hybridní protein. Expresní vektorový konstrukt se pak dále užil k trvalé transfekci buněk v buněčné kultuře, např. buněk fetálních křeččích ledvin, a sice metodami v oboru známými, jako je např. liposomy zprostředkovaná transfekce (LipofectinTM, Life Technologies, Inc.). Expresce proteinu rekombinantního hybridního faktoru VIII se ověří např. pomocí sekvencování, northernového a westernového přenosu (northern blot, western blot) nebo polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Protein

hybridního faktoru VIII se z kultivačního média, ve kterém se kultivují transfekované buňky trvale exprimující protein, precipituje, pak se poletuje, opláchne a resuspenduje ve vhodném pufru, a pak se rekombinantní hybridní faktor VIII purifikuje standardním způsobem, např. imunoafinitní chromatografií pomocí např. SepharoseTM s monoklonální protilátkou anti-A2.

5

V dalším výhodném provedení je hybridní faktor VIII obsahující substituované podjednotky, domény nebo části domén, exprimován jako fúzní protein z rekombinantní molekuly, kde je na místo sousedící se sekvencí kódující faktor VIII vložena sekvence kódující protein, který např. zvyšuje stabilitu, sekreci nebo zlepšuje detekci, izolaci apod. Odborníkům jsou známy postupy pro použití homologních nebo heterologních sekvencí řídících expresi, jako jsou např. promotory, operátory a regulátory při přípravě fúzních proteinů a jsou v oboru rutinně využívány (viz např. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., 1991).

Purifikovaný hybridní faktor VIII nebo jeho fragment se testuje na imunoreaktivitu a koagulační aktivitu standardními testy, ke kterým patří např. test s plazmou bez faktoru VIII, jednostupňový koagulační test, nebo ELISA test s purifikovaným rekombinantním faktorem VIII jako standardem.

I jiné vektory, včetně plazmidů a eukaryotických virových vektorů, lze užít k expresi rekombinantních genových konstruktů v savcích buňkách v závislosti na požadavcích a úsudku odborníka (viz např. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, kapitola 16). Lze také užít jiné expresní systémy, např. bakterie nebo hmyzí buňky, ale není to výhodné, neboť existují rozdíly v glykosylaci nebo ke glykosylaci vůbec nedochází.

Protein hybridního faktoru VIII může být exprimován v celé řadě buněk rutinně užívaných pro expresi rekombinantních savčích proteinů. Zejména řada buněčných linií hlodavců je vhodná pro expresi velkých proteinů. K výhodným buňkám, které jsou dostupné v Americké sbírce mikroorganismů (ATCC, Rockville, MD) patří buňky fetálních křeččích ledvin a buňky ovarií čínského křečka (CHO), které lze kultivovat užitím rutinních postupů a kultivačních médií.

30

Stejně metody, které byly užity k přípravě hybridního lidského/prasečího faktoru VIII se substituovanou podjednotkou, doménou nebo aminokyselinovou sekvencí, lze užít také k přípravě dalších rekombinantních hybridních faktorů VIII nebo jejich fragmentů a sekvencí nukleových kyselin kódujících tyto hybridy, a sice např. hybridní lidský/savčí jiný než lidský a prasečí nebo zvířecí/zvířecí faktor VIII. Pomocí primerů ke známým sekvencím lidské DNA byla klonována celá myščí cDNA a část prasečí cDNA faktoru VIII. Sekvence faktoru VIII dalších biologických druhů pro přípravu hybridního lidského/zvířecího nebo zvířecího/zvířecího faktoru VIII lze získat pomocí známých lidských a prasečích sekvencí jako výchozího materiálu. Jiným způsobem je využití amplifikace PCR s DNA ze zvířecí tkáně a použití cDNA knihovny ze zvířete ke klonování sekvence faktoru VIII.

40

Jako příklad výhodného provedení lze uvést následující přípravu proteinu – hybridního lidského/myščího faktoru VIII. DNA klony odpovídající myššímu homologu genu lidského faktoru VIII byly izolovány a sekvencovány a byla predikovaná aminokyselinová sekvence proteinu faktoru VIII, jak popsali Elder G. et al., *Genomics* 16 (2):374–379, 1993, přičemž v této publikaci bylo také provedeno srovnání predikované aminokyselinové sekvence myši a člověka a pouze části sekvence molekuly faktoru VIII prasete. Myščí cDNA sekvence kódující faktor VIII a predikovaná aminokyselinová sekvence jsou zde uvedeny jako sekvence id. č. 5 a 8. Ve výhodném provedení byla užita metoda amplifikace RNA se sekvencováním transkriptu (RAWTS), jak ji popsali Sarkar G. et al., *Science* 244: 331–334, 1989. Stručně shrnuto, jednotlivé kroky této metody jsou: 1) syntéza cDNA pomocí oligo(dT) primeru nebo oligonukleotidového primeru specifického k mRNA, 2) polymerázová řetězová reakce, PCR, kde jeden nebo oligonukleotidové primery obsahují fágový promotor připojený k sekvenci komplementární k úseku, který má být amplifikován, 3) transkripce s fágovým promotorem a 4) sekvencování transkriptu pomocí dideoxynukleotidů zprostředkované reverzní transkriptázou, která žije jako primer vnitřní

55

(„nested“) oligonukleotid. Tato metoda, kromě toho, že poskytne informaci o sekvenci, vede také ke vzniku translačního produktu *in vitro* tím, že iniciační translační signál je inkorporován do vhodného PCR primeru. Metodu lze také užít k získání informací o sekvenci nové mRNA z jiných biologických druhů.

5

Substituce aminokyselin

Předkládaný vynález poskytuje aktivní hybridní molekuly lidského/zvířecího a zvířecího/zvířecího faktoru VIII nebo jejich fragmenty, kde aminokyselinová sekvence jednoho biologického druhu je nahrazena alespoň jednou sekvencí obsahující jednu nebo několik jedinečných aminokyselin jiného druhu, sekvence nukleové kyseliny kódující tyto hybridní molekuly, způsoby jejich přípravy a izolace a dále způsoby pro charakterizace jejich koagulačních, imunogenních a imunoreaktivních vlastností.

Doména A2 je nutná pro prokoagulační aktivitu molekuly faktoru VIII. Studie ukázaly, že prasečí faktor VIII má šestkrát vyšší prokoagulační aktivitu než lidský faktor VIII (Lollar P. et al., J. Biol. Chem. 266: 12481–12486, 1991) a že rozdíl v koagulační aktivitě mezi lidským a prasečím faktorem VIII je způsoben rozdílnými aminokyselinovými sekvencemi jednoho nebo více zbytků v doméně A2 (Lollar P. et al., J. Biol. Chem. 267: 23652–23657, 1992). Dále se má za to, že domény A2 a C2 a možná i třetí úsek lehkého řetězce v molekule lidského faktoru VIII nesou epitopy, se kterými reaguje většina, ne-li všechny, inhibující protilátky (Hoyer, Semin. Hematol. 31: 1–5, 1994).

Molekuly rekombinantního hybridního lidského/zvířecího, zvířecího/zvířecího nebo ekvivalentního faktoru VIII nebo jejich fragmenty lze připravit substitucí alespoň jedné specifické sekvence obsahující jednu nebo několik jedinečných aminokyselin z domén A2, C2 a/nebo jiných domén faktoru VIII jednoho biologického druhu odpovídajícími sekvencemi jiného druhu, přičemž aminokyselinové sekvence se mezi oběma biologickými druhy liší, jak bude ještě ukázáno podrobněji dále. Ve zde popsaném příkladu výhodném provedení poskytuje vynález aktivní rekombinantní hybridní lidský/prasečí faktor VIII, kde prasečí sekvence je užita k nahrazení lidské sekvence obsahující epitop, přičemž hybridní faktor VIII má sníženou nebo nulovou imunoreaktivitu s inhibičními protilátkami proti faktoru VIII. V dalším provedení je připravena aktivní hybridní molekula faktoru VIII, která obsahuje sekvence z více než jednoho biologického druhu, kterými byly nahrazeny původní sekvence třetího druhu. Lze také připravit rekombinantní hybridní molekuly lidského, zvířecího nebo hybridního faktoru VIII, obsahující alespoň jednu sekvenci obsahující jednu nebo více aminokyselin, která nemá žádnou známou sekvenční identitu se sekvencí faktoru VIII, jak je dále podrobněji popsáno.

Jakýkoliv hybridní faktor VIII obsahující specifickou aminokyselinovou substituci podle vynálezu může být testován standardními testy koagulační aktivity a reaktivity s inhibičními protilátkami faktoru VIII, aby se identifikovaly molekuly faktoru VIII se zvýšenou koagulační aktivitou a/nebo sníženou imunoreaktivitou. Mohou být identifikovány také hybridní molekuly, které mají sice nižší koagulační aktivitu než lidský nebo prasečí faktor VIII, ale mají také sníženou reaktivitu s protilátkami. Odborníkovi je zřejmé, že molekuly faktoru VIII nebo jejich fragmenty, které mají nižší, stejnou nebo větší koagulační aktivitu ve srovnání s lidským nebo prasečím faktorem VIII, jsou užitečné k léčení pacientů s deficiencí faktoru VIII. Zde popsané metody přípravy aktivního hybridního rekombinantního lidského/prasečího faktoru VIII se substitucí specifických aminokyselin lze užít také k přípravě aktivního rekombinantního hybridního lidského/savčího jiného než lidského a prasečího, hybridního zvířecího–1/zvířecího–2 faktoru VIII nebo ekvivalentního hybridního faktoru VIII nebo jejich fragmentů.

50

Hybridní molekuly faktoru VIII se změněnou koagulační aktivitou

Předkládaný vynález poskytuje prokoagulační rekombinantní hybridní lidský/zvířecí, zvířecí/zvířecí nebo ekvivalentní faktor VIII nebo jeho fragment, kde odpovídající aminokyselinová

55

sekvence jednoho biologického druhu je nahrazena alespoň jednou specifickou sekvencí obsahující jednu nebo více jedinečných aminokyselin majících prokoagulační aktivitu ve faktoru VIII jiného druhu, a sice připravený v oboru známými metodami místně cílené mutagenese, jak je zde popisováno. Specifické sekvence pro substituce byly vybrány a hybridní konstrukty byly
 5 připraveny a testovány na koagulační aktivitu následujícím způsobem. Jako specifický příklad výhodného provedení vynález poskytuje hybridní lidský/prasečí faktor VIII obsahující amino-
 kyselinovou substituci v doméně A2. Je zřejmé, že odborník může stejné metody využít k pří-
 pravě dalších hybridních molekul jako je hybridní lidský/zvířecí, zvířecí/zvířecí nebo hybridní
 10 faktor VIII nebo jeho fragment, které mají změněnou koagulační aktivitu, výhodně zvýšenou koagulační aktivitu, ve srovnání s lidským faktorem VIII.

Základem vyšší koagulační aktivity prasečího faktoru VIII je zřejmě rychlejší, spontánní disocia-
 ce podjednotky A2 lidského faktoru VIIIA než u prasečího faktoru VIIIA, která vede ke ztrátě
 aktivity podle Lollar, P. et al., J. Biol. Chem. 265: 1688–1692, 1990, Lollar, P. et al., J. Biol.
 15 Chem. 267: 23652–23657, 1992 a Fay, P.J. et al., J. Biol. Chem. 267: 13246–13250, 1992.

Porovnání přiřazených aminokyselinových sekvencí domén A2 (počítání zbytků začíná v poloze
 373 vzhledem k aminokyselinové sekvenci lidského faktoru VIII plné délky uvedené zde jako
 sekvence id. č. 2) lidského a prasečího faktoru VIII jsou ukázány na obr. 1C. Pro přípravu
 20 molekuly hybridního lidského/prasečího faktoru VIII se změněnou koagulační aktivitou byly
 vybrány kandidátní sekvence pro mutagenesi srovnáním aminokyselinových sekvencí lidské a
 prasečí domény A2 (sekvence id. č. 2 a 6), jak je uvedeno v tabulce I.

Tabulka I

25 Sekvence lidského faktoru VIII Vybrané jako vhodné pro mutagenesi.

sekvence	zbytky	neshody	hodnocení změn
398–403	6	4	1
434–444	10	4	3
484–496	13	7	3
598–603	6	4	2
536–541	6	4	0
713–722	10	6	2
727–737	11	6	2

Tabulka I a tučná písmena na obr. 1A–1B ukazují sedm sekvencí v lidské a prasečí amino-
 kyselinové sekvenci A2 domény (sekvence id. č. 2 a 6), které představují pouze 17 % domény
 A2, ale obsahuje 70 % sekvenčních rozdílů mezi lidskými a prasečími doménami.

30 Vynález poskytuje rekombinantní hybridní lidský/prasečí konstrukt, kde aminokyseliny Ser373–
 Glu604 v doméně A2 (Ser373–Arg740) byly nahrazeny homologní prasečí sekvencí. Tato
 zkonstruovaná molekula nereaguje s inhibitory A2, a má stejnou koagulační aktivitu jako lidský
 (B–)faktor VIII. Dále se popisuje molekula faktoru VIII získaná z plazmy, obsahující úplnou
 35 doménu A2 z prasete užitou k substituci v molekule lidského faktoru VIII, přičemž tato hybridní
 molekula má zvýšenou koagulační aktivitu ve srovnání s lidským faktorem VIII. Srovnání těchto
 konstruktů ukázalo, že úsek mezi zbytky Asp605 a Arg740 je zodpovědný za rozdíl v aktivitě
 mezi lidským a prasečím faktorem VIII. Tento úsek lze podrobněji definovat systematickým
 vytvářením rekombinantních molekul hybridního lidského/prasečího faktoru VIII, kde úsek mezi
 40 Asp605 a Arg740 je nahrazován prasečími sekvencemi v oboru známým způsobem místně cílené
 mutagenese, např. metodou SOE, která byla využita extenzivně k vytváření hybridních molekul
 faktoru VIII obsahujících prasečí sekvence substituované v NH₂-terminálním úseku domény A2.

Tyto molekuly lze exprimovat v COS-7 buňkách a ve fetálních ledvinných křečcích buňkách, jak bylo již zmíněno výše. Ty lze purifikovat do homogenity metodami v oboru známými, např. chromatografií s heparin-SepharoseTM nebo imunoafinitní chromatografií. Proteinová koncentrace se pak stanoví absorpcí UV světla při vlnové délce 280 nm a specifická aktivita konstruktů se stanoví dělením koagulační aktivity (měřené v jednotkách na 1 ml v jednofázovém koagulačním testu) hodnotou A₂₈₀. Lidský faktor VIII má specifickou aktivitu přibližně 3000 až 4000 U/A₂₈₀, zatímco prasečí faktor VIII má specifickou aktivitu přibližně 20 000 U/A₂₈₀. Ve výhodném provedení prokoagulační rekombinantní hybridní lidský/prasečí faktor VIII má specifickou aktivitu 20 000 U/A₂₈₀ a obsahuje co nejméně prasečích substitucí v doméně A2.

Jak je zde popsáno, metody místně cílené mutagenese byly užity k identifikaci hybridního proteinu s koagulační aktivitou, která je vyšší, stejná nebo nižší než aktivita lidského faktoru VIII, ale výhodně vyšší. V provedení hybridního lidského/prasečího faktoru byly specifické lidské sekvence nahrazeny prasečími sekvencemi, výhodně užitím metody SOE, jak ji popsali Ho, S.N. et al., Gene 77: 51-59, 1994 nebo dle příkladu 7 a 8. Lze také užít oligonukleotidy řízenou mutagenézí, jak to bylo provedeno pro vyčlenění části lidské domény A2 (viz příklad 7). Když funkční analýza hybridů prokáže koagulační aktivitu, sekvence lze pak dále dělit a mapovat jejich prokoagulační sekvence standardními technikami analýzy bodových mutací.

Předkládaný vynález předpokládá, že cDNA hybridního faktoru VIII a samotný protein jsou charakterizovány v oboru známými a rutinními metodami jako je např. sekvencování DNA, test koagulační aktivity, ELISA test purifikovaného faktoru VIII s měřením UV absorpance při 280 nm, test specifické koagulační aktivity (U/mg), SDS-PAGE analýza purifikovaného faktoru VIII a další. Lze také provádět jiné testy potřebné k testování klinické účinnosti jako je např. analýza aminokyselin, cukrů, síranů nebo kovových iontů.

Rekombinantní hybridní faktor VIII mající vyšší koagulační aktivitu, ve srovnání s lidským faktorem VIII, je výhodný z hlediska levnější výroby než získávání faktoru VIII z plazmy a také proto, že snižuje množství faktoru VIII potřebné pro účinné léčení deficiencie faktoru VIII.

Hybridní faktor VIII se sníženou imunoreaktivitou

Epitopy, které jsou imunoreaktivní s protilátkami, které inhibují koagulační aktivitu faktoru VIII („inhibitory“ nebo „inhibiční protilátky“) byly charakterizovány na základě znalosti vztahů mezi strukturou a funkcí v molekule faktoru VIII. Předpokládá se, že inhibitory působí tak, že narušují některou z makromolekulárních interakcí spojenou se strukturou domén faktoru VIII nebo asociaci faktoru VIII s von Willebrandovým faktorem, trombinem, faktorem Xa, faktorem IXa nebo faktorem X. Avšak 90 % inhibičních protilátek proti lidskému faktoru VIII působí tak, že se váží na epitopy lokalizované v doméně faktoru VIII A2 velikosti 40 kDa nebo doméně C2 velikosti 20 kDa, čímž narušují specifické funkce těchto domén, jak to popsali Fulcher et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7728-7732, 1985 a Scandella et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6152-6156, 1988. Kromě epitopů v doménách A2 a C2 může být třetí epitop v doméně A3 nebo C1 lehkého řetězce faktoru VIII (podle Scandella et al., Blood 82: 1767-1775, 1993). Význam tohoto třetího předpokládaného epitopu je neznámý, ale zdá se že je zodpovědný za malý podíl epitopové reaktivity faktoru VIII.

Protilátky anti-A2 blokují aktivaci faktoru X jak popsali Lollar et al., J. Clin. Invest. 93: 2497-2504, 1994. Předchozí mapovací studie pomocí deleční mutagenese popsané v Ware et al., Blood Coagul. Fibrinolysis 3: 703-716, lokalizovaly epitop A2 do 20 kDa úseku NH₂-konce domény A2 velikosti 40 kDa. Kompetitivní imunoradiometrický test ukázal, že A2 inhibitory rozpoznávají buďto prostý epitop, nebo blíže nahloučené epitopy, jak popsali Scandella et al., Throm. Hemostas. 67: 665-671, 1992 a jak je také ukázáno v příkladu 8.

Předkládaný vynález poskytuje aktivní rekombinantní hybridní a hybridní ekvivalentní faktor VIII nebo jeho fragmenty, sekvence nukleové kyseliny kódující takové hybridy, způsoby jejich

přípravy a izolace a způsoby jejich charakterizace. K takovým hybridům patří např. lidský/-
 zvířecí, zvířecí/zvířecí nebo ekvivalentní hybridní faktor VIII, kde aminokyselinová sekvence
 jednoho biologického druhu byla nahrazena alespoň jednou specifickou aminokyselinovou
 sekvencí obsahující jednu nebo více jedinečných aminokyselin faktoru VIII druhého druhu, nebo
 5 kde specifická sekvence lidského, zvířecího nebo hybridního faktoru VIII byla nahrazena alespoň
 jednou specifickou aminokyselinovou sekvencí, obsahující jednu nebo více aminokyselin, která
 nemá žádnou známou sekvenční identitu se sekvencí faktoru VIII. Výsledný hybridní faktor VIII
 má sníženou imunoreaktivitu s inhibičními protilátkami faktoru VIII ve srovnání s lidským nebo
 prasečím faktorem VIII nebo nemá žádnou imunoreaktivitu s inhibičními protilátkami faktoru
 10 VIII.

Užitím postupů pro substituce aminokyselin v molekule faktoru VIII popsanych v předchozích
 částech přihlášky byla provedena mutační analýza, aby byly vybrány odpovídající aminokyseli-
 nové sekvence faktoru VIII jednoho biologického druhu, výhodně prasečí, které se užijí
 k nahrazení alespoň jedné sekvence obsahující jednu nebo více aminokyselin faktoru VIII jiného
 15 druhu, výhodně lidských, nebo aminokyselinové sekvence ekvivalentního hybridního faktoru
 VIII obsahující jednu nebo více kritických oblastí domény A2, C2 nebo jiné, proti kterým jsou
 namířeny inhibiční protilátky. Dále v textu jsou tyto postupy popsány podrobněji. Výsledný
 prokoagulační rekombinantní hybridní konstrukt má sníženou nebo nulovou imunoreaktivitu
 s inhibičními protilátkami při srovnání s lidským faktorem VIII pomocí standardních testů.
 20 Systematickým nahrazováním stále menších aminokyselinových sekvencí, po kterém vždy násle-
 duje test hybridního konstruktů na imunoreaktivitu, jak bude dále popsáno, epitopy všech domén
 faktoru VIII byly zmapovány, substituovány aminokyselinovými sekvencemi s menší nebo
 nulovou imunoreaktivitou a byl připraven hybridní faktor VIII.

Je zřejmé, že odborník může využít tyto postupy kombinující mapování epitopů, konstrukci
 molekul hybridního faktoru VIII a mutační analýzu konstruktů, pro identifikaci a nahrazení
 alespoň jedné sekvence obsahující jednu nebo více aminokyselin obsažených v epitopu domény
 A2, C2 a/nebo jiné domény, proti kterým jsou namířeny inhibiční protilátky, a pro konstrukci
 prokoagulačního hybridního rekombinantního lidského/zvířecího, zvířecího/zvířecího nebo ekvi-
 30 valentního faktoru VIII nebo jeho fragmentů, který má ve srovnání s lidským nebo prasečím
 faktorem VIII sníženou nebo nulovou imunoreaktivitu. Takový postup byl užit v jednom prove-
 dení vynálezu, jak je popsáno v příkladu 8, k přípravě rekombinantního hybridního lidského/-
 prasečího faktoru VIII, který má substituci v lidské A2 doméně a neprojevuje žádnou antigenicitu
 pro protilátky k faktoru VIII.

Obvykle prasečí faktor VIII má omezenou nebo i žádnou reaktivitu s protilátkami proti lidskému
 faktoru VIII. Rekombinantní hybridní molekuly lidského/prasečího faktoru VIII se sníženou nebo
 nulovou reaktivitou s inhibičními protilátkami, která je důsledkem aminokyselinové substituce
 v doméně A2, byly připraveny jako příklad hybridního faktoru VIII připraveného pomocí faktoru
 40 VIII jiného biologického druhu a substituci v doménách jiných než A2. Prasečí doména A2 byla
 klonována rutinními postupy, jak jsou popsány v příkladech 6,7 a 8, a pak byla štěpena uvnitř
 s využitím restrikčních míst pro štěpení cDNA a nebo pomocí metody SOE. Výsledné amino-
 kyselinové sekvence byly užity k nahrazení sekvencí lidské domény A2 a byl tak vytvořen
 hybridní konstrukt faktoru VIII, který byl vložen do savčího expresního vektoru, výhodně
 45 ReNeo, stabilně transformován do buněk v kultuře, výhodně buněk fetálních křeččích ledvin, a
 exprimován. Hybridní faktor VIII byl testován na imunoreaktivitu, např. s protilátkami anti-A2 v
 rutinním „Bethesda“ testu nebo v testu s čistou plazmou a chromogenním substrátem. „Bethesda
 jednotka“ (BU) se užívá jako standardní měřítko titru inhibitoru. Pokud není „Bethesda titr“
 protilátek měřitelný (<0,7 BU/mg IgG) u hybridního konstruktů, pak to znamená, že lidský A2
 50 epitop byl eliminován v daném úseku substitucí odpovídající prasečí sekvenci. Epitop se
 postupně progresivně zužuje, takže je možné stanovit specifický epitop A2, aby bylo možné
 vytvořit hybridní lidskou/prasečí molekulu s co možná nejmenším množstvím prasečí sekvence.
 Jak je podrobněji dále popsáno, sekvence 25 aminokyselinových zbytků odpovídající sekvenci
 Arg484-Ile508, která je kritická pro imunoreaktivitu s inhibičními protilátkami, byla identi-

fikována a nahrazena v doméně A2. V této sekvenci je pouze 9 rozdílů mezi lidskou a prasečí sekvencí faktoru VIII. Tento úsek lze dále analyzovat a substituovat.

Lze také připravit hybridní lidský/prasečí faktor VIII, který má sníženou nebo nulovou reaktivitu s inhibičními protilátkami, kde jsou substituce v doménách C1, C2 nebo jiných, společně a nebo bez substituce v doméně A2. Epitop C2 lze např. mapovat metodou skenování homologů v kombinaci s místně cílenou mutagenezí. Konkrétně je takový postup shodný nebo podobný postupu, který byl zde užit pro substituce v doméně A2, včetně klonování prasečí domény A2 pomocí RT-PCR nebo vyhledáváním z cDNA knihovny prasečích jater pomocí DNA lidské C2 nebo jiné domény, využití restričních míst a/nebo následné metody SOE k mapování a současnému nahrazení epitopů domény C2 nebo jiné, substituce domény C2 nebo jiné v (B-)faktoru VIII, inserce do expresního vektoru, jako je např. pBluescript, exprese v buněčné kultuře a rutinní testy na imunoreaktivitu. Pro tyto testy lze využít reaktivitu C2 hybridního faktoru VIII s C2-specifickým inhibitorem MR (Scandella et al., *Throm. Homeostasis* 67: 665–671, 1992 a Lubin et al., 1994) a/nebo jiné C2-specifické protilátky připravené afinitní chromatografií.

Doména C2 obsahuje aminokyselinové zbytky 2173 až 2332 (sekvence id. č. 2). V tomto úseku 154 aminokyselin je zřejmě inhibiční aktivita namířena na úsek v délce 65 aminokyselin mezi zbytky 2248 a 2312 (podle Shima, M. et al., *Thromb. Haemostas.* 69: 240–246, 1993. Jestliže jsou lidská C2 a prasečí C2 sekvence faktoru VIII v tomto úseku z 85 % identické, jako je tomu v jiných funkčně aktivních úsecích faktoru VIII, pak je přibližně 10 rozdílných aminokyselin mezi lidskou a prasečí aminokyselinovou sekvencí C2 faktoru VIII, které lze využít jako počáteční cíle ke konstrukci hybridů se substitucemi v C2 sekvenci.

Je pravděpodobné, že klinicky významné epitopy faktoru VIII jsou vázány na domény A2 a C2. Avšak byly identifikovány i protilátky k jiným úsekům (A1, A3, B nebo C1) faktoru VIII, jejichž epitopy lze mapovat a eliminovat postupy popsány v předkládaném vynálezu, aby se získaly molekuly neantigenního hybridního lidského/prasečího faktoru VIII.

Konkrétně se např. může mapovat domnělý druhý epitop lehkého řetězce a/nebo jakýkoliv další, epitop v kterékoliv doméně lidského nebo zvířecího faktoru VIII. Na počátku se provede stanovení přítomnosti třetího inhibitorového epitopu v doménách A2 nebo C1 následujícím postupem. Užitím lidské (H) a prasečí (p) aminokyselinové sekvence faktoru VIII jakožto modelů, se konstruovaly hybridy A1p–A2p–A3p–C1H–C2P a A1p–A2p–A3H–C1p–C2p bez domén B. Inhibiční IgG z plazmy asi 20 pacientů (Dr. Dorothea Scandella, Americký červený kříž), kteří měli nízký nebo nedetekovatelný titr protilátek proti prasečímu faktoru VIII, byl užit v testu proti hybridům. Pokud je třetí epitop v doméně A3, inhibiční IgG bude reagovat s A1p–A2p–A3H–C1p–C2p ale nikoliv s A1p–A2p–A3p–C1H–C2P hybridem. A naopak, pokud je třetí epitop v doméně C1, inhibiční IgG bude reagovat s A1p–A2p–A3p–C1H–C2P ale nikoliv s A1p–A2p–A3H–C1p–C2p hybridem. Pokud se identifikuje třetí epitop, charakterizuje se stejným postupem jaký byl popsán pro epitopy A2 a C2. Např. protilátky specifické proti epitopům domén C1 nebo A3 lze izolovat z celkového IgG pacienta pomocí afinitní chromatografie s užitím hybridů A1p–A2p–A3p–C1H–C2P a A1p–A2p–A3H–C1p–C2p, a eliminací C2 specifických protilátek průchodem SepharoseTM s rekombinantním faktorem VIII. Předpokládaný třetí epitop je pak identifikován pomocí konstruktů metodou SOE, kdy ve výhodném provedení části domén A3 nebo C1 lidského faktoru VIII se systematicky nahrazují prasečími sekvencemi.

Hybridní faktor VIII se sníženou imunogenicitou

Molekula je imunogenní, když může indukovat tvorbu protilátek u člověka nebo zvířete. Předkládaný vynález poskytuje prokoagulační rekombinantní hybridní lidský/zvířecí nebo zvířecí/zvířecí faktor VIII, hybridní ekvivalentní faktor VIII nebo jejich fragmenty, které jsou méně imunogenní než lidský nebo prasečí faktor VIII divokého typu u člověka nebo zvířete, kde odpovídající aminokyselinová sekvence, která má imunogenní aktivitu faktoru VIII jednoho biologického

druhu je nahrazena alespoň jednou specifickou aminokyselinovou sekvencí obsahující jednu nebo více jedinečných aminokyselin faktoru VIII jiného druhu, nebo aminokyselinová sekvence lidského, zvířecího nebo hybridního faktoru VIII je nahrazena alespoň jednou sekvencí obsahující jednu nebo více aminokyselin, která nemá žádnou známou sekvenční identitu se sekvencí faktoru VIII. Taková hybridní molekula se užije ke snížení výskytu vývoje inhibitorů u člověka nebo zvířete a k léčení deficiencie faktoru VIII, a zvláště výhodně u pacientů s hemofilií dosud neléčených. Ve výhodném provedení hybridní faktor VIII obsahuje lidskou aminokyselinovou sekvenci faktoru VIII, kde jeden nebo několik alaninových zbytků bylo užito k nahrazení lidské aminokyselinové sekvence s imunogenní aktivitou, čímž vznikla prokoagulační rekombinantní hybridní molekula nebo její fragment, které mají sníženou nebo nemají žádnou imunogenicitu pro člověka nebo zvíře.

Zde popsany postup mapování epitopů a mutační analýzy, kombinovaný se substitucí neantigenních aminokyselinových sekvencí za antigenní v molekule faktoru VIII, užitím hybridního lidského/prasečího faktoru VIII, vede k přípravě hybridní molekuly s nízkou antigenicitou. Pomocí tohoto modelu a souvisejících postupů lze jakýkoliv konstrukt zde popsany změnit metodou místně cílené mutagenese tak, že se odstraní co možná největší část funkčního epitopu, aby se snížila možnost imunitního systému rozpoznat hybridní faktor VIII, čímž se níží imunogenita.

Jednou z metod, která se může užít k dalšímu snížení antigenicity a ke konstrukci méně imunogenních hybridů faktoru VIII je metoda alaninové skenovací mutagenese, kterou popsali Cunningham, B.C. et al., Science 244: 1081–1085, 1989, vybraných specifických aminokyselinových sekvencí lidského, zvířecího nebo hybridního faktoru VIII. Při této metodě alaninové skenovací mutagenese jsou vedlejší aminokyselinové řetězce, které jsou dle předpokladu součástí epitopů, nahrazeny alaninovými zbytky pomocí místně cílené mutagenese. Srovnáním vazby protilátky na alaninové mutanty a na protein divokého typu dovolí stanovit relativní příspěvek jednotlivých postranních řetězců k vazebné interakci. Alaninové substituce jsou zvláště užitečné, neboť příspěvky postranních řetězců k vazbě protilátek jsou eliminovány za β uhlíkem, ale na rozdíl od substituce glycinem konformace hlavního řetězce je obvykle nezměněna. Alaninová substituce nemá žádné hlavní sterické, hydrofobní nebo elektrostatické účinky, které by ovládaly protein–proteinové interakce.

V proteinových interakcích antigen–protilátka je obvykle 15 až 20 postranních řetězců antigenu v kontaktu s protilátkou. Interakce postranních řetězců, na rozdíl od interakcí vedlejších řetězců, jsou pro interakce protein–protein dominantní. Na základě nedávných studií se předpokládá, že pouze několik málo (3 až 5) z těchto interakcí postranních řetězců přispívá k většině vazebné energie (viz Clackson, T. et al., Science 267: 383–386, 1995). Rozsáhlá analýza epitopů růstových hormonů pro několik myších monoklonálních protilátek ukázala následující hierarchii příspěvků postranních řetězců k celkové vazebné energii: Arg > Pro > Glu – Asp – Phe – Ile, přičemž Trp, Ala, Gly a Cys nebyly testovány (Jin, L. et al., J. Mol. Biol. 226: 851–865). Výsledky s epitopem A2 popsané v předkládaném vynálezu jsou v souladu s tímto zjištěním, neboť dvanáct z 25 zbytků v segmentu 484–508 A2 obsahuje tyto postranní řetězce (viz tabulka 1).

Zjištění, že určité aminokyselinové zbytky jsou zvláště dobře rozpoznávány protilátkami, ukazuje, že odstranění těchto zbytků ze známého epitopu může snížit schopnost imunitního systému rozpoznávat tyto epitopy, tj. učiní danou molekulu méně imunogenní. V případě epitopů A2 lze imunogenní zbytky nahradit, aniž by došlo ke ztrátě koagulační aktivity. Tak např. v HP9 je Arg484 nahrazen Ser, Pro485 je nahrazen Ala, Arg489 je nahrazen Gly, Pro492 je nahrazen Leu a Phe501 je nahrazen Met. A dále výsledky získané s plazmou pacientů použitou k testování imunoreaktivity hybridních konstruktů lidských/prasečích faktorů VIII popisované v příkladu 8, ukazují, že protilátky z různých pacientů rozpoznávají stejný nebo velmi podobný strukturní úsek domény A2 a že aminokyselinové zbytky domény A2 podílející se na vazbě A2 inhibitorů vykazují minimální proměnlivost. Takže A2 epitop obsažený v úseku lidského faktoru VIII

484–508 je imunodominantní epitop v tom smyslu, že je rozpoznáván imunitním systémem lépe než jiné strukturní úseky faktoru VIII. Nahrazení této struktury neantigenní sekvencí faktoru VIII z jiného biologického druhu nebo aminokyselinovou sekvencí odlišnou od sekvence faktoru VIII při současném zachování plné koagulační aktivity, vede ke změně rozpoznávání hybridního nebo ekvivalentního hybridního faktoru VIII imunitním systémem.

Má se za to, že místně cílená mutagenese pro náhradu velkých a/nebo nabitých aminokyselinových zbytků, které převládají v epitopech, malými neutrálními postranními řetězci (např. alaninem) vede ke vzniku méně imunogenních úseků. Očekává se, že molekuly obsahující několik takových substitucí v každém významném inhibičním epitopu budou obtížně rozpoznatelné imunitním systémem, neboť nebudou pasovat do mechanismu zámku a klíče, který je typický pro tento druh interakcí antigen–protilátka. Vzhledem k jejich nízké antigenicitě takové hybridní molekuly jsou užitečné k léčení deficiencie faktoru VIII u pacientů s inhibitory, a vzhledem k jejich nízké imunogenicitě jsou užitečné k léčení dříve neléčených pacientů s hemofilii A.

Obecným výsledkem je, že náhrada jednoho z klíčových zbytků je dostatečná ke snížení vazebné konstanty pro danou protein–proteinovou interakci o několik řádů. Takže je pravděpodobné, že všechny epitopy faktoru VIII obsahují omezený počet aminokyselin, které jsou kritické pro to, aby se vyvinuly inhibitory. Pro každý epitop faktoru VIII náhrada alespoň jedné sekvence obsahující jednu nebo několik specifických aminokyselin mající imunogenní aktivitu alaninem, může poskytnout aktivní molekulu, která je méně imunogenní než faktor VIII divokého typu. Ve výhodném provedení vynálezu je faktor VIII bez domény B.

Způsob přípravy aktivního rekombinantního hybridního nebo ekvivalentního hybridního faktoru VIII substitucí aminokyselin s malou nebo nulovou imunogenní aktivitou za původní aminokyselinové sekvence faktoru VIII, při kterých se užívá hybridní lidský/prasečí faktor VIII se substitucí aminokyselin v doméně A2, je popsán dále jako jeden z příkladů provedení předkládaného vynálezu. Úsek 484–508 lidského faktoru VIII obsahuje 25 aminokyselinových zbytků. Místně cílené mutagenese lze užít k tomu, že se každý z těchto zbytků nahradí kteroukoliv z ostatních 19 aminokyselin v celkovém počtu 475 mutant. Kromě toho se mohou konstruovat také mutantní molekuly obsahující více než jednu mutaci.

Hybridní konstrukty se pak testují na antigenicitu měřením vazebné konstanty pro inhibiční protilátky, jak popsali Friguet et al., J. Immunol. Methods 77: 305–319, 1985. Ve výhodném provedení vynálezu je hodnota vazebné konstanty snížena nejméně o tři řády, což by vedlo ke snížení Bethesda titru na klinicky nevýznamnou hladinu. Např. IC_{50} (hrubé měřítko vazebné konstanty) inhibice pro A2 protilátky byla snížena u hybridního konstruktu lidského/prasečího faktoru VIII HP2, HP4, HP5, HP7 a HP9, které jsou popsány v příkladu 8, a to bylo spojeno se snížením Bethesda titru na neměřitelnou hladinu. Lze předpokládat, že např. dvojitá nebo trojitá alaninová mutanta lidského faktoru VIII (např. trojitá mutanta lidského faktoru VIII Arg484 → Ala, Arg489 → Ala, Phe501 → Ala) poskytne molekulu s dostatečně nízkou antigenicitou pro terapeutické použití. Podobné mutace lze provést v epitopu C2 a také v předpokládaném třetím epitopu. Výhodné provedení vynálezu obsahuje dvě nebo tři alaninové substituce ve dvou nebo třech epitopech faktoru VIII. Lze také provést další substituce v těchto dvou úsecích.

Ve výhodném provedení vynálezu byl identifikován hybridní ekvivalentní faktor VIII, který je méně antigenní a/nebo imunogenní pro člověka a zvíře než lidský nebo prasečí faktor VIII. Takový hybridní ekvivalentní konstrukt se testuje na zvířatech, zda má sníženou antigenicitu a/nebo imunogenicitu. Jako zvířecí modely lze užít např. králíky, prasata, psy, myši, primáty a jiné savce, a to jak kontroly tak zvířata s deficiencí faktoru VIII. Podle jednoho experimentálního protokolu se hybridní nebo ekvivalentní hybridní faktor VIII podává systematicky po dobu šesti měsíců až jednoho roku zvířeti, výhodně intravenózními infuzemi a v dávce 5 až 50 jednotek/kg (U/kg) tělesné hmotnosti, výhodně 10 až 50 U/kg a nejvýhodněji 40 U/kg tělesné hmotnosti. Protilátky se měří ve vzorcích plazmy odebrané v intervalech po infúzi po dobu testování

rutinními metodami jako je imunotest a Bethesda test. Ve vzorcích se také měří koagulační aktivita rutinním postupem, např. jednofázovým koagulačním testem.

Hybridní ekvivalentní molekuly faktoru VIII se testují na člověku, zda mají sníženou antigenicitu a/nebo imunogenicitu, a to alespoň ve dvou typech klinických testů. V jenom typu klinického testu, který je navržen ke stanovení toho, zda je hybridní nebo ekvivalentní hybridní faktor VIII imunoreaktivní s inhibičními protilátkami, se podává hybridní nebo hybridní ekvivalentní faktor VIII, výhodně intravenózní infúzí, přibližně 25 pacientům s deficiencí faktoru VIII, kteří mají protilátky proti faktoru VIII, které inhibují koagulační aktivitu terapeutického lidského nebo prasečího faktoru VIII. Dávka hybridního nebo ekvivalentního hybridního faktoru VIII je 5 až 50 jednotek/kg (U/kg) tělesné hmotnosti, výhodně 10 až 50 U/kg a nejvýhodněji 40 U/kg tělesné hmotnosti. Přibližně 1 hodinu po každém podání se měří obnova faktoru VIII ve vzorcích krve jednofázovým koagulačním testem. Vzorky se odebírají znovu přibližně 5 hodin po infúzi a znovu se měří obnova. Celková obnova a rychlost úbytku faktoru VIII ze vzorků slouží k predikci titru protilátek a inhibiční aktivity. Když je titr protilátek vysoký, obnova faktoru VIII je obvykle neměřitelná. Výsledky obnovy se srovnávají s obnovou u pacientů, kteří jsou léčeni lidským faktorem VIII získaným z plazmy, rekombinantním lidským faktorem VIII, prasečím faktorem VIII a dalšími obecně užívanými terapeutickými formami faktoru VIII nebo náhražkami faktoru VIII.

Ve druhém typu klinických testů, které jsou navrženy ke zjištění, zda je hybridní nebo ekvivalentní hybridní faktor VIII imunogenní, tj. zda se proti faktoru VIII u pacienta vytvoří inhibiční protilátky, hybridní nebo ekvivalentní hybridní faktor VIII se podává, jak bylo již popsáno, přibližně 100 dosud neléčených pacientů s hemofilií, u kterých se nevyvinuly protilátky proti faktoru VIII. Léčení se provádí přibližně jednou za dva týdny po dobu 6 měsíců až jednoho roku. V intervalech 1 až 3 měsíců se odebírají vzorky krve a provádí se Bethesda test a další testy ke stanovení přítomnosti inhibičních protilátek. Také se po každé infúzi může provést test obnovy faktoru VIII, jak bylo již výše popsáno. Výsledky se porovnávají u hemofilických pacientů, kteří dostali faktor VIII získaný z plazmy, rekombinantní lidský faktor VIII, prasečí faktor VIII nebo jinou obecně užívanou terapeutickou formu faktoru VIII nebo náhražku faktoru VIII.

Příprava hybridního faktoru VIII užitím aminokyselinové sekvence lidského a savčího, jiného než lidského a prasečího, faktoru VIII

Stejně metody, jaké byly užity k přípravě hybridního lidského/prasečího faktoru VIII substitucí specifických aminokyselin se užijí také k přípravě rekombinantního hybridního lidského/savčího jiného než lidského a prasečího faktoru VIII nebo zvířecího/zvířecího faktoru VIII, který má ve srovnání s lidským nebo prasečím faktorem VIII, změněnou nebo stejnou koagulační aktivitu a/nebo stejnou nebo sníženou imunoreaktivitu a/nebo imunogenicitu, a to na základě substituce jedné nebo více aminokyselin v doméně A2, C2 nebo jiné doméně.

Podobná srovnání aminokyselinové sekvence identity se provedou pro lidská a savčí jiný než lidský a prasečí protein faktoru VIII, aby se stanovily aminokyselinové sekvence, ve kterých spočívá prokoagulační aktivita, anti-A2 a anti-C2 imunoreaktivita a/nebo imunogenicitu nebo imunoreaktivita a/nebo imunogenicitu jiných domén. Podobné metody se užijí k přípravě hybridního lidského/savčího jiného než lidského prasečího faktoru VIII. Jak bylo již popsáno výše, funkční analýza hybridů umožní odhalit ty, které mají sníženou reaktivitu s inhibičními protilátkami a/nebo sníženou imunogenicitu a/nebo zvýšenou koagulační aktivitu, a sekvence se mohou dále podrobněji analyzovat pomocí bodových mutací.

Tak např. výše popsaným postupem lze připravit hybridní lidský/myší faktor VIII. Srovnání a přiřazení aminokyselin lidské domény A2 (sekvence id. č. 2) a myší A2 (sekvence id. č. 6) je ukázáno na obr. 1C. Jak popsali Elder et al., protein faktoru VIII kódovaný myší cDNA (sekvence id. č. 5) obsahuje 2319 aminokyselinových zbytků se 74% sekvence identity s lidskou sekvencí (sekvence id. č. 2) v celém rozsahu sekvence (87% identita při vyloučení

domény B) a je o 32 aminokyselin kratší než lidský faktor VIII. Aminokyselinové sekvence myší domény A a C jsou vysoce konzervativní (sekvence id. č. 6) s 84 a 93% sekvenční identitou s lidskou sekvencí (sekvence id. č. 2), zatímco doména B a dvě krátké kyselé domény mají 42 a 70% sekvenční identitu. Specificky myší aminokyselinové sekvence A1, A2 a A3 (sekvence id. č. 6) jsou v 85%, 85 a 90% identické s odpovídající lidskou sekvencí (sekvence id. č. 2). Myší aminokyselinové sekvence C1 a C2 jsou v 93 a 84% identické s odpovídající lidskou sekvencí. V predikované aminokyselinové sekvenci myšího faktoru VIII (sekvence id. č. 6), když se užije identita aminokyselin pro účely číslování, jsou domény A1, A2 a A3 homologní s aminokyselinami 1–372, 373–740 a 1690–2032 sekvence lidského faktoru VIII.

Štěpné místo trombinu/faktoru Xa a všechna ostatní kromě štěpného místa aktivovaného proteinu C jsou zachována v myším faktoru VIII. Také tyrosinový zbytek pro vazbu von Willebrandova faktoru je zachován.

Podle Eldera et al. nukleotidová sekvence myšího faktoru VIII (sekvence id. č. 5) obsahuje 7519 bází a má 67% sekvenční identitu v celém rozsahu sekvence s lidskou nukleotidovou sekvencí (sekvence id. č. 1). Myší kódující sekvence velikosti 6957 párů bází má 82% sekvenční identitu s kódující sekvencí velikosti 7053 párů bází lidského faktoru VIII. Pokud se ze srovnání vynechá doména B, pak je zde 88% nukleotidová sekvenční identita.

Elder et al. popsali, že lidský a myší mají celkovou identitu 74 % a že 95 % zbytků v lidské sekvenci, které, jsou-li změněny, způsobují hemofilii, je zachováno v myší sekvenci. Tyto údaje podporují využití stejných postupů, které byly použity k identifikaci aminokyselinové sekvence s koagulační aktivitou a/nebo imunoreaktivitou k protilátkám u prasečího faktoru VIII, také u faktoru VIII myší a jiných zvířat ke stanovení obdobných aminokyselinových sekvencí a přípravě hybridních molekul.

Příprava hybridního faktoru VIII se sníženou křížovou reaktivitou užitím aminokyselinové sekvence lidského a savčího jiného než lidského a prasečího faktoru VIII a aminokyselinové sekvence odlišné od sekvence faktoru VIII

Prasečí faktor VIII se užívá klinicky k léčení deficiencie faktoru VIII u pacientů, kteří mají inhibiční protilátky proti faktoru VIII. Křížová reaktivita, kterou lidská plazma reaguje s prasečím faktorem VIII, může být snížena přípravou hybridního lidského a savčího jiného než lidského a prasečího faktoru VIII nebo ekvivalentního hybridního faktoru VIII. Ve výhodném provedení vynálezu se provádí stanovení, zda inhibitor specifický proti lidské doméně A2, C2 nebo jiné reaguje se savčím jiným než lidským a prasečím faktorem VIII, a sice pomocí rutinního Bethesda testu a plazmy jiného savce jako standardu. Titry inhibitoru se měří obvykle v plazmě, takže purifikovaný faktor VIII jiného savce není nutný. Pokud inhibitory nereagují s faktorem VIII jiného savce, např. myším faktorem VIII, jehož sekvence je známá, je možné užít sekvence jiného savce k nahrazení sekvencí v úseku epitopu prasečího faktoru VIII, který byl identifikován u lidských/prasečích hybridů. Jakmile je jednou zvířecí sekvence známa, je možné užít metodu místně cílené mutageneze, např. oligonukleotidem zprostředkované mutageneze jak bylo popsáno v práci Kunkel, T.A. et al., Meth. Enzymol. 204: 125–139, k přípravě hybridního prasečího/zvířecího faktoru VIII. Pokud je plazma jiného zvířete méně reaktivní s A2, C2 inhibitory nebo jinými inhibitory faktoru VIII než myší nebo prasečí faktor VIII, zvířecí sekvence odpovídající prasečímu epitopu může být určena rutinním postupem, jako např. RT-PCR a hybridní lidský/zvířecí nebo prasečí/zvířecí faktor VIII lze zkonstruovat místně cílenou mutagenezí. Lze také připravit hybridní lidský/zvířecí nebo prasečí/savčí jiný než prasečí faktor VIII, který má sníženou křížovou reaktivitu s lidskou plazmou ve srovnání s prasečím faktorem VIII, kde je aminokyselinová sekvence nahrazena odpovídající sekvencí jednoho nebo několika zvířat. V dalším provedení vynálezu je možné snížit křížovou reaktivitu tím, že se sekvence prasečího epitopu nahradí aminokyselinovou sekvencí, která nemá žádnou známou identitu s faktorem VIII, výhodně alaninovými zbytky metodou alaninové skenovací mutageneze.

Pro identifikaci klinicky významných epitopů jsou exprimovány molekuly rekombinantního hybridního faktoru VIII, které mají menší nebo stejnou křížovou reaktivitu ve srovnání s prasečím faktorem VIII, když se testují *in vitro* proti celé řadě vzorků plazmy s inhibitory. Výhodně jsou tyto molekuly kombinované hybridy A2/C2, kde je imunoreaktivní amino-

5 kyselinová sekvence v těchto doménách nahrazena doménou jiného savce. Lze provést další mutagenезi těchto úseků, aby se snížila křížová reaktivita. Snížená křížová reaktivita, ačkoliv je žádoucí, není nutným požadavkem u produktu, který je výhodnější než současný existující koncentrát prasečího faktoru VIII, který má vedlejší účinky díky kontaminaci prasečími proteázami a může způsobovat nežádoucí účinky díky imunogenicitě sekvencí prasečího faktoru VIII.

10 Hybridní lidský/savčí nebo prasečí/savčí faktor VIII neobsahuje cizorodé prasečí proteiny. Kromě toho, extenzivní mapování epitopů dokončené u prasečí domény A2 ukázalo, že více než 95 % sekvence terapeutického hybridního lidského/prasečího faktoru VIII je lidského původu.

Příprava ekvivalentů hybridního faktoru VIII

15 Metody substitucí aminokyselin ve faktoru VIII popsané zde a v příkladech lze užít k přípravě ekvivalentních molekul prokoagulačního rekombinantního hybridního faktoru VIII nebo jejich fragmentů, kde alespoň jedna specifická aminokyselinová sekvence obsahující antigenní a/nebo imunogenní místo v lidském, zvířecím nebo hybridním faktoru VIII, byla nahrazena alespoň

20 jednou aminokyselinovou sekvencí obsahující jednu nebo více aminokyselin, která nemá žádnou známou aminokyselinovou sekvenční identitu s faktorem VIII („sekvencí odlišnou od faktoru VIII“). Výsledný ekvivalentní aktivní hybridní faktor VIII má menší nebo stejnou reaktivitu s inhibičními protilátkami faktoru VIII a/nebo menší imunogenicitu pro člověka a zvířata než lidský, zvířecí nebo hybridní faktor VIII bez substituce.

25 K vhodným aminokyselinovým sekvencím, které se mohou užít k nahrazení sekvencí kritických pro koagulační a/nebo antigenní a/nebo imunogenní aktivitu v lidském, zvířecím nebo hybridním lidském/zvířecím faktoru VIII, aby se připravil hybridní ekvivalentní faktor VIII, patří jakákoliv aminokyselinová sekvence, která nemá žádnou sekvenční identitu se sekvencí lidského nebo

30 zvířecího faktoru VIII, která má koagulační, antigenní nebo imunogenní aktivitu. Ve výhodném provedení se k nahrazení užije sekvence alaninových zbytků a metoda alaninové skenovací mutagenезe.

35 K ekvivalentním molekulám hybridního faktoru VIII podle vynálezu patří také molekuly, kde sekvencemi, které nemají žádnou známou identitu se zvířecím faktorem VIII, jsou nahrazeny aminokyselinové sekvence, které nejsou kritické pro koagulační, antigenní nebo imunogenní aktivitu.

Jak bylo již popsáno výše, v jednom provedení ekvivalentního hybridního faktoru VIII má faktor VIII sníženou křížovou reaktivitu s plazmou. Byly identifikovány v křížově reagujícím faktoru

40 VIII jeden a více epitopů, které byly nahrazeny aminokyselinovou sekvencí odlišnou od faktoru VIII, výhodně alaninovými zbytky, např. metodou alaninové skenovací mutagenезe.

Ve výhodném provedení vynálezu byla připravena ekvivalentní molekula prokoagulačního rekombinantního hybridního faktoru VIII, kde alespoň jedna sekvence obsahující jednu nebo více

45 aminokyselin obsahujících epitop a/nebo obsahující jednu nebo více aminokyselin obsahujících imunogenní místo, výhodně lidského faktoru VIII, je nahrazena alespoň jednou sekvencí obsahující jednu nebo více aminokyselin, která nemá žádnou známou sekvenční identitu s faktorem VIII, výhodně sekvencí alaninových zbytků. Výsledný ekvivalentní hybridní faktor VIII nebo jeho fragment má sníženou nebo nulovou imunoreaktivitu s inhibičními protilátkami k faktoru VIII a/nebo sníženou nebo nulovou imunogenicitu pro člověka nebo zvíře. Způsoby identifikace specifické antigenní sekvence aminokyselin v doméně A2 lidského faktoru VIII jsou popsány

50 v příkladech 7 a 8 a slouží jako příklad identifikace antigenních sekvencí v doméně A2 nebo jiných doménách lidského a zvířecího faktoru VIII a užití metod místně cílené mutagenезe, jako

je alaninové skenovací mutagenese, k substituci aminokyselinové sekvence odlišné od sekvence faktoru VIII.

Jelikož lidský epitop A2 byl zúžen na 25 aminokyselin, jak je popsáno v příkladu 8, lze provést alaninovou skenovací mutagenesi na omezeném počtu konstruktů hybridního faktoru VIII s lidskou aminokyselinovou sekvencí, aby se stanovilo, které konstrukty hybridního faktoru VIII založené na substituci aminokyselin v A2 jsou prokoagulační, nejsou imunoreaktivní a/nebo imunogenní. V doméně A2 jsou kandidáty pro substituci v hybridním konstruktě pro dosažení snížené imunogenicity a imunoreaktivity aminokyseliny Arg484, Pro485, Tyr487, Ser488, Arg489, Pro492, Val495, Phe501 a Ile508. Vazebná afinita hybridních konstruktů obsahujících každou z těchto mutant s monoklonální protilátkou mAB413 a panelem IgG specifických pro A2 z pacientů se stanovuje testem ELISA. Kterákoliv mutanta, která je aktivní a má vazebnou afinitu k A2 inhibitorům nižší nejméně o 2 řády je kandidátem pro A2 substituci v molekule faktoru VIII. Vyberou se konstrukty, které mají více než jednu mutaci na základě předpokladu, že čím více je epitop změněn, tím méně je imunogenní. Je možné, že jsou v úseku Arg484–Ile508 i další zbytky jako kandidáti, neboť zde mohou být klíčové zbytky epitopů, které jsou společné pro lidský a prasečí faktor VIII. Tak např. nabitě zbytky se často účastní protein–proteinových interakcí a skutečně substitucí Arg490 alaninem byl získán prokoagulační faktor VIII mající pouze 0,2% reaktivitu s inhibitory lidského faktoru VIII (viz tabulka VI). Podobně náhrada Lys493 alaninem je také kandidátem.

Tyto postupy se provedou také na epitopu C2 a na předpokládaném třetím epitopu, který zřejmě leží v doméně A3 nebo C1, a také na kterémkoliv epitopu identifikovaném na faktoru VIII, pro přípravu hybridních konstruktů faktoru VIII.

Diagnostické testy

cDNA hybridního lidského/zvířecího, zvířecího/zvířecího nebo ekvivalentního faktoru VIII a/nebo z ní exprimovaný protein, celek nebo část, se mohou užít jako diagnostické činidlo v testech pro detekci inhibičních protilátek k lidskému nebo zvířecímu faktoru VIII nebo hybridního lidského/zvířecího nebo ekvivalentního faktoru VIII v substrátech, jako jsou např. vzorky séra a tělních tekutin z pacientů, kteří trpí deficiencí faktoru VIII. K těmto protilátkovým testům patří např. ELISA test, imunopřenos („immunoblot“), radioimunotest, imunodifúzní test a test biologické aktivity faktoru VIII, tj. koagulační test. Způsoby přípravy reagensií a postupy těchto testů jsou odborníkům známy, tak např. imunotest pro detekci inhibičních protilátek ve vzorku pacientova séra spočívá v reakci testovaného vzorku s dostatečným množstvím hybridního lidského/zvířecího faktoru VIII, který obsahuje alespoň jedno antigenní místo, přičemž toto množství je dostatečné k tomu, že se ve vzorku vytvoří detekovatelný komplex s inhibičními protilátkami.

Sondy z nukleových kyselina nebo aminokyselin lze připravit z cDNA nebo příslušných proteinů hybridního lidského/prasečího, lidského/savčího jiného než lidského a prasečího, zvířecího/zvířecího nebo ekvivalentního faktoru VIII nebo jejich fragmentů. V některých provedeních předkládaného vynálezu se tyto sondy značí použitím barviv nebo enzymaticky, fluorescenčně nebo chemiluminiscencí nebo radioaktivní značkou, které jsou komerčně dostupné. Aminokyselinové sondy se užívají např. pro screening séra nebo jiné tělesné tekutiny, pokud jsou v podezření z přítomnosti inhibitorů k lidskému, zvířecímu nebo hybridnímu lidskému/zvířecí faktoru VIII. Lze tak kvantifikovat hladiny inhibitorů u pacientů s rovnat se zdravými kontrolními jedinci, což lze užít např. ke stanovení toho, zda pacient s deficiencí faktoru VIII může být léčen hybridním nebo ekvivalentním hybridním faktorem VIII. Sondy cDNA se mohou užít pro výzkumné účely ke screeningu DNA knihoven.

Farmaceutické přípravky

Farmaceutické přípravky obsahující hybridní lidský/zvířecí, prasečí/savčí jiný než lidský a prasečí, zvířecí–1/zvířecí–2 nebo ekvivalentní faktor VIII, samotný nebo v kombinaci

s vhodnými farmaceutickými stabilizátory, vehikuly a/nebo nosiči, jsou připravovány známými metodami, např. jak je popsal E.W. Martin v Remington's Pharmaceutical Sciences.

5 V jednom výhodném provedení vynálezu výhodným nosičem nebo vehikulem pro intravenózní infúze je fyziologický roztok nebo fosfátem pufovaný fyziologický roztok.

V jiném výhodném provedení vynálezu vhodnou stabilizační sloučeninou, vehikulem a nosičem je např. jiný lidský nebo zvířecí protein, jako např. albumin, přičemž vynález není omezen pouze na tento protein.

10 Fosfolipidové vehikuly nebo liposomové suspenze jsou také výhodné farmaceuticky přijatelné nosiče nebo vehikula. Lze je připravit odborníkům známými metodami a patří k nim např. sloučeniny fosfytidylserin/fosfatidylcholin nebo jiné sloučeniny fosfolipidů nebo detergentů, které společně propůjčují na povrch negativní náboj, jelikož se faktor VIII váže na negativně nabitě fosfolipidové membrány. Liposomy lze připravit rozpuštěním vhodných lipidů (jako je
15 např. stearylfosfatidyletanolamin, stearylfosfatidylcholin, arachidoylfosfatidylcholin nebo cholesterol) v anorganickém rozpouštědle, které se pak odpaří a zanechá tenký film suchého lipidu na stěně nádoby. Vodný roztok hybridního faktoru VIII se pak přidá do nádoby a nádob se pak v ruce otáčí, aby se lipidový materiál uvolnil ze stěn nádoby a dispergovaly se lipidové agregáty, čímž se vytvoří suspenze liposomů.

20 Hybridní faktor nebo hybridní ekvivalentní faktor VIII se může kombinovat s dalšími vhodnými stabilizujícími sloučeninami, vehikuly a/nebo nosiči, k nimž patří koagulační faktor závislý na vitaminu K, tkáňový faktor a von Willebrandův faktor (vWf) nebo jeho fragment, který obsahuje vazebné místo pro faktor VIII, a polysacharidy jako je např. sacharóza.

25 Hybridní nebo hybridní ekvivalentní faktor VIII lze podávat také pomocí genové terapie stejně jako se může podávat lidský faktor VIII, např. pomocí retrovirových vektorů. Tento postup spočívá v inkorporaci cDNA faktoru VIII do lidských buněk, které se pak transplantují přímo pacientovi s deficiencí faktoru VIII nebo se vloží do implantátu, který je propustný pro faktor
30 VIII a nikoliv pro buňky, který se pak implantuje pacientovi. Výhodným způsobem přenosu je retrovirem zprostředkovaný přenos genu. Při tomto způsobu se exogenní gen (např. cDNA faktoru VIII) klonuje do genomu modifikovaného retroviru. Gen je pak vložen do genomu hostitelské buňky mechanismem retrovirové integrace, kde je pak buňkou exprimován. Retrovirový vektor je modifikován tak, že neprodukuje virus, čímž je zabráněno virové infekci hostitele. Obecné
35 principy takové terapie jsou odborníkům známy a jsou přehledně popsány v odborné literatuře (viz např. Kohn, D.B., et al., Transfusion 29: 812-820, 1989).

Hybridní faktor VIII se může uchovávat navázaný na von Willebrandův faktor (vWf), aby se zvýšil poločas a doba skladovatelnosti hybridní molekuly, kromě toho lyofilizace faktoru VIII
40 může zlepšit výtěžek aktivních molekul v přítomnosti vWf. Současné způsoby skladování lidského a zvířecího faktoru VIII užívané komerčními dodavateli lze užít i k uskladnění hybridního faktoru VIII. K těmto metodám patří např. 1) lyofilizace faktoru VIII v částečně purifikovaném stavu, tj. jako tzv. koncentrát faktoru VIII, který se bez další purifikace podává infúzí, 2) imunoafinitní purifikace faktoru VIII Zimmermanovou metodou a lyofilizace v přítomnosti
45 albuminu, která stabilizuje faktor VIII a 3) lyofilizace rekombinantního faktoru VIII v přítomnosti albuminu.

Kromě toho faktor VIII je stabilní nekonečně dlouho při 4 °C v roztoku obsahujícím 0,6M NaCl, 20mM MES a 5mM CaCl₂, pH 6,0, a také může být uchováván jako zmražený v tomto pufru,
50 kdy po roztátí dochází k minimální ztrátě aktivity.

Použití faktoru VIII k léčení

Hybridní nebo ekvivalentní hybridní faktor VIII se užívá k léčení nekontrolovatelného krvácení v důsledku deficiencie faktoru VIII (např. intraartikulárního, intrakraniálního nebo gastrointesti-

nálního krvácení) u hemofiliků s inhibičními protilátkami nebo bez nich a u pacientů se získanou deficiencí faktoru VIII po rozvinutí inhibičních protilátek. Aktivní materiály jsou výhodně podávány intravenózně.

- 5 Kromě toho hybridní nebo ekvivalentní hybridní faktor VIII může být podáván transplantací geneticky upravených buněk, které produkují hybridní faktor VIII, nebo implantací zařízení, které obsahuje takové buňky, jak již bylo zmíněno.

- 10 Ve výhodném provedení vynálezu farmaceutické přípravky obsahující hybridní nebo ekvivalentní hybridní faktor VIII samotný nebo v kombinaci se stabilizátory, vehikuly a/nebo nosiči, jsou podávány pacientovi intravenózní infúzí stejným způsobem, jaký se užívá k infúzi lidského faktoru VIII.

- 15 Dávky přípravku hybridního nebo ekvivalentního hybridního faktoru VIII, které je třeba podávat pacientovi, který takové léčení potřebuje, kolísají v závislosti na závažnosti deficiencie faktoru VIII. Obecně je frekvence, trvání a velikost dávky nastavena v souladu se závažností a trváním krvácivé epizody každého pacienta. Tudiž hybridní nebo ekvivalentní hybridní faktor VIII je přítomen ve farmaceuticky přijatelném nosiči, vehikulu nebo stabilizátoru v množství dostatečném k tomu, aby pacientovi bylo podáno terapeuticky účinné množství hybridního faktoru VIII
20 k zastavení krvácení, jak je měřeno standardními koagulačními testy.

- Faktor VIII je klasicky definován jako látka přítomná v krevní plazmě, která napravuje defekt koagulace v plazmě jedince s hemofilií A. Koagulační aktivita *in vitro* purifikovaných a částečně purifikovaných forem faktoru VIII se užívá k výpočtu dávek pro infúze pacientům a je spolehlivým indikátorem aktivity obnovené v plazmě pacienta a nápravy jeho krvácení *in vivo*. Nebyly
25 popsány žádné rozpory mezi standardními testy nových molekul faktoru VIII *in vitro* a jejich chováním při infúzích na psím modelu nebo u lidí (viz Lusher J.M. et al., New England J. med. 328: 453–459, Pittman, D.D. et al., Blood 79: 389–397, 1992 a Brinkhous et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8752–8755, 1985).

- 30 Obvykle plazmatická hladina faktoru VIII, které je třeba dosáhnout u pacienta podáváním hybridního nebo hybridního ekvivalentního faktoru VIII, je v rozmezí 30 až 100 % normální hodnoty. Při výhodném způsobu podávání hybridního nebo hybridního ekvivalentního faktoru VIII se přípravek podává intravenózně ve výhodné dávce 5 až 50 jednotek/kg tělesné hmotnosti, výhodněji 10 až 50 a nejvýhodněji 20 až 40 jednotek/kg tělesné hmotnosti, s frekvencí 8 až 24 hodin (u
35 silně postižených hemofiliků) a délkou trvání léčení 1 až 10 dnů nebo až do zastavení krvácení (viz např. Roberts H.R. a M.R. Jones, „Hemophilia and related conditions – Congenital Deficiencies of Prothrombin (Factor II, Factor IV and Factors VII to XII)“, kapitola 153, s. 1453–1474, 1460, v: Hematology, Williams, W.J. et al. (ed.), 1990). Pacienti s inhibičními protilátkami vyžadují vyšší dávky hybridního nebo ekvivalentního hybridního faktoru VIII nebo pacienti
40 vyžadují méně hybridního nebo ekvivalentního hybridního faktoru VIII vzhledem k jeho vyšší specifické aktivitě ve srovnání s lidským faktorem VIII nebo snížené reaktivitě s protilátkami nebo snížené imunogenicitě. Stejně jako při léčení lidským nebo prasečím faktorem VIII, množství hybridního nebo ekvivalentního hybridního faktoru VIII podávané infúzí je určeno na
45 základě jednofázového koagulačního testu a ve vybraných případech se určí obnova *in vivo* měřením faktoru VIII v plazmě pacienta po infúzi. Je třeba mít na zřeteli, že pro každého jednotlivého pacienta je třeba stanovit specifický dávkovací režim na základě jeho individuální potřeby a dle profesionálního úsudku odborníka, který podává nebo dohlíží na podávání přípravku, a tedy že koncentrace uvedené zde slouží jen jako příklady a nijak neomezují použití
50 přípravku podle předkládaného vynálezu.

- Léčení může mít formu podávání jednotlivých intravenózních dávek přípravku nebo periodických nebo souvislých podávání po určité delší období v závislosti na potřebě. Alternativně hybridní nebo hybridní rekombinantní faktor VIII může být podáván subkutánně nebo perorálně
55 pomocí liposomů v jedné nebo několika dávkách v různých časových intervalech.

Hybridní nebo hybridní rekombinantní faktor VIII může být užit také k léčení nekontrolovatelného krvácení způsobeného deficitem faktoru VIII u hemofiliků, u kterých se vyvinuly protilátky proti lidskému faktoru VIII. V takovém případě koagulační aktivita vyšší než koagulační aktivita lidského nebo zvířecího faktoru VIII není nutná. Koagulační aktivita i nižší než koagulační aktivita lidského faktoru VIII (tj. menší než 3000 jednotek/mg) je užitečná, pokud nedochází k její neutralizaci v plazmě pacienta.

Hybridní nebo ekvivalentní hybridní faktor VIII a způsoby jeho izolace, charakterizace, přípravy a použití dosud jen obecně popisované jsou pro lepší pochopení dále popsány formou příkladů, které však předmět vynálezu nijak neomezuji.

Příklady provedení vynálezu

15 Příklad 1

Test prasečího faktoru VIII a hybridního prasečího/lidského faktoru VIII

Prasečí faktor VIII má na základě specifické aktivity molekuly větší koagulační aktivitu než lidský faktor VIII. Tyto výsledky jsou ukázány v tabulce III v příkladu 4. Tento závěr je založen na použití příslušných standardních křivek, které umožňují přímé srovnání lidského a prasečího faktoru VIII. Koagulační testy jsou založeny na schopnosti faktoru VIII zkrátit dobu srážlivosti plazmy pocházející od pacienta s hemofilií A. Byly použity dva typy testů: jednostupňový a dvoustupňový test.

25 V jednostupňovém testu se 0,1 ml plazmy od pacienta s hemofilií A (George King Biomedical, Inc.) inkubovalo 5 minut ve 37 °C ve vodní lázni s 0,1 ml reagensie pro aktivovaný parciální tromboplastinový test (APTT) (Organon Teknika) a 0,01 ml vzorku nebo standardu, který se skládal z naředěné citrátové normální lidské plazmy. Po inkubaci bylo přidáno 0,1 ml 20mM CaCl_2 , a vizuálně se určoval čas vzniku fibrinové sraženiny.

30 Jednotka faktoru VIII je definována jako množství přítomné v 1 ml citrátové normální lidské plazmy. Aktivita prasečího a lidského faktoru VIII se srovnávala přímo při použití lidské plazmy jako standardu. Ředění plazmatického standardu nebo purifikovaných proteinů se provádělo 0,15M NaCl, 0,02M HEPES, pH 7,4. Standardní křivka se konstruovala na základě 3 nebo 4 ředění plazmy, nejvyšší ředění bylo 1/50, vynesení $\log_{10}$ koagulačního času do grafu proti $\log_{10}$ koncentraci v plazmě, což vedlo k vytvoření lineárního grafu. Jednotky faktoru VIII v neznámém vzorku se určovaly interpolací z této standardní křivky.

40 Jdnostupňový test spočívá v endogenní aktivaci faktoru VIII prostřednictvím aktivátorů tvořených v plazmě hemofilika A, zatímco dvoustupňový test měří prokoagulační aktivitu předem aktivovaného faktoru VIII. Ve dvoustupňovém testu jsou vzorky obsahující faktor VIII, který reagoval s trombinem, přidány ke směsi aktivovaného parciálního tromboplastinu a lidské plazmy hemofilika A, která byla předem inkubována 5 minut ve 37 °C. Výsledné koagulační časy pak byly konvertovány na jednotky/ml na základě stejné lidské standardní křivky popsané výše. Relativní aktivita ve dvoustupňovém testu byla vyšší než v jednostupňovém, protože faktor VIII byl předem aktivován.

Příklad 2

50 Charakteristika funkční odlišnosti mezi lidským a prasečím faktorem VIII

Izolace prasečího a z lidské plazmy pocházejícího faktoru VIII a lidského rekombinantního faktoru VIII byla v literatuře popsána v práci autorů (Fulcher, C.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci.

USA, 79, 1648–1652, 1982, Toole et al., Nature, 312, 342–347, 1984, (Genetics Institute), Gitschier et al., Nature, 312, 326–330, 1984, (Genentech), Wood et al., Nature, 312, 330–337, 1984, (Genentech), Vehar et al., Nature, 312, 337–342, 1984, (Genentech), Fass et al., Blood, 59, 594, 1982, Toole et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 5939–5942, 1986). To se může provádět
5 několika způsoby. Co se týče složení podjednotek, všechny tyto izolace jsou podobné, přestože je ve stabilitě mezi lidským a prasečím faktorem VIII funkční rozdíl.

Pro srovnání lidského rekombinantního a prasečího faktoru VIII byly preparáty vysoce purifikovaného lidského rekombinantního faktoru VIII (Cutter Laboratories, Berkeley, CA) a prasečího faktoru VIII (imunologicky purifikovaného tak, jak je popsáno v práci Fass et al., Blood, 59, 594, 1982) podrobeny analýze vysokotlakou kapalinovou chromatografií (HPLC) na iontoměničové koloně (Pharmacia, Inc.) Mono QTM (Pharmacia-LKB, Piscataway, NJ). Účelem kroku na HPLC Mono QTM byla eliminace menších nečistot při změně pufru specifického pro lidský a prasečí faktor VIII na společný pufr pro účely srovnávání. Zkumavky obsahující 1000 až 2000
15 jednotek faktoru VIII byly rekonstruovány 5 ml H₂O. Pak byl přidán HEPES (2M, pH 7,4) do finální koncentrace 0,02 M. Faktor VIII byl pak nanesen na kolonu Mono QTM HR 5/5 ekvilibrovanou 0,15M NaCl, 0,02 HEPES, 5mM CaCl₂, pH 7,4, (pufr A plus 0,15M NaCl), promyt 10 ml pufru A + 0,15M NaCl a eluován 20 ml lineárním gradientem 0,15M až 0,90M NaCl v pufru A při rychlosti průtoku 1 ml/minutu.

Pro srovnávání faktoru VIII pocházejícího z lidské plazmy (purifikovaného prostřednictvím Mono QTM HPLC) a prasečího faktoru VIII, purifikovaného imunoafinitně, byl faktor VIII pocházející z prasečí plazmy naředěn 1:4 s 0,04M HEPES, 5mM CaCl₂, 0,01% Tween-80, pH 7,4, a podroben Mono QTM HPLC ve stejných podmínkách, jak jsou popsány v předchozím
25 odstavci pro lidský faktor VIII. Tyto postupy izolace lidského a prasečího faktoru VIII jsou pro odborníka standardními postupy.

Frakce z kolon byly testovány na aktivitu faktoru VIII prostřednictvím jednostupňového koagulačního testu. Průměrné výsledky testů vyjádřené v jednotkách aktivity na A₂₈₀ materiálu
30 jsou uvedeny v tabulce II, a ukazují, že prasečí faktor VIII má při použití jednostupňového testu alespoň šestkrát větší aktivitu než lidský faktor VIII.

Tabulka II

Srovnání koagulační aktivity lidského a prasečího faktoru VIII

Faktor VIII	Aktivita (U/A ₂₈₀)
Prasečí	21 300
Pocházející z lidské plazmy	3 600
Lidský rekombinantní	2 400

35

Příklad 3

Srovnání stability lidského a prasečího faktoru VIII

Výsledky jednostupňového testu pro faktor VIII jsou odrazem aktivace faktoru VIII na faktor VIIla ve vzorku a možné ztráty aktivity vytvářeného faktoru VIIla. Bylo prováděno přímé srovnání stability lidského a prasečího faktoru VIII. Vzorky z Mono QTM HPLC (Pharmacia, Inc., Piscataway, N.J.) byly naředěny na stejnou koncentraci a složení pufru a ponechaly se reagovat s trombinem. V různé časy byly vzorky přeneseny do dvojestupňového koagulačního testu. Typicky byla vrcholná aktivita (ve 2 minutách) 10 krát větší u prasečího faktoru VIIla než u lidského faktoru VIIla, a potom se aktivity obou faktorů VIIla, prasečího i lidského, snižovaly, přičemž aktivita lidského faktoru VIIla klesala rychleji.
45

Obecně pokusy izolovat stabilní lidský faktor VIIIa nejsou úspěšné, dokonce i když jsou použity podmínky, ve kterých vzniká stabilní prasečí faktor VIIIa. Aby se toto prokázalo, byl lidský faktor VIII purifikovaný na Mono QTM HPLC aktivován trombinem a podroben kationto-
 5 měničové (Pharmacia, Inc.) Mono STM HPLC v podmínkách, ve kterých se tvoří stabilní prasečí faktor VIIIa, jak je popsáno autory Lollar et al. (Biochemistry, 28, 666, 1989).

Lidský faktor VIII, 43 µg/ml (0,2 µM) v 0,2M NaCl, 0,01M HEPES, 2,5mM CaCl₂, v pH 7,4, v celkovém objemu 10 ml, se nechal reagovat s trombinem (0,036 µM) 10 minut, v této době byl
 10 přidán FPR-CH₂Cl D-fenylprolylarginylchlormetylketon do koncentrace 0,2 µM pro ireverzibilní inaktivaci trombinu. Směs se pak naředila 1:1 s 40mM 2-(N-morfolino)etansulfonovou kyselinou (MES), 5mM CaCl₂, v pH 6,0 a nanasla rychlostí 2 ml/minutu na kolonu Mono STM HR 5/5 HPLC (Pharmacia, Inc.) ekvilibrovanou 5mM MES, 5mM CaCl₂, v pH 6,0 (pufr B) a 0,1M NaCl. Faktor VIIIa byl eluován bez promytí kolony s 20 ml gradientu 0,1M NaCl až 0,9M NaCl v pufru B rychlostí 1 ml/min.

V těchto podmínkách byla ve dvoustupňovém testu eluována frakce s koagulační aktivitou jako
 15 jeden vrchol. Specifická aktivita vrcholové frakce byla přibližně 7500 U/A₂₈₀. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE) vrcholové frakce Mono STM faktoru VIIIa, po které následovalo barvení proteinu stříbrem, odhalila dva pásy odpovídající heterodimerickému (A3-C1-C2/A1) derivátu faktoru VIII. Ačkoliv díky nízké koncentraci nebyl
 20 identifikován barvením stříbrem za těchto podmínek fragment A2, byl identifikován jako stopová složka pomocí značení ¹²⁵I.

Na rozdíl od výsledků s lidským faktorem VIII měl prasečí faktor VIIIa izolovaný prostřednictvím Mono STM HPLC za stejných podmínek specifickou aktivitu 1,6 x 10⁶ U/A₂₈₀. Analýza
 25 prasečího faktoru VIIIa prostřednictvím SDS-PAGE odhalila 3 fragmenty odpovídající podjednotkám A1, A2 a A3-C1-C2, což dokazuje, že prasečí faktor VIIIa má tři podjednotky.

Výsledky analýzy Mono STM HPLC preparátů lidského faktoru VIII aktivovaného trombinem
 30 v pH 6,0 ukazují, že lidský faktor VIIIa je labilní v podmínkách, které poskytují stabilní prasečí faktor VIIIa. Ale ačkoliv bylo ve vrcholové frakci identifikováno stopové množství fragmentu A2, nebylo možné z této metody samotné určit, zda koagulační aktivita byla důsledkem malého množství heterotrimerického faktoru VIIIa nebo heterodimerického faktoru VIII, který má nízkou specifickou aktivitu.

Aby se vyřešila tato otázka, je žádoucí izolovat, lidský faktor VIIIa před tím, než ztratí svou
 35 podjednotku A2. Za tím účelem se prováděla izolace podle postupu, který zahrnoval snížení pH pufrů Mono STM na pH 5. Lidský faktor VIII purifikovaný Mono QTM (0,5 mg) byl naředěn H₂O za vzniku konečné koncentrace 0,25 mg/ml (1 µM) faktoru VIII v 0,25M NaCl, 0,01M HEPES, 2,5mM CaCl₂, 0,005% Tween-80, pH 7,4, (celkový objem 7,0 ml). Trombin byl přidán do
 40 konečné koncentrace 0,072 µM a 3 minuty ponechán reagovat. Trombin byl pak inaktivován FPR-CH₂Cl (0,2 µM). Směs se pak naředila 1:1 40mM acetátem sodným, 5mM CaCl₂, 0,01% Tween-80, pH 5,0, a nanasla rychlostí 2 ml/minutu na kolonu Mono STM HR 5/5 HPLC ekvilibrovanou 0,01M acetátem sodným, 5mM CaCl₂, 0,01% Tween-80, pH 5,0, a 0,1M NaCl.
 45 Faktor VIIIa byl eluován bez promytí kolony s 20 ml gradientu 0,1M NaCl až 1,0M NaCl ve stejném pufru rychlostí 1 ml/minutu. To mělo za následek obnovu koagulační aktivity ve vrcholu, který obsahoval detekovatelné množství fragmentu A2, jak ukázáno pomocí SDS-PAGE a barvení stříbrem. Specifická aktivita vrcholové frakce byla desetkrát větší než frakce získané v pH 6,0 (75 000 U/A₂₈₀ proti 7 500 U/A₂₈₀). Ale na rozdíl do prasečího faktoru VIIIa izolova-
 50 ného v pH 6,0, který je trvale stabilní ve 4 °C, aktivita lidského faktoru VIIIa klesala rovnoměrně po dobu několika hodin po eluci z kolony Mono STM. Navíc specifická aktivita faktoru VIIIa purifikovaného v pH 5,0 a okamžitě testovaného je pouze 5 % aktivity prasečího faktoru VIIIa, což svědčí pro to, že před testem nastala podstatná disociace.

Tyto výsledky dokazují, že jak lidský, tak prasečí faktor VIIIa jsou složeny ze tří podjednotek (A1, A2 a A3–C1–C2). Disociace podjednotky A2 je za určitých podmínek, jako je fyziologická iontová síla, pH a koncentrace, odpovědná za ztrátu aktivity jak lidského tak prasečího faktoru VIIIa. Relativní stabilita prasečího faktoru VIIIa za určitých podmínek je způsobena silnější asociací podjednotky A2.

Příklad 4

Příprava hybridního lidského/prasečího faktoru VIII rekonstitucí podjednotek

Lehké řetězce prasečího faktoru VIII a těžké řetězce faktoru VIII byly izolovány následujícím způsobem. K prasečímu faktoru VIII purifikovanému pomocí Mono QTM byl přidán 0,5M roztok EDTA, pH 7,4, do konečné koncentrace 0,05M a byl ponechán při teplotě místnosti 18 až 24 hodin. Byl přidán stejný objem 10mM histidin–Cl, 10mM EDTA, 0,2% (objem.) Tween 80, pH 6,0 (pufr B), a roztok byl nanesen rychlostí 1 ml/minutu na kolonu Mono STM HR 5/5 předem ekvilibrovanou pufr A a 0,25M NaCl. Těžké řetězce faktoru VIII se nenavázaly na pryskyřici, jak bylo vyhodnoceno pomocí SDS–PAGE. Lehký řetězec faktoru VIII byl eluován pomocí 20 ml lineárního gradientu 0,1 až 0,7M NaCl v pufru A rychlostí 1 ml/minutu a byl homogenní na SDS–PAGE. Těžké řetězce faktoru VIII byly izolovány prostřednictvím Mono QTM HPLC (Pharmacia, Inc., Piscataway, N.J.) následujícím způsobem. Těžké řetězce faktoru VIII se neadsorbují na Mono STM během purifikace lehkých řetězců faktoru VIII. V látce prošlé kolonou, která obsahovala těžké řetězce faktoru VIII, bylo upraveno pH na 7,2 přidáním 0,5M pufru HEPES, pH 7,4, a byla nanesena na kolonu Mono QTM HR 5/5 HPLC (Pharmacia, Inc.) ekvilibrovanou 0,1M NaCl, 0,02M HEPES, 0,01% Tween–80, pH 7,4. Kolona byla promyta 10 ml tohoto pufru a těžké řetězce faktoru VIII byly eluovány 20 ml gradientu 0,1 až 1,0M NaCl v tomto pufru. Lidské lehké řetězce a těžké řetězce byly izolovány stejným způsobem.

Lidské a prasečí lehké a těžké řetězce byly rekonstituovány podle následujících kroků. 10 μ l lehkého řetězce lidského nebo prasečího faktoru VIII, 100 μ g/ml, bylo smícháno v 1M NaCl, 0,02M HEPES, 5mM CaCl₂, 0,01% Tween–80, pH 7,4, s 1) 25 μ l heterologního těžkého řetězce, 60 μ g/ml, ve stejném pufru, 2) 10 μ l 0,02M HEPES, 0,01% Tween–80, pH 7,4, a 3) 5 μ l 0,6M CaCl₂, po dobu 14 hodin při teplotě místnosti. Směs byla naředěna 1/4 0,02M MES, 0,01% Tween–80, 5mM CaCl₂, pH 6, a nanesena na kolonu Mono STM HR 5/5 ekvilibrovanou 0,1M NaCl, 0,02M MES, 0,01% Tween–80, 5mM CaCl₂, pH 6,0. 20 ml gradient byl puštěn s 0,1 až 1,0M NaCl ve stejném pufru rychlostí 1 ml/minutu a sbíraly se 0,5 ml frakce. Ve 280 nm se odečítala absorbance frakcí a frakce se testovaly pomocí měření absorbance na aktivitu faktoru VIII jednostupňovým koagulačním testem. Těžké řetězce se vyskytovaly v nadbytku, protože volný lehký řetězec (neasociovaný s těžkým řetězcem) také váže Mono STM, nadbytek těžkých řetězců zajišťuje, že částí preparátu nejsou volné lehké řetězce. Rekonstituční pokusy následované purifikací Mono STM HPLC byly prováděny se všemi čtyřmi možnými kombinacemi řetězců: lidský lehký řetězec/lidský těžký řetězec, lidský lehký řetězec/prasečí těžký řetězec, prasečí lehký řetězec/prasečí těžký řetězec, prasečí lehký řetězec/ lidský těžký řetězec. Tabulka III ukazuje, že faktor VIII kombinující lidský lehký řetězec/prasečí těžký řetězec má aktivitu srovnatelnou s nativním prasečím faktorem VIII (tabulka II), což ukazuje, že strukturální prvky prasečího těžkého řetězce jsou odpovědné za zvýšenou koagulační aktivitu prasečího faktoru VIII ve srovnání s lidským faktorem VIII.

Tabulka III

Srovnání koagulační aktivity hybridního lidského/prasečího faktoru VIII s lidským a prasečím faktorem VIII

	Aktivita (U/A ₂₃₀)
Prasečí lehký řetězec/prasečí těžký řetězec	30 600
Lidský lehký řetězec/prasečí těžký řetězec	44 100
Prasečí lehký řetězec/ lidský těžký řetězec	1 100
lidský lehký řetězec/lidský těžký řetězec	1 100

5

Příklad 5

Příprava aktivního hybridního lidského/prasečího faktoru VIII rekonstitucí domén

- 10 Z prasečí nebo lidské krve byl izolován prasečí dimer A1/A3-C1-C2, prasečí doména A2, lidský dimer A1/A3-C1-C2 a lidská doména A2, podle metody popsané v práci autorů Lollar et al. (J. Biol. Chem., 267(33), 23652-23657, 1992). Například, aby se izoloval prasečí dimer A1/A3-C1-C2, bylo zvýšeno pH prasečího faktoru VIIla (140 µg) z pH 6,0 na pH 8,0 přidáním 5N NaOH po dobu 30 minut, za vzniku disociované domény A2 a 95% inaktivace při koagulačním
- 15 testu. Směs byla naředěna 1:8 pufrům B (20mM HEPES, 5mM CaCl₂, 0,01% Tween-80, pH 7,4) a nanášena na kolonu Mono STM ekvilibrovanou v pufru B. Dimer A1/A3-C1-C2 byl eluován jako jeden ostrý vrchol v přibližně 0,4M NaCl při použití gradientu 0,1 až 1,0M NaCl v pufru B. Pro izolaci prasečí domény A2 byl získán prasečí faktor VIII podle metody autorů Lollar et al. (Biochem., 28, 666-674, 1989), začínalo se s 0,64 mg faktoru VIII. Volná prasečí doména A2
- 20 byla izolována jako minoritní složka (50 µg) v 0,3M NaCl na chromatogramu Mono STM.

Hybridní prasečí/lidské molekuly faktoru VIII byly rekonstituovány z dimerů a domén následujícím způsobem. Koncentrace a podmínky pufru byly tyto: prasečí A2, 0,63 µM v pufru A (5mM MES, 5mM CaCl₂, 0,01% Tween-80, pH 6,0) a 0,3M NaCl, prasečí A1/A3-C1-C2, 0,27 µM

25 v pufru B a 0,4M NaCl, pH 7,4, lidská A2, 1 µM v 0,3M NaCl, 10mM histidin-HCl, 5mM CaCl₂, 0,01% Tween-20, pH 6,0, lidský A1/A3-C1-C2, 0,18 µM v 0,5M NaCl, 10mM histidin-HCl, 2,5mM CaCl₂, 0,1% Tween-20, pH 6,0. Rekonstituční pokusy se prováděly smísením stejných objemů domény A2 a dimeru A1/A3-C1-C2. Ve směsných pokusech s prasečím dimerem A1/A3-C1-C2 bylo pH sníženo na 6,0 přidáním 0,5M MES, pH 6,0, na 70mM.

30

Koagulační aktivity všech čtyř možných hybridních molekul faktoru VIIla – [pA2/(hA1/A3-C1-C2)], [hA2/(pA1/A3-C1-C2)], [pA2/(pA1/A3-C1-C2)] a [hA2/(hA1/A3-C1-C2)] – byly zjištěny pomocí dvoustupňového koagulačního testu v různých časech.

- 35 Vytvoření aktivity po smíchání domén A2 a dimeru A1/A3-C1-C2 bylo téměř kompletní po jedné hodině a bylo stabilní po přinejmenším 24 hodin při 37 °C. Tabulka IV ukazuje aktivitu rekonstituovaných hybridních molekul faktoru VIIla, když byly testovány v 1 hodině. Dvoustupňový test, kterým byly získány specifické aktivity molekul faktoru VIIla, se liší od dvoustupňového testu a hodnoty nemohou být srovnány s hodnotami aktivity molekul faktoru VIII
- 40 získanými jednodušším testem.

Tabulka IV

Srovnání koagulačních aktivit hybridního lidského/prasečího faktoru VIIIa se substituovanou doménou

Hybridní fVIIIa	Specifická aktivita (U/mg)
Prasečí A2 + lidský A1/A3-C1-C2	140 000
Prasečí A2 + prasečí A1/A3-C1-C2	70 000
Lidská A2 + prasečí A1/A3-C1-C2	40 000
Lidská A2 + lidský A1/A3-C1-C2	40 000

- 5 Tabulka IV ukazuje, že největší aktivitu vykazovaly prasečí doména A2/lidský dimer A1/A3-C1-C2, po kterém následovaly prasečí doména A2/prasečí dimer A1/A3-C1-C2.

Když byla doména A2 prasečího faktoru VIIIa spojena s dimerem A1/A3-C1-C2 lidského faktoru VIIIa, bylo tedy dosaženo koagulační aktivity. Dále bylo dosaženo koagulační aktivity,
10 když byla spojena doména A2 lidského faktoru VIIIa s dimerem A1/A3-C1-C2 prasečího faktoru VIIIa. Samotné oblasti A2, A1 a A3-C1-C2 neměly koagulační aktivitu.

Příklad 6

- 15 Izolace a sekvencování domény A2 prasečího faktoru VIII

Pouze nukleotidová sekvence kódující doménu B a část domény A2 prasečího faktoru VIII byly dříve sekvencovány (Toole et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 5939-5942, 1986). Zde jsou popsány cDNA a predikované aminokyselinové sekvence (sekvence id. č. 3 a 4) pro celou
20 doménu A2 prasečího faktoru VIII.

Doména A2 prasečího faktoru VIII byla klonována pomocí reverzní transkripce z celkové RNA prasečí sleziny a pomocí amplifikace PCR (polymerázovou řetězovou reakci), byly použity degenerované primery založené na známé sekvenci cDNA lidského faktoru VIII a přesný prasečí
25 primer založený na části sekvence prasečího faktoru VIII. Byl izolován produkt PCR o velikosti 1 kb a byl amplifikován pomocí inzerce do fagemidového vektoru BluescriptTM (Stratagene).

Prasečí doména A2 byla kompletně sekvencována prostřednictvím dideoxynukleotidového sekvencování. cDNA a predikované aminokyselinové sekvence jsou zde uvedeny jako sekvence
30 id. č. 3 a 4, v daném pořadí.

Příklad 7

Příprava rekombinantního hybridního lidského/zvířecího faktoru VIII

- 35 Nukleotidové a predikované aminokyselinové sekvence (sekvence id. č. 1 a 2) lidského faktoru VIII byly popsány v literatuře [Toole et al., Nature, 312, 342-347, 1984, (Genetics Institute), Gitschier et al., Nature, 312, 326-330, 1984, (Genentech), Wood et al., Nature, 312, 330-337, 1984, (Genentech), Vehar et al., Nature, 312, 337-342, 1984, (Genentech)].

40 Vytvoření rekombinantního hybridního lidského/zvířecího faktoru VIII vyžaduje odstranění cDNA oblasti lidského faktoru VIII (Biogen Corp.) a vložení zvířecí sekvence cDNA, která má určitou sekvenční identitu. Pak je hybridní cDNA exprimována v příslušném expresním systému. Lze uvést příklad, kdy byly klonovány cDNA hybridního faktoru VIII, ve kterých některé nebo
45 všechny lidské sekvence A2 byly nahrazeny odpovídajícími prasečími doménami A2. Nejprve

byla vystřižena celá sekvence cDNA odpovídající doméně A2 lidského faktoru VIII, a pak menší část domény A2 pomocí oligonukleotidem zprostředkované mutagenese, metody odborníkově obecně známé (viz např. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, kapitola 15, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, 1989). Jednotlivé kroky celého postupu byly prováděné následujícím způsobem.

Materiál

Metoxykarbonyl-D-cyklohexylglycyl-glycyl-arginin-p-nitroanilid (Spectro-zymeTM Xa) a monoklonální protilátky antifaktor VIII ESH4 a ESH8 byly zakoupeny od firmy American Diagnostica (Greenwich, CT). Unilamelární (jednovrstevné) fosfatidylcholin/fosfatidylserinové (75/25, hmot.) vehikuly byly připraveny podle metody autorů Barenholtz, Y, et al. (*Biochemistry*, 2806–2810, 1977). Přípravek rekombinantního desulfatohirudinu byl získán od Dr. R.B. Wallise, Ciba-Geigy Pharmaceuticals (Cerritos, CA). Prasečí faktory IXa, X, Xa a trombin byly izolovány podle metod autorů Lollar et al. (*Blood*, 63, 1303–1306, 1984) a Duffy, E.J., et al. (*J. Biol. Chem.*, 207, 7621–7827, 1992). Čistý rekombinantní lidský faktor VIII bez albuminu byl získán od firmy Baxter-Biotech (Deerfield, IL).

Klonování domény A2 prasečího faktoru VIII

cDNA kódující prasečí doménu A2 byla získána po PCR reverzně transkribované mRNA z prasečí sleziny izolované podle popisu autorů Chromczynski et al. (*Anal. Biochem.*, 162, 156–159, 1987). cDNA byla připravena s použitím soupravy pro syntézu cDNA (First-strand cDNA Synthesis Kit) s náhodnými hexamery jako primery (Pharmacia, Piscataway, N.J.). PCR se provádělo s použitím degenerovaného 5' koncového primeru: 5'-AARCA YCCNAARACN-TGGG-3' (sekvence id. č. 11) založeném na krátké známé aminokyselinové sekvenci prasečí A2 a s použitím 3' koncového přesného primeru 5'-GCTCGCACTAGGGGGTCTTGAATTC-3' (sekvence id. č. 12), založeném na známé prasečí sekvenci DNA bezprostředně 3' od prasečí domény A2. Tyto oligonukleotidy odpovídají nukleotidům 1186–1203 a 2289–2313 v lidské sekvenci (sekvence id. č. 1). Amplifikace se prováděla 35 cyklů (1 minuta 94 °C, 2 minuty 50 °C, 2 minuty 72 °C) s použitím Taq DNA polymerázy (Promega Corp, Madison, WI). Amplifikovaný fragment o velikosti 1,1 kb byl klonován do pBluescript II KS- (Stratagene) v místě EcoRV s použitím postupu s T-vektorem, jak je popsán autory Murchuk, D., et al. (*Nucl. Acids Res.*, 19, 1154, 1991). Byly transformovány kompetentní buňky *Escherichia coli* XL1-Blue a byla izolována plazmidová DNA. Sekvencování se provádělo v obou směrech s použitím SequenaseTM verze 2.0 (U.S. Biochemical Corp., Division of Amersham LifeScience, Inc., Arlington Hts, IL). Tato sekvence byla ověřena prostřednictvím totožné sekvence, která byla získána přímým sekvencováním produktu PCR z nezávislé reverzní transkripce RNA ze sleziny z téhož prasete (CircumVentTM, New England Biolabs, Beverly, MA). Oblast obsahující epitop pro autoprotilátku RC byla identifikována jako 373–536 v lidském faktoru VIII (sekvence id. č. 2).

Konstrukce a exprese cDNA hybridního lidského/prasečího faktoru VIII

Lidský faktor VIII bez domény B (HB⁻, Biogen, Inc., Cambridge, MA), který nemá sekvence kódující aminokyselinové zbytky 741–1648 (sekvence id. č. 2), byl použit jako výchozí materiál pro konstrukci hybridního lidského/prasečího faktoru VIII. HB⁻ byl klonován do expresního vektoru ReNeo. Aby se usnadnila manipulace, byla cDNA faktoru VIII izolována jako fragment XhoI/HpaI z ReNeo a klonována do pBlueScript II KS štěpeného XhoI/EcoRV. Oligonukleotid 5'-CCTTCCTTTATCCAAATACG TAGATCAAGAGGAAATTGAC-3' (sekvence id. č. 7) byl použit v reakci pro místně cílenou mutagenezi při použití fágové DNA obsahující uracil, jak je popsáno autory Kunkel, T.A. et al. (*Meth. Enzymol.*, 204, 125–139, 1991), aby současně vystříhl lidskou sekvenci A2 (nukleotidy 1169–2304 ze sekvence id. č. 1) a vnesl restriční místo SnaBI. Plazmid obsahující lidský faktor VIII bez domény A2 byl naštěpen se SnaBI, po čemž následovalo přidání linkerů ClaI. Prasečí doména A2 pak byla amplifikována pomocí PCR při použití fosforylovaného 5' primeru (sekvence id. č. 8):

5' -GTAGCGTTGCCAAGAAGCACCTAAGACG-3'

a 3' primeru (sekvence id. č. 9):

5'-GAAGAGTAGTACGAGTTATTTCTCTGGGTTCAATGAC-3'.

5 K produktu PCR byly přidány linkery *Cl*I, po čemž následovala ligace do vektoru obsahujícího lidský faktor VIII. Spojení A1/A2 a A2/A3 byla opravena, aby se obnovily přesné sekvence pro štěpení trombinem a hraniční sekvence, pomocí místně cílené mutagenese s použitím oligonukleotidu uvedeného v sekvenci id. č. 8 a nukleotidů 1–22 (5' GAA...TTC ze sekvence id. č. 9) pro korekci 5' a 3' koncových spojení. Ve výsledném konstruktu označeném HP1 byla lidská doména A2 přesně nahrazena prasečí doménou A2. Předběžný produkt obsahoval nežádoucí thymidin ve spojení A1–A2 jako důsledek PCR amplifikace prasečí domény A2. Tato jedna báze byla vystřižena při použití mutagenního oligonukleotidu 5'-CCTTTATCCAAATACGT-AGCGTTTGCCAAGAAG-3' (sekvence id. č. 10). Výsledná hybridní nukleotidová sekvence kódovala aktivní faktor VIII mající lidskou doménu A1, prasečí doménu A2 a lidské domény A3, C1 a C2.

Oblast obsahující 63 % NH₂-koncové prasečí domény A2, která obsahuje předpokládaný epitop A2, nahradila homologní lidskou sekvenci v cDNA bez domény B tak, že se vyměnily fragmenty *Spe*I/*Bam*HI mezi plazmidy pBlueScript, které obsahovaly cDNA lidského faktoru VIII a cDNA lidského/prasečí A2 faktoru VIII. Sekvence byla ověřena sekvencováním domény A2 a míst sestřihu. Nakonec byl fragment *Spe*I/*Apa*I obsahující celou sekvenci A2 dosazen na odpovídající místo v sekvenci HB⁻ za vzniku konstruktů HP2.

Přechodná exprese HB⁻ a HP2 v buňkách COS-7 byla testována po transfekci DNA zprostředkované DEAE-dextranem, jak je popsáno autorem Seldon, R.F. (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel, F.M., et al., editor, 9.21–9.36, Wiley Interscience, N.Y.). Poté, co byla ověřena exprese aktivního faktoru VIII a byly provedeny předběžné inhibiční studie s protilátkou, byla HB⁻ a HP2 DNA trvale transfekována do fetálních buněk ledvin křečka při použití transfekce zprostředkované lipozomy (Lipofectin® Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD). Klony obsahující plazmidy byly selektovány na rezistenci na G418 v médiu F12 podle Eagla modifikovaného Dulbeccem, s 10% fetálním telecím sérem (DMEM-F12/10% fetální telecí sérum), obsahujícím 400 µg/ml G418, po čemž následovalo pěstování v DMEM-F12/10% fetálním telecím séru obsahujícím 100 µg/ml G418. Kolonie vykazující maximální expresi aktivity HB⁻ a HP2 faktoru VIII byly selektovány pomocí kruhového klonování a množeny pro další charakterizaci.

Expres HB⁻ faktoru VIII a HP2 faktoru VIII byla srovnávána prostřednictvím testu faktoru VIII bez plazmy, jedno stupňovým koagulačním testem a testem ELISA při použití purifikovaného rekombinantního lidského faktoru VIII jako standardu. Pro HB⁻ a HP2 byly dosaženy specifické koagulační aktivity 2600 a 2580 jednotek/mg, v daném pořadí. HB⁻ a HP2 produkovaly 1,2 a 1,4 jednotek/ml/48 hodin/10⁷ buněk. To je totožné s konstruktem divokého typu (2600 ± 200 jednotek/mg). V testu faktoru VIII bez plazmy byly specifické aktivity HB⁻ a HP2 nerozeznatelné.

Biologická aktivita rekombinantního hybridního lidského/zvířecího a odpovídajícího faktoru VIII se substitucemi domén A1, A2, A3, C1 a/nebo C2 může být vyhodnocena nejprve při použití přechodného expresního systému se savčími buňkami COS. Hybridní lidská/zvířecí a odpovídající cDNA může být transfekována do buněk COS a supernatanty mohou být analyzovány na aktivitu faktoru VIII při použití jednostupňového a dvoustupňového koagulačního testu, jak je popsáno výše. Navíc aktivita faktoru VIII může být měřena při použití testu s chromogenním substrátem, což je citlivější a umožňuje analýzu velkého množství vzorků. Podobné testy jsou standardní v testování aktivity faktoru VIII (Wood et al., Nature, 312, 330–337, 1984, Toole et al., Nature, 312, 342–347, 1984). Expres rekombinantního faktoru VIII v buňkách COS je také standardní postup (Toole et al., Nature, 312, 342–347, 1984, Pittman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2429–2433, 1988).

cDNA lidského faktoru VIII použita jako výchozí materiál pro rekombinantní molekuly zde popsané byla exprimována v buňkách COS za vzniku produktu s biologickou aktivitou. Tento materiál, jak je popsáno výše, může být použit jako standard ke srovnávání hybridních lidských/zvířecích molekul faktoru VIII. Aktivita v testech je přeměněna na specifickou aktivitu pro řádné srovnávání hybridních molekul. Za tímto účelem je nezbytné měření množství faktoru VIII tvořeného buňkami a může se provádět pomocí imunotestu s purifikovaným lidským a/nebo zvířecím faktorem VIII jako standardy. Imunotesty pro faktor VIII jsou pro odborníka rutinním postupem (viz např. Lollar et al., Blood, 71, 137–143, 1988).

Příklad 8

Určování inhibiční aktivity u hybridního lidského/zvířecího a ekvivalentního faktoru VIII

Sekvence lidského a zvířecího faktoru VIII přicházející v úvahu jako epitopy (tj. jako rozpoznávací místa pro inhibiční protilátky, které reagují s faktorem VIII) mohou být určovány s použitím rutinních postupů, například použitím testu s protilátkami k faktoru VIII spojeným s technikami místně cílené mutagenese, jako je metoda SOE, jak je ukázáno níže. Mohou být identifikovány sekvence zvířecího faktoru VIII, které nejsou antigenní ve srovnání s odpovídajícími antigenními lidskými sekvencemi, a mohou být tvořeny substituce pro vnesení zvířecích sekvencí a odstranění lidských sekvencí podle standardních metod rekombinantní DNA. Sekvence aminokyselin, jako jsou alaninové zbytky, které nemají žádnou známou identickou sekvenci s faktorem VIII, mohou být také substituovány standardními metodami rekombinantní DNA nebo alaninovou skenovací mutagenézí. Prasečí faktor VIII reaguje s některými inhibičními protilátkami slaběji než lidský faktor VIII, což poskytuje základnu pro současnou léčbu pacientů inhibitory. Poté, co jsou vytvořeny rekombinantní hybridy, mohou být testovány *in vitro* na reaktivitu rutinními testy, včetně inhibitorového testu Bethesda. Tyto konstrukty, které jsou méně reaktivní než nativní lidský faktor VIII a nativní zvířecí faktor VIII jsou kandidáty pro substituční léčbu.

Má se za to, že epitopy, proti kterým je namířena většina (ne-li všechny) inhibičních protilátek reaktivních s lidským faktorem VIII, jsou umístěny ve dvou oblastech v molekule lidského faktoru VIII o 2332 aminokyselinách, doméně A2 (aminokyselinové zbytky 373–740) a doméně C2 (aminokyselinové zbytky 2173–2332, obě sekvence uvedené v sekvenci id. č. 2). Epitop A2 byl eliminován tvořením rekombinantního hybridního lidského/prasečího faktoru VIII, ve kterém je část lidské domény A2 nahrazena prasečí sekvencí, která má sekvenci shodnou s nahrazenou lidskou aminokyselinovou sekvencí. To bylo provedeno, jak je popsáno v příkladu 7, klonováním prasečí domény A2 standardními technikami molekulární biologie, a pak štěpením a sestřihem v doméně A2 s použitím restričních míst. Ve výsledném konstruktu označeném HP2, byly zbytky 373–604 (sekvence id. č. 4) prasečího faktoru VIII substituovány do lidské domény A2. HP2 byl testován na imunoreaktivitu s protilátkami proti lidskému faktoru VIII s použitím následujících metod.

Test ELISA na faktor VIII

Jamky mikrotitrační destičky byly povlečeny 0,15 ml 6 µg/ml ESH4, protilátky proti lehkému řetězci lidského faktoru VIII, a inkubovány přes noc. Poté byla destička třikrát promyta H₂O, jamky byly blokovány 1 hodinu roztokem 0,15M NaCl, 10mM fosfát sodný, 0,05% Tween 20, 0,05% netučné sušené mléko, 0,05% azid sodný, pH 7,4. Aby se zvýšila senzitivita, byly vzorky obsahující faktor VIII 15 minut aktivovány 30nM trombinem. Aby se inhiboval trombin, byl pak přidán rekombinantní desulfatohirudin. Destička byla opět promyta a bylo přidáno 0,1 ml vzorku nebo čistého rekombinantního lidského faktoru VIII (10 až 600 ng/ml) jako standardu. Po 2 hodinách inkubace byla destička promyta a do každé jamky bylo přidáno 0,1 ml biotinylované ESH8, další protilátky proti lehkému řetězci lidského faktoru VIII. ESH8 byla biotinylována s použitím biotinylační soupravy firmy Pierce se sulfosukcinimidyl-6-(biotinamid)hexanoátem. Po 1 hodině

inkubace byla destička promyta a do každé jamky bylo přidáno 0,1 ml streptavidinu s alkalickou fosfatázou. Destička byla vyvolána při použití soupravy firmy Biorad se substrátem reagujícím s alkalickou fosfatázou a výsledná absorbance se určovala ve 405 nm pro každou jamku při použití čtecího zařízení pro mikrotitrační destičky Vmax (Molecular Devices, Inc., Sunnyville, CA). Neznámé koncentrace faktoru VIII se určovaly z lineární části standardní křivky pro faktor VIII.

Testy faktoru VIII

HB⁻ faktor VIII a HP2 faktor VIII byly testovány v jednostupňovém koagulačním testu, který byl proveden jak bylo již dříve popsáno (Bowie, E.J.W, a C.A.Owen, Disorders of Hemostasis, Ratnoff a Forbes, ed., s. 43–72, Grunn & Stratton, Inc., Orlando, FL, 1984) nebo testem bez plazmy, jak je dále popsáno. Vzorky HB⁻ a HP2 faktoru VIII byly aktivovány 40nM trombinem v pufru obsahujícím 0,15mM NaCl, 20mM HEPES, 5mM CaCl₂, 0,01% Tween–80, pH 7,4, v přítomnosti 10nM faktoru IXa, 425nM faktoru X a 50 μM jednovrstevných fosfatidylserin–fosfatidylcholinových (25/75hmot.) vehikulů. Po pěti minutách byla reakce zastavena 0,05 M EDTA a 100mM rekombinantního desulfatohirudinu a výsledný faktor Xa byl měřen testem s chromogenním substrátem způsobem, který popsali Hill–Eubanks et al., J. Biol. Chem. 265: 17854–17858. Za těchto podmínek bylo množství vytvářeného faktoru Xa lineárně úměrné počáteční koncentraci faktoru VIII, jak lze soudit podle purifikovaného rekombinantního faktoru VIII (Baxter Biotech, Deerfield, IL) užitého jako standard.

Před koagulačním testem byly vzorky HB⁻ a HP2 faktoru VIII koncentrovány ze 48 hodin kondiciovaného média užitím chromatografie s heparin–Sepharse na koncentraci 10 až 15 jednotek/ml. HB⁻ nebo HP2 faktor VIII se přidal k plazmě s hemofilií A (George King Biomedical), aby byla finální koncentrace 1 jednotka/ml. Titry inhibitoru v RC nebo MR plazmě nebo v zásobním roztoku byly měřeny Bethesda testem, jak to popsali Kasper, C.K. et al., Thromb. Diath. Haemorrh. 34: 869–872, 1975. Inhibitorový IgG byl připraven podle Leyte, A., et al., J. Biol. Chem. 266: 740–746, 1991.

HP2 faktor VIII nereagoval s protilátkami anti–A2. Tudíž zbytky 373–603 musí obsahovat epitop pro anti–A2 protilátky.

Příprava hybridního lidského/prasečího faktoru VIII a testy pomocí metody sestřihu překrývající se extenzí (SOE)

Byly připraveny další molekuly prokoagulačního rekombinantního hybridního lidského/prasečího faktoru VIII bez domény B, kde je lidský úsek domény A2 nahrazen prasečími aminokyseliny, aby byl dále úžeji definován epitop A2. Kromě metody restričních míst byla užitá metoda sestřihu překrývající se extenzí, SOE, jak ji popsali Ho et al., Gene 77: 51–59, 1989, aby se nahradil jakýkoliv zvolený úsek cDNA prasečího faktoru VIII. Při metodě SOE je sestřihové místo definováno překrývajícími se oligonukleotidy, které lze amplifikovat a vytvořit požadovanou cDNA pomocí PCR. Byly tak připraveny cDNA konstrukty označené postupně HP4 až HP13. Byly vloženy do expresního vektoru ReNeo, stabilně transfekovány do fetálních ledvinových buněk křečka a exprimovány (0,5 až 1 μg, tj. přibližně 3 až 6 jednotek/10⁷ buněk/24 hodin) jak bylo popsáno v příkladu 7. Koagulační aktivita testovaného faktoru VIII byla stanovena za přítomnosti a bez přítomnosti monoklonálních modelových myších inhibičních protilátek specifických proti doméně A2, mAb413. V nepřítomnosti inhibitoru měly všechny testované konstrukty koagulační aktivitu, která byla neodlišitelná od aktivity lidského faktoru VIII bez domény B.

Konstrukty hybridního lidského/prasečího faktoru VIII byly testovány na reaktivitu s anti–A2 inhibitorovou protilátkou mAb413 užitím tzv. Bethesda testu (Kasper, C.K. et al., Thromb. Diath. Haemorrh. 34: 869–872, 1975). Měření Bethesda jednotek (BU) je standardní postup pro měření

titru inhibitoru. Výsledky jsou uvedeny v tabulce V a jsou porovnány s rekombinantním lidským faktorem VIII.

Tabulka V

- 5 Srovnání imunoreaktivity hybridních lidských/prasečích faktorů VIII s aminokyselinovými substitucemi

Konstrukt	Substituce prasečí sekvence	Inhibice mAb413 (BU/mg IgG)
lidský (B-) fVIII	žádná	1470
HP4	373-540	<0,7
HP5	373-508	<0,7
HP6	373-444	1450
HP7	445-508	<0,7
HP8	373-483	1250
HP 9	484-508	<0,7
HP 10	373-403	1170
HP 11	404-508	<0,7
HP 12	489-508	<0,7
HP 13	484-488	<0,7

- 10 Hranice substituované prasečí sekvence jsou definovány první aminokyselinou, která se odlišuje mezi lidským a prasečím faktorem VIII na NH₂-konci a C-konci vloženého úseku. Jak je ukázáno v tabulce V, když Bethesda titr není měřitelný (<0,7 BU/mg IgG), pak A2 epitop leží v úseku nahrazeném prasečí sekvencí. Epitop byl tak postupně zúžen do úseku aminokyselinových zbytků 484-509 (sekvence id. č. 2) obsahujícího pouze 25 aminokyselin, jak ukazuje to, že HP9 je nereaktivní s mAB413. Z konstruktů HP4 až HP 11 byl HP9 nejvíce „humanizovaný“ konstrukt, který nereagoval s inhibitorem. To ukazuje na to, že kritický úsek A2 epitopu leží v sekvenci Arg484-Ile508.

- 20 Na základě srovnání aminokyselinových sekvencí tohoto kritického úseku lidského a prasečího faktoru VIII byly připraveny dva další konstrukty HP12 a HP13, kde lidská sekvence aminokyselin 489-508 a 484-488 byla nahrazena odpovídající prasečí sekvencí. Žádný z nich nereagoval s mAb413. To ukazuje, že aminokyselinové zbytky na každé straně spojení Arg488-Ser489 jsou důležité pro reakci s A2 inhibitory. V HP12 je pouze 5 aminokyselinových zbytků odlišných od lidské sekvence a v HP13 jsou to pouze 4 aminokyselinové zbytky. Hybridy s prasečí substitucí v úsecích 484-508, 484-488 a 489-508 vykazovaly sníženou inhibici A2 inhibitory ve čtyřech vzorcích plazmy, což ukazuje na to, že je jen malá variabilita struktury epitopu A2.

- 25 Reaktivita nejvíce humanizovaných konstruktů HP9, HP12 a HP13 se dvěma anti-A2 IgG preparáty získanými z inhibiční plazmy byla také stanovena. Podobně jako mAb413 ani tyto protilátky nereagovaly s HP9, HP12 ani HP13, ale reagovaly s kontrolními konstrukty HP(-) a HP8.

- 30 Pro konečnou identifikaci kritického epitopu A2 může být úsek mezi aminokyselinami 484-508 dále analyzován stejným postupem.

Postupy popsané v příkladech 7 a 8 lze užít k přípravě dalších hybridních lidských/savčích jiných než prasečích faktorů VIII, kde jsou aminokyselinové substituce v lidské A2 doméně, a dále

hybridních lidských/zvířecích nebo zvířecích/zvířecích faktorů VIII, kde jsou aminokyselinové substituce v kterékoliv doméně, nebo ekvivalentních hybridních faktorů VIII nebo jejich fragmentů, které mají sníženou nebo nulovou imunoreaktivitu s protilátkami proti faktoru VIII.

5

Příklad 9

Eliminace reaktivity lidského faktoru VIII s A2 inhibitory metodou místně cílené mutagenese

Příklad 8 ukázal, že substituce části lidské domény A2 faktoru VIII prasečí sekvencí aminokyselinových zbytků 484–508 poskytne molekulu, která má výrazně sníženou reaktivitu s panelem specifických inhibitorů proti A2 faktoru VIII (viz také Healey et al., J. Biol. Chem. 270: 14505–14509, 1995). V tomto úseku je 9 aminokyselin odlišných v lidském a prasečím faktoru VIII. Těchto 9 odlišných aminokyselin R484, P485, Y487, P488, R489, P492, V495, F501 a I508 (jednopísmenné kódy aminokyselin), bylo ve faktoru VIII bez domény B jednotlivě nahrazeno alaninem metodou místně cílené mutagenese. Kromě toho, pro usnadnění klonování byla restrikční místa MluI a Sac2 vnesena na 5' a 3'-konce sekvence cDNA A2 faktoru VIII, aniž by došlo ke změně aminokyselin odpovídajícím těmto místům. 9 mutant bylo stabilně transfekováno do buněk fetálních ledvin křečka a exprimováno. Všechny devět produkovalo biologicky aktivní faktor VIII. Tyto faktory VIII byly částečně purifikovány a koncentrovány heparin–Sephrose chromatografií podle Healey et al.

Mutanty byly charakterizovány na základě jejich reaktivity s protilátkou mAb413, jak bylo popsáno v příkladu 7. Tato inhibiční protilátka rozpoznává stejný nebo velmi blízko přilehlý epitop v doméně A2 jako všechny dosud zkoumané lidské inhibitory. Reaktivita s inhibitorem byla měřena Bethesda testem. Stručně shrnuto, Bethesda titr inhibitoru je takové ředění inhibitoru, které inhibuje faktor VIII z 50 % ve standardním jednostupňovém koagulačním testu faktoru VIII. Tak např. jestliže je roztok protilátky ředěn 1/420 a inhibuje testovaný vzorek rekombinantního faktoru VIII z 50 %, pak je Bethesda titr 420 U. V případě čisté monoklonální protilátky jako je mAb413 je hmotnost protilátky známa, takže se Bethesda titr vyjadřuje v Bethesda jednotkách (BU) na miligram protilátky mAb413. Aby byl nalezen bod 50% inhibice, provede se ředící řada protilátky mAb413 a hodnota odpovídající 50 % se hledá metodou prokládání příslušné křivky. Výsledky jsou uvedeny v následující tabulce VI.

Tabulka VI

Mutace	Titr mAb413 (BU/mg)	% reaktivity*
Divoký typ, B(-) FVIII	9400	--
R484 → A	160	1,7
P485 → A	4000	42
Y487 → A	50	0,53
P488 → A	3500	37
R489 → A	1,6	0,015
R490 → A	--	(0,2)
P492 → A	630	6,7
V495 → A	10700	113
F501 → A	11900	126
I508 → A	5620	60

* vztaženo k divokému typu

35

Tyto výsledky ukazují, že je možné snížit antigenicitu faktoru VIII vzhledem k modelovému A2 inhibitoru více než 10 x tím, že se provedou alaninové substituce v polohách 484, 487, 489 a 492. Reaktivita mutanty R489 → A je dokonce snížena o čtyři řády. Kterákoliv z těchto alaninových substitucí může být terapeuticky užitečná pro snížení antigenicity a imunogenicity faktoru VIII.

Výsledky potvrdily účinnost alaninové skenovací mutagenese a dále ukázaly, že biologická aktivita faktoru VIII je zachována, i když byla změněna aminokyselinová sekvence epitopu, který reaguje s inhibičními protilátkami. Pět z devíti míst, kde se lidská a prasečí sekvence faktoru VIII liší, jsou také místy, kde se liší lidská a myší sekvence. Molekuly faktoru VIII s alaninovými substitucemi v těchto místech jsou proto příklady hybridního ekvivalentního faktoru VIII, který obsahuje sekvence, které nemají sekvenční identitu s žádným dosud známých savčím faktorem VIII.

Další modifikace, např. kombinace dvou alaninových substitucí, mohou také poskytnout silně sníženou antigenicitu pro celou řadu pacientů, neboť varianty polyklonální protilátky se liší pacient od pacienta a mohou reagovat s variantami epitopu A2 faktoru VIII. Kromě toho imunogenicita (schopnost indukovat tvorbu protilátek) je dále snížena inkorporací více než jedné aminokyselinové substituce. K takovým substitucím patří jak alanin tak aminokyseliny specifické pro prasečí sekvenci nebo i jiné aminokyseliny, která mají nízký imunogenní potenciál. Substituce v polohách 490, 495 a 501 jsou užitečné ke snížení imunogenicity. Navíc tyto substituce pravděpodobně sníží reaktivitu s protilátkami u některých pacientů.

Jiné účinné, antigenicitu snižující substituce, kromě alaninu, lze provádět, pokud se věnuje péče tomu, aby se vyhnulo užití těch, které jsou hlavními přispěvateli k vazebné energii antigen–protilátka nebo mají velké a nebo nabitě postranní řetězce. Aminokyseliny, jejichž substituce vede ke snížení antigenní reaktivity jsou zde proto nazývány aminokyseliny „snižující imunoreaktivitu“. Kromě alaninu k dalším aminokyselinám snižujícím imunoreaktivitu patří methionin, leucin, serin a glycin, aniž by však výčet byl omezující. Je třeba mít na mysli, že míra snížení imunoreaktivity dosažená danou aminokyselinou také závisí na účinku dané substituce na konformaci proteinu, přístupnost epitopu a podobně.

Příklad 10

Klenowův fragment, fosforylované linkery ClaI, NotI linkery, T4 ligáza a Taq DNA polymeráza byly koupeny od Promega (Madison, Wisconsin). Polynukleotidylkináza byla získána od Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, Maryland). $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (Redivue, >5000 Ci/mmol) byl koupen od Amersham. pBluescript II KS– a buňky *E. coli* Epicurean XL1–Blue byly získány od Stratagene (La Jolla, California). Syntetické oligonukleotidy pocházely od Life Technologies, Inc. nebo Curachem, Inc. Když byly PCR produkty připravovány pro klonovací účely, byly užity 5′-fosforylované oligonukleotidové primery. Číslování nukleotidů (nt) oligonukleotidů užitých jako primery pro amplifikaci polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) prasečí cDNA fVIII nebo genomové DNA je vztaženo k cDNA lidského fVIII (Wood et al., 1984, viz výše).

Celková RNA ze sleziny prasete byla izolována metodou užívající guanidinium–thiokyanát–fenol–chloroformové extrakce (Chromczynski et al., Anal. Biochem. 162: 156–159, 1987). Prasečí cDNA byla připravena z celkové RNA užitím reverzní transkriptázy (RT) z viru Moloneyho myší leukémie a náhodných hexamerů jakožto primerů reakce (souprava First Strand cDNA Synthesis Kit, Pharmacia Biotech), pokud není uvedeno jinak. RT reakce obsahovala 45mM Tris–Cl, pH 8,3, 68mM KCl, 15mM DTT, 9mM MgCl₂, 0,08 mg/ml hovězího sérového albuminu (BSA) a 1,8mM deoxynukleotidtrifosfátů (dNTP). Prasečí genomová DNA byla izolována ze sleziny standardním postupem (Strauss, W.M. v Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Willey & Sons, Inc., 1995, str. 2.2.1 – 2.2.3). Izolace DNA z agaró-

zového gelu byla provedena pomocí soupravy GeneClean II (Bio 101) nebo Quiex II Gel Extraction Kit (Qiagen).

5 PCR reakce byla provedena pomocí termocyklovacího zařízení Hybaid OmniGene. Pro PCR reakci užívající Taq DNA polymerázu reakční směs obsahovala 0,6mM MgCl₂, 0,2mM směs dNTP, 0,5mM oligonukleotidové primery, 50 U/ml polymerázy a 0,1 objemu reakční směsi ze syntézy prvního řetězce cDNA. Pokud není uvedeno specificky jinak, PCR produkty byly purifikovány z agarózového gelu, zatupeny užitím Klenowova fragmentu, precipitovány etanolem, a pak buďto ligovány do míst EcoRV v defosforylovaném pBluescript II SK- nebo ligovány
10 s fosforylovanými linkery ClaI pomocí T4 ligázy, naštěpeny ClaI, purifikovány chromatografií na Sephacryl 400 a pak ligovány do pBluescript II KS- naštěpeného ClaI a defosforylovaného. Ligace byly provedeny pomocí T4 DNA ligázy (Souprava rapid DNA Ligation Kit, Boehringer Mannheim), pokud není uvedeno jinak. Inzerty obsahující plazmidy pBluescript KS- byly užity k transformaci buněk *E. coli* Epicurean XL1-Blue.

15 Sekvencování plazmidu bylo provedeno užitím automatického sekvenátoru Applied Biosystems 373a a terminační soupravy s fluorescenčními barvivy PRISM nebo ručním sekvencováním užitím soupravy Sequenase v. 2 (Amersham Corp.). Přímé sekvencování produktů PCR včetně koncového značení ³²P oligonukleotidů bylo provedeno pomocí cyklického sekvencovacího protokolu
20 (dsDNA Cycle Sequencing System, Life Technologies).

Izolace klonů prasečí cDNA fVIII obsahujících netranslatované sekvence 5'-konce, signálního peptidu a kodony domény A1

25 Úsek prasečí fVIII cDNA od 5'-konce k doméně A2 byl amplifikován „hnízdovou“ PCR užitím celkové RNA ze sleziny se samice prasete metodou rychlé amplifikace cDNA konců (5'-RACE) užitím soupravy Marathon cDNA Amplification (Clontech, verze PR55453). To zahrnuje syntézu prvního řetězce pomocí „lock-docking“ oligo(dT) primeru (viz Borson et al., PCR Methods Appl. 2: 144-148, 1992), syntézu druhého řetězce cDNA užitím polymerázy I z *E. coli* a ligaci
30 s 5' prodlouženým dvojřetězcovým adaptorem (sekvence id. č. 13):

5' -CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCGGGCAGGT-3'
3' - NH₂-CCCGTCCA-PO₄-5',

jehož krátký řetězec byl blokován na 3'-konci aminoskupinou, aby se snížilo nespecifické PCR a byl komplementární k 8 nukleotidům 3'-konce (Siebert P.D. et al., Nucleic Acids Res. 23: 1087-1088, 1995). První běh PCR byl proveden s adaptorově-specifickým oligonukleotidem (sekvence
35 id. č.14):

5' -CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3' (označeným AP1)

jakožto „sense“ primerem a oligonukleotidem specifickým pro A3 doménu prasečího fVIII (sekvence id. č. 15):

5' -CCATTGACATGAAGACCGTTTCTC-3' (nt2081-2104)

40 jakožto „antisepe“ primerem. Druhý běh PCR byl proveden pomocí hnízdových adaptorově specifických oligonukleotidů, a sice AP2 (sekvence id. č. 16):

5' - ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'

jakožto „sense“ primeru a hnízdového oligonukleotidu specifického pro prasečí doménu A2 (nt 1497-1520) jakožto „antisepe“ primer (sekvence id. č. 17):

45 5' -GGGTGCAAAGCGCTGACATCAGTG-3'.

PCR se prováděly pomocí komerčně dostupné soupravy (Advantage cDNA PCR COre Kit), která užívá protilátkou zprostředkovaný protokol pro horký start (Kellog, D.E. et al., BioTechniques 16: 1134–1137, 1994). PCR podmínky obsahovaly denaturaci 60 s 94 °C, nasednutí primerů 30 s při 60 °C a prodlužování 4 minuty při 68 °C s kontrolou teploty ve zkumavce. Tento postup vedl k vytvoření hlavního produktu tvořícího pás velikosti 1,6 kb, což je v souladu s amplifikací fragmentu zasahujícího přibližně 150 bp do netranslatovaného úseku 5'–konce. Produkt PCR byl klonován do pBluescript pomocí linkerů ClaI. Inzerty ze čtyř klonů byly sekvencovány v obou směrech.

Sekvence těchto klonů obsahovaly úsek zahrnující 137 bp netranslatovaného úseku 5'–konce, signální peptid, doménu A1 a část domény A2. Shoda byla dosažena přinejmenším vždy ve 3 ze 4 míst. Avšak klony obsahovaly 4 mutace zjevně vnesené prostřednictvím PCR, pravděpodobně díky četným běhům PCR potřebným k vytvoření klonovatelného produktu. Proto byla užitá sekvence z úseku signálního peptidu k navržení sekvence fosforylovaného „sense“ primeru (sekvence id. č. 18):

5' – CCTCTCGAGCCACCATGTCGAGCCACCATGCAGCTAGAGCTCTCCACCTG – 3'

označeného RENEPIGSP pro syntézu jiného produktu PCR k potvrzení sekvence a pro klonování do expresního vektoru. Sekvence uvedená tučně představuje počáteční kodon. Sekvence směrem 5' od něho je sekvence identická s místem inserce do savčího expresního vektoru ReNeo použitého pro expresi fVIII (Lubin et al, 1994 viz výše). Místo obsahuje štěpné místo XhoI (podtržené). RENEPIGSP a oligonukleotid nt 1497–1420 byly užity pro PCR reakci s Taq polymerázou na templátu s cDNA ze sleziny samice prasete. Polymeráze od několika dalších výrobců selhala a neposkytla detekovatelný produkt. PCR podmínky obsahovaly denaturaci 4 min při 94 °C, nasednutí primerů 2 min při 55 °C a prodlužování 2 minuty při 72 °C s konečným prodlužovacím krokem 5 minut při 72 °C. PCR produkt byl klonován do pBluescript užitím linkerů ClaI. Inzerty ze dvou takových klonů byly sekvencovány a v obou směrech a shodovaly se s kanonickou sekvencí.

Izolace prasečích klonů fVIII cDNA obsahujících A3, C1 a 5'–polovinu domény C2

Nejdříve byly klonovány dva RT–PCR produkty z prasečí sleziny odpovídající fragmentu domén B–A3 (nt 4519–5571) a C1–C2 (nt 6405 – 6990). 3'–konec domény C2 byl získán prodloužením úseku exonu 26, což je koncový exon fVIII. Produkt B–A3 byl připraven užitím primeru specifického pro prasečí doménu B (sekvence id. č. 19):

5' – CGGGCGGCCGCGCATCTGGCAAAGCTGAGTT – 3' ,

kde podtržená část odpovídá úseku prasečího fVIII, který se shoduje s úsekem nt 4519–4530 lidského fVIII. 5'–konec oligonukleotidu obsahuje místo NotI, které bylo zamýšleno pro účely klonování. „Antisepse“ primer použitý k vytvoření produktu B–A3 (sekvence id. č. 20):

5' – GAAATAAGCCCAGGCTTTGCAGTCRAA – 3'

byl založen na reverzním komplementu sekvence cDNA lidského fVIII nt 5545–5571. Reakce PCR obsahovala 50mM KCl, 10mM Tris–Cl, pH9,0, 0,1% Triton X–100, 1,5mM MgCl₂, 2,5mM směs dNTP, 20 µM oligonukleotidové primery, 25U/ml Taq polymerázy a 1/20 objemu směsi RT reakce. PCR podmínky obsahovaly denaturaci 3 min při 94 °C po které následovaly cykly obsahující denaturaci 1 min při 94 °C, nasednutí primerů 2 min při 50 °C a prodlužování 2 minuty při 72 °C. Produkty PCR byly fosforylovány užitím T4DNA kinázy a byly přidány linkery NotI. Po naštěpení NotI byly PCR fragmenty klonovány do místa NotI plazmidu pBluescript II KS– a transformovány do buněk *E. coli* XL1–Blue.

Produkt C1–C2 byl připraven využitím známé sekvence lidské cDNA pro syntézu oligonukleotidových primerů nt 6405–6426 (sekvence id. č. 21):

5' – AGGAAATTCCTGGAACCTTN – 3' a

reverzního komplementu k nt 6966–6990 (sekvence id. č. 22):

5'–CTGGGGGTGAATTCGAAGGTAGCGN–3'.

Podmínky pro PCR byly shodné s podmínkami pro přípravu produktu B–A2. Výsledný fragment byl vložen do klonovacího vektoru pNOT užitím soupravy Prime PCR Cloner Cloning System (5–Prime3, Inc., Boulder, Colorado) a klonován v buňkách JM109.

Plazmidy B–A3 a C1–C2 byly částečně sekvencovány, aby bylo možné připravit „sense“ a „antisense“ oligonukleotidy specifické pro prasečí sekvence, nt 4551–4573 (sekvence id. č. 23):

5'– GAGTTCATCGGGAAGACCTGTTG –3'

10 a nt 6541–6564 (sekvence id. č. 24):

5'– ACAGCCCATCAACTCCATGCGAAG –3'.

Tyto oligonukleotidy byly užity jako primery pro přípravu RT–PCR produktu velikosti 2013 bp pomocí soupravy Advantage cDNA PCR (Clontech). Tento produkt odpovídající nt 4551–6564 v lidské sekvenci, obsahuje úsek zodpovědný za aktivační peptid lehkého řetězce (nt 5002–5124), doménu A3 (nt 5125–6114) a většinu domény C1 (nt 6115–6573). Sekvence C1–C2 klonu potvrdila, že sekvence lidské a prasečí cDNA od nt 6565 do 3'–konce C1 domény jsou identické. Produkt PCR byl klonován do místa EcoRV plazmidu pBluescript KS–. Čtyři klony byly plně sekvencovány v obou směrech. Shody bylo dosaženo přinejmenším vždy ve 3 místech ze 4.

20 Izolace klonů cDNA prasečího fVIII obsahujících 3'–polovinu C2 domény

Doména C2 lidského fVIII (nukleotidy 6574–7053) je obsažena v exonech 24 až 26 (Gitscher J. et al., Nature 312: 326–330, 1984). Lidský exon 26 obsahuje 1958 nukleotidů a odpovídá poloze nt 6901–8858. Zahrnuje také úsek 1478 bp netranslatované sekvence 3'–konce (3'UTR). Pokusy klonovat cDNA exonu 26 odpovídající 3'–konci domény C2 a 3'UTR, ať už metodou 3'RACE (Siebert et al., 1995, viz výše), inverzní PCR (Ochman, H. et al., Biotechnology (N.Y.)8: 759–760, 1990), PCR s restričními místy (Sarkar G. et al., PCR Meth. Appl. 2: 318–322, 1993), PCR s „nepredikovatelným nasednutím primerů“ (Dominguez, O. et al., Nud. Acids Res. 22: 3247–3248, 1994) nebo screeningem cDNA prasečích jater, byly neúspěšné. Metoda 3'RACE byla znovu vyzkoušena s cDNA knihovnou ligoanou stejnými dvouřetězcovými adaptory, která byla užita k úspěšnému klonování 5'–konce cDNA prasečího fVIII. Tudiž selhání této metody nebylo způsobeno nepřítomností cDNA odpovídající exonu 26.

35 Ke klonování 3'–poloviny domény C2 byla užita metoda cíleného procházení genu pomocí PCR (Parker J.D. et al., Nud. Acids Res.19: 3055–3060, 1991). „Sense“ primer specifický pro prasečí sekvenci nt 6904–6924 (sekvence id. č. 25):

5'– TCAGGGCAATCAGGACTCC –3'

40 byl syntetizován na základě počáteční sekvence domény C2 a byl použit v PCR společně s nespecifickým „krácejícím“ primerem vybraným z oligonukleotidu dostupných v laboratoři. PCR produkty pak byly zaměřeny analýzou extenze primeru (Parker et al., BioTechniques 10: 94–101, 1991) užitím vnitřního primeru značeného ³²P specifického pro prasečí sekvenci nt 6932–6952 (sekvence id. č. 26):

5'– CCGTGGTGAACGCTCTGGACC –3'

45 Bylo zajímavé, že ze 40 testovaných nespecifických primerů pouze dva poskytly pozitivní produkt analýzou extenze primeru a odpovídaly přesné a degenerované lidské sekvenci 3'–konce domény C2, a sice primer sekvence id. č. 27 (nt 7030–7053):

5'– GTAGAGGTCCTGTGCCTCGCAGCC–3'

a primer sekvence id. č. 28 (nt 7027–7053):

5' – GTAGAGSTSCTGKGCCCTCRCAKCCYAG –3'.

Tyto primery byly původně navrženy pro získání produktu pomocí konvenční RT–PCR, ale selhaly a neposkytly dostatečné množství produktu, které by mohlo být vizualizováno barvením etidiumbromidem. Avšak produkt byl identifikován citlivější metodou extenze primeru. Produkt pak byl purifikován na agarózovém gelu a přímo sekvencován. To prodloužilou sekvenci prasečího fVIII k nukleotidu 7026.

Další sekvence byla získána analýzou extenze primeru produktu získaného „hnízdovou“ PCR na dvouřetězcové adaptory ligované cDNA knihovně užitím 5' RACE protokolu popsáno již dříve. První běh reakce užíval přesný primer prasečí sekvence id. č. 29 (nt 6541–6564):

5' – CTTCGCATGGAGTTGATGGGCTGT –3'

a primer AP1. Druhý běh reakce užíval primer sekvence id. č. 30 (nt 6913–6934):

5' – AATCAGGACTCCTCCCACCCCG –3'

a primer AP2. Přímé PCR sekvencování prodloužilo sekvenci směrem 3' ke konci domény C2 (nt 7053). Sekvence C2 domény byla jednoznačná až na nt 7045 blízko 3'–konce C2 domény. Analýza opakovaných PCR reakcí ukázala buďto A, G, nebo dvojité A/G v tomto místě.

Sekvencování bylo prodlouženo do 5'UTR užitím dalších dvou primerů, a sice sekvence id. č. 31 (NT 6977–6996):

5' – GGATCCACCCACGAGCTGG –3'

a sekvence id. č. 32 (nt 7008–7031):

5' – CGCCCTGAGGCTCGAGGTTCTAGG –3'

Úsek přibližně 15 bp ze 3'UTR sekvence, byl získán, ačkoliv sekvence byla na několika místech nejasná. Pak bylo syntetizováno několik „antisepse“ primerů na základě co nejlepšího určení 3'netranslatované sekvence. Tyto primery obsahovaly reverzní komplement stop kodonu TGA na svém 3'–konci. PCR produkty byly získány jak s genomové DNA, tak i cDNA prasečí sleziny pomocí specifických primerů sekvence id. č. 33 (nt 6913–6934):

5' – AATCAGGACTCCTCCACCCCG –3'

a 3'UTR „antisepse“ primeru sekvence id. č. 34:

5' – CCTTGCAGGAATTTCATTCA –3'

a byly vizualizovány barvením etidiumbromidem na agarózovém gelu. Pro získání dostatečného množství materiálu pro klonování byl proveden druhý běh PCR s „hnízdovými“ primery sekvence id. č. 35 (nt 6932):

35 5' – CCGTGGTGAACGCTCTGGACC –3'

a shodným „antisepse“ primerem. Výsledný produkt PCR velikosti 141 bp byl klonován do pBluescript II KS–naštěpeného EcoRV. Sekvence třech, klonů získaných z genomové DNA a třech klonů pocházejících z cDNA byla získána sekvencováním v obou směrech. Sekvence byla zcela jednoznačná až na nt 7045, kde genomová DNA ukázala vždy A a cDNA vždy G.

40 Srovnání sekvencí lidského, prasečího a myšího faktoru VIII (obrázky 1A až 1H).

45 Srovnání přiřazením sekvencí úseků signálního peptidu, A1, A2, A3, C1 a C2 bylo provedeno pomocí počítačového programu CLUSTALW (Thompson, J.D. et al., Nud. Acids Res. 22: 4673–4680, 1994). Negativní bodové ohodnocení pro otevřenou mezeru a rozšířenou mezeru bylo 10 a 0,5. Srovnání domény B člověka, prasete a myši bylo již publikováno dříve (Elder et

al., 1993, viz výše). Lidská sekvence A2 odpovídá úseku aminokyselin 373–740 v sekvenci id. č. 2. Aminokyselinová sekvence prasečí domény A2 je uvedena v sekvenci id. č. 4 a aminokyselinová sekvence myši domény A2 je uvedena v sekvenci id. č. 6 (aminokyseliny 392–759).

5

Příklad 11

Expres aktivního rekombinantního prasečího faktoru VIII bez domény B (PB⁻)

Použité materiály

10 Plazma ošetřená citrátem z pacientů s hemofilií A a kontrolních zdravých jedinců byla získána od firmy George King Biomedical Inc. Fetální sérový albumin, geneticin, penicilin, streptomycin, médium DMEM/F12 a AIM-V byly koupeny od Life Technologies, Inc. Taq DNA polymeráza byla od Promega, Vent polymeráza byla koupena od New England Biolabs, Pfu DNA polymeráza a fagemid pBluescript KS- byly od Stratagene. Syntetické oligonukleotidy byly koupeny
15 od Life Technologies a Curachem, Inc. Restrikční enzymy pocházely New England Biolabs nebo Promega. 5'-fosforylované primery byly užity, když PCR produkty byly připravovány pro klonovací účely. Číslování nukleotidů (nt) oligonukleotidů použitých jako primery pro amplifikaci polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) prasečí genomové DNA nebo cDNA užívá pro srovnání cDNA lidského faktoru VIII (Wood et al., Nature 312: 330–337, 1984). Expresní vektor fVIII
20 označený HB⁻/ReNeo byl získán od Biogen, Inc. HB⁻/ReNeo obsahoval geny rezistence k ampicilinu a geneticinu a cDNA lidského fVIII postrádající doménu B, která je vymezena úsekem Ser741–Arg1648, což je fragment vzniklý štěpením trombinem. Pro zjednodušení mutagenese cDNA C2 domény fVIII, která je na 3'-konci fVIII inzertu v plazmidu ReNeo, bylo vneseno místo NotI směrem 3' o dvě báze ke stop kodonu HB⁻/ReNeo mutagenézí metodou SOE
25 („splicing by overlap extension“, Horton, R.M. et al., Methods Enzymol. 217: 270–279, 1993). Výsledný konstrukt byl označen HB–ReNeo/NotI.

Celková RNA byla izolována guanidinium–thiokyanát–fenol–chloroformovou extrakcí (Chromczynski et al., Anal. Biochem. 162: 156–159, 1987). cDNA byla připravena z celkové
30 RNA užitím reverzní transkriptázy (RT) z viru Moloneyho myši leukémie a náhodných hexamerů jakožto primerů reakce (souprava First Strand cDNA Synthesis Kit, Pharmacia Biotech). Plazmidová DNA byla purifikována pomocí soupravy Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen). PCR reakce byla provedena pomocí termocyklovacího zařízení Hybaid OmniGene s užitím Taq DNA polymerázy, Vent DNA polymerázy nebo Pfu DNA polymerázy. PCR produkty byly purifikovány
35 z agarózového gelu, zatupeny užitím Klenowova fragmentu, precipitován etanolem, a pak ligovány do plazmidové DNA užitím T4 ligázy (Souprava Rapid DNA Ligation Kit, Boehringer Mannheim). Plazmidy obsahující inzerty byly užity k transformaci buněk *E. coli* Epicurean XL1–Blue. Všechny nové sekvence fVIII DNA vytvořené užitím PCR byly ověřeny sekvencováním dideoxynukleotidovou metodou pomocí automatického sekvenátoru Applied Biosystems 373a a terminační soupravy s barvivu PRISM.

Konstrukce expresního vektoru hybridního faktoru VIII HP20, který obsahuje prasečí doménu C2

cDNA prasečího fVIII odpovídající 3'-konci domény C1 a celé doméně C2 byla klonována
45 pBluescript pomocí RT–PCR z celkové RNA užitím RT–PCR na celková RNA a primerů založených na známé sekvenci cDNA prasečího fVIII (Healy, J.F. et al., Blood 88: 4209–4214, 1996). Tento konstrukt a HB⁻/ReNeo byly užity jako templáty ke konstrukci fúzního produktu „lidská C1 – prasečí C2“ v plazmidu pBluescript mutagenézí metodou SOE. Fragment C1–C2 z tohoto plazmidu byl odstraněn restrikčními enzymy ApaI a NotI a ligován do HB⁻/ReNeo/NotI
50 naštěpeného ApaI/NotI, čímž byl vytvořen HP20/ReNeo/NotI.

Konstrukce hybridního lidského/prasečího faktoru VIII bez domény B obsahujícího prasečí lehký řetězec (HP18)

Lehký řetězec lidského faktoru VIII obsahuje aminokyselinové zbytky Asp1649–tyr2332. Tento úsek v mutantě bez domény B (HB⁻) byl nahrazen odpovídajícími zbytky prasečí cDNA fVIII, čímž byla vytvořena molekula hybridního lidského/prasečího faktoru VIII nazvaná HP18. To bylo provedeno nahrazením odpovídajícího úseku v HP20 nahrazením PCR produktem, který odpovídal úseku A2, doméně A3, doméně C1 a části domény C2 prasete. Pro usnadnění konstrukce bylo synonymní místo AvrII vneseno do nt 2273 na spoji domén A2 a A3 v HP20 metodou SOE mutagenese.

Konstrukce hybridního lidského/prasečího faktoru VIII bez domény B obsahujícího prasečí signální peptid a domény A1 a A2 (HP22)

Signální peptid a domény A1 a A2 lidského faktoru VIII zaujímají úsek aminokyselin Met(-19)–Arg740. Tento úsek v mutantě bez domény B (HB⁻) byl nahrazen odpovídajícími úseky prasečí cDNA fVIII, čímž byla vytvořena molekula nazvaná HP22. Navíc synonymní místo AvrII bylo vneseno do nt 2273 na spoji domén A2 a A3 v HP20 metodou SOE mutagenese. HP22 byl konstruován fúzí prasečího fragmentu signální peptid–A1–část A2 v pBluescript (Helay et al., 1996, viz výše) s hybridním lidským/prasečím faktorem VIII bez domény B obsahujícím prasečí doménu A2 nazvaným HP1 (Lubin et al., 1994, viz výše).

Konstrukce prasečího faktoru VIII bez domény B (PB⁻)

Fragment SpeI/NotI z HP18/BS (+AvrII) byl štěpen AvrII/NotI a ligován do HP22/BS (+AvrII) štěpeného AvrII/NotI, který obsahoval prasečí fVIII postrádající celou doménu B. PB⁻ byl klonován do ReNeo ligací fragmentu XbaI/NotI z PB⁻/BS(+AvrII) do HP22/ReNeo/NotI (+AvrII).

Expresce rekombinantních molekul faktoru VIII

PB⁻/ReNeo/NotI (+AvrII.) a HP22/ReNeo/NotI (+AvrII) byly transfekovány do COS buněk a dočasně exprimovány, jak bylo dříve publikováno (Lubin, I.M. et al., J. Biol. Chem. 269: 8639–8641). HB⁻/ReNeo/NotI a žádná DNA (slepá kontrola) byly transfekovány jako kontroly.

Aktivita faktoru VIII mutant PB⁻, HP22 a HB⁻ byla měřena následujícím chromogenním testem. Vzorky fVIII v supernatantu z buněk COS byly aktivovány 40nM trombinem v pufru obsahujícím 0,15mM NaCl, 20mM HEPES, 5mM CaCl₂, 0,01% Tween–80, pH 7,4, v přítomnosti 10nM faktoru IXa, 425nM faktoru X a 50 µM jednovrstevných fosfatidylserin–fosfatidylcholinových (25/75 hmotn.) vehikulů. Po pěti minutách byla reakce zastavena 0,05 M EDTA a 100mM rekombinantního desulfatohirudinu a výsledný faktor Xa byl měřen testem s chromogenním substrátem. V testu s chromogenním substrátem byl přidán 0,4mM Spectrozyme Xa a byla stanovena rychlost uvolňování para–nitoanilidu měřením absorbance při 405 nm.

Výsledky ze supernatantu dvou nezávisle transfekovaných buněčných kultur (změna absorbance ve 405 nm za minutu):

HB⁻: 13,9, PB⁻: 139, HP22: 100 a slepá kontrola: < 0,2.

Tyto výsledky ukazují, že prasečí faktor VIII bez domény B a faktor VIII bez domény B obsahující prasečí podjednotky A1 a A2 jsou aktivní a mají vyšší aktivitu než lidský fVIII bez domény B.

PB⁻ byl částečně purifikován a koncentrován z růstového média chromatografií na heparin–Sepharese. Heparin–Sepharese (10 ml) byla ekvilibrována pufrem obsahujícím 0,075 NaCl, 10mM HEPES, 2,5mM CaCl₂, 0,005% Tween–80, 0,02% azid sodný, pH 7,4. Médium (100 až 200 ml) z exprimujících buněk bylo nanášeno, na kolonu s heparin–Sepharese, která pak byla propláchnuta 30 ml ekvilibračního pufru bez azidu sodného. PB⁻ pak byl eluován pufrem

obsahujícím 0,65 NaCl, 20mM HEPES, 5mM CaCl₂, 0,01% Tween-80, pH 7,4 a pak uschován do -80 °C. Výtěžek koagulační aktivity faktoru VIII byl typicky 50 až 75 %.

Stálá exprese prasečího faktoru VIII bez domény B (PB⁻)

5

Transfekované buněčné linie byly udržovány v médiu DMEM-F12 obsahujícím 10% fetální hovězí sérum, 50 U/ml penicilinu a 50 µg/ml streptomycinu. Fetální hovězí sérum bylo před použitím tepelně inaktivováno 1 hodinu v 50 °C. HB⁻/ReNeo a PB⁻/ReNeo/NotI(+AvrII) byly trvale transfekovány do buněk BHK a selektovány na rezistenci ke geneticinu podle obecně známého protokolu popsaného v Lubin et al, Biol. Chem 269: 8639-8641, 1994, kromě toho, že exprimující buňky byly kultivovány v médiu s 600 µg/ml geneticinu. Buňky z kultivačních lahví Corning T-75 pěstované do konfluence byly přeneseny do trojitých lahví Nunc do média s 600 µg/ml geneticinu a opět kultivovány do konfluence. Médium bylo odstraněno a nahrazeno médiem bez séra AIM-V (Life Technologies, Inc.) a bez geneticinu. Expresse faktoru VIII byla sledována jedno stupňovým testem koagulační aktivity (popsaným výše) a 100 až 150 ml média bylo odebráno jednou denně po 4 až 5 dnů. Maximální hladina exprese v médiu pro HB⁻ a PB⁻ byla 1 až 2 jednotky/ml a 10 až 12 jednotek/ml koagulační aktivity faktoru VIII.

15

Purifikace PB⁻

20

PB⁻ byl precipitován ze supernatantu buněčné kultury užitím 60% nasyceného síranu amonného a pak byl purifikován imunoafinitní chromatografií a vysokotlakovou kapalinovou chromatografií na koloně monoQ, jak bylo již popsáno pro purifikaci prasečího faktoru VIII získaného z plazmy (Lollar et al., Factor VIII/factor VIIIa. Methods in Enzymol. 222: 128-143, 1993). Specifická koagulační aktivita PB⁻ byla měřena jednostupňovým testem koagulační aktivity (viz Lollar et al., 1993) a byla podobná jako u prasečího faktoru VIII získaného z plazmy.

25

Při analýze elektroforézou na SDS-polyakrylamidovém gelu se ukázalo, že preparát PB⁻ obsahuje tři pásy se zjevnou molekulovou hmotností 160 kDa, 82 kDa a 76 kDa. Pásy velikosti 82 kDa a 76 kDa byly již dříve popsány jako heterodimer obsahující domény A1-A2 a ap-A3-C1-C2 (kde ap označuje aktivační peptid) (viz Toole et al., Nature 312: 342-347, 1984). Pás velikosti 160 kDa byl přenesen, na polyvinylidenfluoridovou membránu a podroben NH₂-terminálnímu sekvencování, které poskytlo sekvenci Arg-Ile-Xx-Xx-Tyr (kde Xx představuje neurčenou aminokyselinu), což je NH₂-koncová sekvence jednořetězcového faktoru VIII (Toole et al., 1984). Takže PB⁻ je částečně upravován štěpením mezi doménami A2 a A3, takže je tvořen dvěma formami, jednořetězcovým proteinem A1-A2-ap-A3-C1-C2 a heterodimerem A1-A2/ap-A3-C1-C2. Podobné úpravy rekombinantního HB⁻ byly také popsány (Lind et al., Eur. J. Biochem. 232: 19-27, 1995).

35

Charakterizace prasečího faktoru VIII

40

Byla určena sekvence cDNA prasečího faktoru VIII odpovídající úsek obsahující 137 bp 5'UTR, kódující sekvenci signálního peptidu (57 bp) a domény A1 (1119 bp), A3 (990 bp), C1 (456 bp) a C2 (483bp). A tato sekvence společně s dříve publikovanými sekvencemi B domény a úseků lehkého řetězce aktivačního peptidu (Toole et al., 1986, viz výše) a domény A2 (Lubin et al., 1994, viz výše) doplňuje a zakončuje stanovení sekvence cDNA prasečího faktoru VIII odpovídající translatovanému produktu. Fragment cDNA obsahující úsek 5'UTR, signální peptid a doménu A1 byl klonován pomocí protokolu 5'RACE RT-PCR. Oligonukleotidový primer založený na sekvenci lidské C2 byl úspěšný při vytvoření RT-PCR produktu, který umožnil klonování A3, C1 a 5'poloviny domény C2. cDNA odpovídající 3'polovině domény C-2 a 3'UTR cDNA byla obtížně klonovatelná. Zbytek domény C2 byl nakonec klonován metodou cíleného procházení genu PCR (Parker et al., 1991, viz výše).

45

50

Sekvence uvedená zde jako sekvence id. č. 36 byla zcela jednoznačná až na nt 7045 v blízkosti 3'-konce domény C2, kterým je buďto A, nebo G, jak bylo již uvedeno výše. Odpovídající

55

5 kodony pak jsou GAC (Asp) nebo AAC (Asn). Lidské a myší kodony jsou GAC a CAG (Gln). Zda se jedná o polymorfismus nebo reprodukovatelný artefakt vnesený PCR není známo. cDNA pro rekombinantní hybridní lidský/prasečí faktor VIII bez domény B obsahující substituci prasečí domény C2 jak s kodonem GAC tak AAC byly trvale exprimovány, aniž by byl zjištěn detekovatelný rozdíl v prokoagulační aktivitě. To ukazuje, že mezi těmito dvěma variantami C2 domény není funkční rozdíl.

10 Srovnání predikovaných aminokyselinových sekvencí úplné sekvence prasečího faktoru VIII, sekvence id. č. 37, s publikovanou lidskou sekvencí (Wood et al., viz výše) a myší sekvencí (Elder et al., 1993, viz výše) je uvedeno na obr. 1A až 1H společně s vyznačenými místy potranslačních modifikací, proteolytického štěpení a rozpoznávání jinými makromolekulami. Stupeň identity přiřazených sekvencí je uveden v tabulce VII. Jak již bylo zmíněno dříve, B domény těchto druhů jsou více rozdílné (divergentní) než domény A nebo C. To je v souladu s pozorováním, že B doména nemá i přes svou značnou velikost žádnou známou funkci (Elder et al. 1993, Tool et al. 1986). Výsledky uvedené v předkládaném vynálezu potvrdily doména B v prasečím faktoru VIII není nutná pro jeho aktivitu. Na základě sekvenčních dat zde představených prasečí faktor VIII mající odstraněnou celou nebo část domény B se dá syntetizovat expresí cDNA kódující prasečí faktor VIII, která má deletované kodony pro část nebo celou doménu B. Je také rozsáhlejší divergence v sekvenci odpovídající peptidu „A1 doména APC/štěpné místo faktoru IXa“ (zbytky 337–372) a lehkého řetězce aktivačního peptidu (tabulka VII). Štěpné místo pro trombin v poloze 336 tvořící peptid 337–372 je zjevně ztraceno v myší sekvenci, neboť je zde glutamin místo argininu (Elder et al., 1993, viz výše). Relativně rychlá divergence štěpného peptidu pro trombin (u myšího faktoru VIII naznačený aktivační peptid 337–372) byla zaznamenána již dříve u fibrinopeptidů (Creighton, T.E., *Proteins: Structures and Molecular Properties*, W.H. Freeman, New York, s. 105–138, 1993). Nepřítomnost biologické funkce u těchto peptidů jakmile jsou naštěpeny, byla popsána jako možný důvod rychlé divergence. Arg562 v lidském fVIII byl navržen jako důležitější štěpné místo pro aktivační protein C v průběhu inaktivace fVIII a fVIIIa (Fay P.J. et al., *J. Biol. Chem.* 266: 20139–20145, 1991). Toto místo je zachováno v lidské, prasečí i myší sekvenci faktoru VIII.

30 Na obrázcích 1A až 1H jsou tučně označena potenciální místa N-vázané glykosylace. Je zde 8 konzervativních míst potenciální místa N-vázané glykosylace, a sice jedno v doméně A1, jedno v doméně A2, čtyři v doméně B, jedno v doméně A3 a jedno v doméně C1. 19 cysteinů domén A a C je zachováno, zatímco v cysteinech domény B je značná divergence. Šest z těchto sedmi disulfidických vazeb faktoru VIII bylo zjištěno také na homologních místech faktoru V a ceruloplasminu a obě disulfidické vazby domény C byly nalezeny u faktoru V (McMullen, B.A. et al., *protein Sci.* 4: 740–746, 1995). Lidský faktor VIII obsahuje sulfatované tyrosiny v polohách 346, 718, 719, 723, 1664 a 1680 (Pittmann, D.D. et al., *Biochemistry* 31: 3315–3325, 1992, Michnick, D.A. et al., *J. Biol. Chem.* 269: 20095–20102, 1994). Tyto aminokyselinové zbytky jsou konzervativní v myším a prasečím faktoru VIII (obr. 1), i když program CLUSTALW nepřiradil správně myší tyrosin odpovídající Tyr346 v lidském fVIII.

45 Myší a prasečí plazma může napravit nedostatečnou koagulaci plazmy člověka s hemofilií A, což je v souladu s mírou konzervativnosti sekvencí A a C domén u těchto biologických druhů. Prokoagulační aktivita prasečího faktoru VIII je vyšší než u lidského faktoru VIII (Lollar et al., *J. Biol. Chem.* 267: 23652–23657, 1992). Rekombinantní prasečí faktor VIII (s odstraněnou doménou B) exprimovaný a purifikovaný podle předkládaného vynálezu projevuje také vyšší specifickou koagulační aktivitu ve srovnání s lidským fVIII a je srovnatelná s aktivitou faktoru VIII izolovaného z prasečí plazmy. To může být způsobenou sníženou spontánní disociací A2 podjednotky z aktivního heterotrimeru A1/A2/A3–C1–C2 faktoru VIII. Zda tyto rozdíly v prokoagulační aktivitě odrážejí evoluční změny funkce jako příklad adaptace druhů (Perutz, M.F., *Adv. Protein. Chem.*, 1996) není dosud známo. Nyní, když je úplná sekvence cDNA prasečího faktoru VIII odpovídající translatovanému produktu známá, metoda homologní skenovací mutagenese (Cunningham B.C. et al., *Science* 243: 1330–1336, 1989) může být cestou jak identi-

fikovat strukturní rozdíly mezi lidským a prasečím faktorem VIII, které jsou zodpovědné za vyšší aktivitu prasečího faktoru VIII.

5 Prasečí faktor VIII je typicky méně reaktivní s inhibičními protilátkami, které se tvoří u hemofiliků, kterým byla podána transfúze faktoru VIII nebo které se tvoří jako autoprotilátky v obecné populaci. To je základem pro užívání koncentrátu prasečího faktoru VIII při léčení pacientů s inhibičními protilátkami (Hay a Lozier, 1995, viz výše). Většina inhibičních protilátek je namířena proti epitopům lokalizovaným v doméně A2 nebo C2 (Fulcher C.A. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7728–7732, 1985, Scandella, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6152–6156, 1988, Scandella, D. et al., Blood 74: 1618–1626, 1989). Navíc byl identifikován epitop 10 neznámého významu, který se nalézá v doméně A3 nebo C1 (Scandella et al., 1989 viz výše, Scandella, D., Blood 82: 1767–1775, 1993, Nakai, H. et al., Blood 84: 224a, 1994). Epitop A2 byl mapováním lokalizován do úseku 484–508 homologní skenovací mutagenézi (Healey et al., 1995, viz výše). V tomto segmentu obsahujícím 25 aminokyselinových zbytků je relativně malý 15 podíl identických sekvencí (16/25 neboli 64 %). Je zajímavé, že tento úsek, který se zdá být funkčně důležitý na základě toho, že protilátky proti němu jsou inhibiční, byl zjevně vystaven rychlejšímu genetickému posunu. Srovnání prasečích domén A2 a A3 ukazuje, že epitop A2 nesdílí žádnou detekovatelnou homologii s doménou A3.

20 Inhibitorový epitop C2 lidského fVIII byl lokalizován mezi zbytky 2248 až 2312 delečním mapováním (Scandella, D., Blood 86: 1811–1819, 1995). Lidský a prasečí faktor VIII jsou z 83 % identické v tomto segmentu obsahujícím 65 aminokyselinových zbytků. Avšak homologní skenovací mutagenéze tohoto úseku vedla k charakterizaci C2 epitopu, jehož hlavní antigenní determinanta byla neočekávaně lokalizována do úseku odpovídajícího aminokyselinám 2181–2243 25 lidské sekvence (sekvence id. č. 2 a obr. 1H).

Byly připraveny proteiny hybridního lidského/prasečího faktoru VIII, kde různé části domény C2 byly nahrazeny odpovídající částí prasečího faktoru VIII užitím strategie popsané v předkládaném vynálezu (viz příklad 8). Syntéza různých C2–hybridních faktorů VIII byla provedena tak, 30 že byla zkonstruována hybridní kódující DNA, a sice užitím nukleotidové sekvence kódující prasečí úsek C2 uvedené zde jako sekvence id.č. 37. Každý hybrid byl exprimován v transfekovaných buňkách, takže hybridní faktor VIII mohl být částečně purifikován z růstového média. Aktivita, v nepřítomnosti jakéhokoli inhibitoru, byla měřena jednostupňovým koagulačním testem.

35 Panel pěti lidských inhibitorů byl užit k testování každého hybridního faktoru VIII. Bylo již dříve prokázáno, že plazma obsahující protilátku anti–faktor VIII je namířena proti lidské C2 doméně, neboť rekombinantní C2 doména neutralizuje inhibici. Ve všech testovaných plazmách titr inhibitoru byl neutralizován z více jak 79 % doménou C2 nebo lehkým řetězcem ale méně než 40 z 10 % rekombinantní lidskou doménou A2. Kromě toho C2–hybridní faktory VIII byly testovány proti myši monoklonální protilátce, která se váže na doménu C2, a podobně jako lidské C2 inhibující protilátky, inhibuje vazbu faktoru VIII k fosfolipidům a k von Willebrandovu faktoru.

45 Srovnáním titrů inhibičních protilátek proti C2–hybridním faktorům VIII bylo ukázáno, že hlavní determinanta lidského C2 inhibitorového epitopu leží v úseku definovaném aminokyselinovým zbytky 2181–2243 (sekvence id. č. 2, viz také obr. 1H). Protilátky anti–C2 namířené proti úseku COOH konce ke zbytku 2253 nebyly identifikovány u čtyřech z pěti sér pacientů. Při srovnání hybridy obsahující prasečí sekvenci odpovídající lidské sekvence aminokyselinových zbytků 2181–2199 a 2207–2243 se ukázalo, že oba tyto úseky přispívají k vazbě protilátky. Prasečí 50 aminokyselinová sekvence odpovídající lidské sekvenci zbytků 2181–2243 je očíslována 1982–2044 v sekvenci id. č. 37. Sekvence prasečí DNA kódující prasečí aminokyseliny 1982–2004 představuje nukleotidy 5944–6132 v sekvenci id. č. 35.

55 S odkazem na obr. 1H, je vidět, že v úseku 2181–2243 je rozdíl v 16 aminokyselinách mezi lidskou a prasečí sekvencí. Rozdíly byly nalezeny v aminokyselinách 2181, 2182, 2188,

2195–2197, 2199, 2207, 2216, 2222, 2224–2227, 2234, 2238 a 2243. Lze provést náhradu jedné nebo několika aminokyselin v těchto polohách a tím připravit modifikovaný faktor VIII, který je nereaktivní s inhibičními protilátkami proti lidské C2. Alaninová skenovací mutagenese poskytuje vhodnou metodu pro vytváření alaninových substitucí neutrálních zbytků, jak bylo již dříve popsáno. K nahrazování lze užít i jiné aminokyseliny než alanin, jak se popisuje v předkládaném vynálezu. Náhrada jednotlivých aminokyselin alaninem, a to zejména těch aminokyselin, které nejsou shodné v lidské a prasečí sekvenci nebo lidské a myší sekvenci nebo které s velkou pravděpodobností přispívají k vazbě protilátky, může poskytnout modifikovaný faktor VIII se sníženou reaktivitou s inhibičními protilátkami.

Kromě toho strategie vložení aminokyselin s nižším imunogenním potenciálem do definovaného úseku aminokyselinových zbytků 2181–2243 může poskytnout modifikovaný faktor VIII, který má sníženou imunogenicitu. Faktor VIII se sníženou imunogenicitou je vhodný jako náhradka faktoru VIII při léčení hemofilie u pacientů, která je výhodnější než faktor VIII s přirozenou sekvencí. U pacientů léčených faktorem VIII se sníženou imunogenicitou se s menší pravděpodobností vyvinou inhibiční protilátky a tudíž s menší pravděpodobností budou trpět sníženou účinností léčení po celou dobu života.

Přehled obrázků na výkresech

Obrázky 1A až 1H společně ukazují srovnání přiřazených aminokyselinových sekvencí lidského, prasečího a myšího faktoru VIII. Obr. 1A srovnává úsek signálního peptidu (lidský sekvence id. č. 40, prasečí sekvence id. č. 37, aminokyseliny 1–19, myší sekvence id. č. 6, aminokyseliny 1–19). Aminokyselinové sekvence na obrázcích 1A až 1H jsou číslovány tak, že první alanin zralého proteinu má číslo 1 a aminokyseliny signálního peptidu jsou tedy číslovány zápornými čísly. Sekvence lidského faktoru VIII id. č. 2 také začíná prvním alaninem zralého proteinu jakožto aminokyselinou číslo 1. V aminokyselinové sekvenci myšího faktoru VIII (sekvence id. č. 6) a prasečího faktoru VIII (sekvence id. č. 37) první aminokyselina zralé sekvence (alanin) je aminokyselina očíslovaná 20. Obr. 1A až 1H ukazují přiřazení odpovídajících sekvencí lidského, myšího a prasečího faktoru VIII, takže sekvence s největší identitou aminokyselin jsou přiřazeny k sobě. Číslování aminokyselin na obr. 1A až 1H se vztahuje pouze k lidské sekvenci faktoru VIII. Obr. 1B ukazuje aminokyselinové sekvence lidské domény A1 (sekvence id. č. 2, aminokyseliny 1–372), prasečí (sekvence id. č. 37, aminokyseliny 20–391) a myší domény A1 (sekvence id. č. 6, aminokyseliny 20–391). Obr. 1C ukazuje aminokyselinové sekvence lidské domény A2 faktoru VIII člověka (sekvence id. č. 2, aminokyseliny 373–758), prasete (sekvence id. č. 37, aminokyseliny 392–759) a myši (sekvence id. č. 6, aminokyseliny 392–759). Obr. 1D ukazuje aminokyselinovou sekvenci lidské domény B faktoru VIII člověka (sekvence id. č. 2, aminokyseliny 741–1648), prasete (sekvence id. č. 37, aminokyseliny 760–1449) a myši (sekvence id. č. 6, aminokyseliny 760–1640). Obr. 1E porovnává aminokyselinové sekvence lehkého řetězce aktivačního peptidu faktoru VIII člověka, prasete a myši (sekvence id. č. 2, aminokyseliny 1649–1689, sekvence id. č. 37, aminokyseliny 1450–1490, sekvence id. č. 6, aminokyseliny 1641–1678, v uvedeném pořadí). Obr. 1F poskytuje srovnání aminokyselinové sekvence domény A3 faktoru VIII člověka, prasete a myši (sekvence id. č. 2, aminokyseliny 1690–2019, sekvence id. č. 37, aminokyseliny 1491–1820, sekvence id. č. 6, aminokyseliny 1679–2006, v uvedeném pořadí). Obr. 1G poskytuje aminokyselinové sekvence domén C1 faktoru VIII člověka, prasete a myši (sekvence id. č. 2, aminokyseliny 2020–2172, sekvence id. č. 37, aminokyseliny 1821–1973, sekvence id. č. 6, aminokyseliny 2007–2159, v uvedeném pořadí). A nakonec obr. 1H uvádí sekvenční data domén C2 faktoru VIII člověka, prasete a myši (sekvence id. č. 2, aminokyseliny 2173–2332, sekvence id. č. 37, aminokyseliny 1974–2133, sekvence id. č. 6, aminokyseliny 2160–2319, v uvedeném pořadí).

Kosočtverci jsou vyznačena místa sulfatace tyrosinu, tučné písmo označuje potenciální glykosylační místa, navrhovaná vazebná místa pro faktor IXa, fosfolipid a protein C jsou dvojité podtržena a úseky účastníci se vazby inhibičních protilátek anti-A2 a anti-C2 jsou zvýrazněny

kurzívou. Hvězdičky označují konzervativní aminokyselinové sekvence. Viz také sekvence id. č. 36 (cDNA prasečího faktoru VIII) a sekvence id. č. 37 (dedukovaná aminokyselinová sekvence prasečího faktoru VIII), bylo použito stejného číslování lidské sekvence faktoru VIII jako v referenční práci (Wood et al., 1984, viz výše). Domény A1, A2 a B jsou definovány pomocí
 5 štěpných míst pro trombin v polohách 372, 740 a místa pro neznámou proteázu v poloze 1648 jako segmenty zbytků 1–372, 373–740 a 741–1648 (Eatona, D.L. et al., Biochemistry 25: 8343–8347, 1986). Domény A3, C1 a C2 jsou definovány jako segmenty zbytků 1690–2019, 2020–2172 a 2173–2332, v uvedeném pořadí (vehar et al., 1984, viz výše). Štěpná místa pro trombin (faktor IIa), faktor IXa, faktor X a APC (Fay et al., 1991, viz výše, Eaton, D. et al.,
 10 Biochemistry 25: 505–512, 1986, Lamphear, B.J. et al., Blood , 80: 3120–3128, 1992) jsou znázorněna tak, že název enzymu je uveden nad příslušným reaktivním argininem. Kyselý peptid je odštěpen od lehkého řetězce faktoru VIII trombinem nebo faktorem Xa v pozici 1689. Předpokládaná vazebná místa faktoru IXa (Fay et al., J. Biol. Chem. 269: 20522–20527, 1994, Lenting, P.J. et al., J. Biol. Chem. 269: 7150–7155, 1994), fosfolipid (Foster, P.A. et al., Blood
 15 75: 1999–2004, 1990) a protein C (Walker, F.J. et al., J. Biol. Chem. 265: 1484–1489, 1990) jsou dvojité podtržena. Úseky účastníci se vazby inhibičních protilátek anti-A2 (Lubin et al., 1994., viz výše, Healey et al., 1995, viz výše) a dříve předpokládaných anti-C2 jsou uvedena kurzívou. Inhibitorový epitop C2 identifikovaný podle předkládaného vynálezu (aminokyseliny 2181–2243 v lidské sekvenci) je znázorněn jednoduchým podtržením na obr. 1H. Tyrosinová sulfatační místa
 20 (Pittman et al., 1992, viz výše, Michnick et al., 1994, viz výše) jsou znázorněna symboly ♦. Rozpoznávací místa pro potenciální N–navázané glykosylace (NXS/T, kde X není prolin) jsou zvýrazněna tučně.

Nukleotidová sekvence kódující protein faktoru VIII postrádající doménu B je zde uvedena jako
 25 sekvence id. č. 38 a odpovídající predikovaná aminokyselinová sekvence jako sekvence id. č. 39.

Seznam sekvencí

30

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

35

- (A) DÉLKA: 9009 párů bází
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) TYP VLÁKNA: dvojité
- (D) TOPOLOGIE: není relevantní

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA na mRNA

40

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

45

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
- (F) TYP TKÁNĚ: Játra

(ix) ZNAKY:

50

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: různé znaky
- (B) POZICE: 5125..7053
- (D) DALŠÍ INFORMACE: /produkt= „struktura domény“
 /poznámka= „odpovídající doméně A3–C1–C2“

55

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: různé znaky
 (B) POZICE: 1..2277
 (D) DALŠÍ INFORMACE: /produkt= „struktura domény“
 /poznámka= „odpovídající doméně A1–A2“

5

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: různé znaky
 (B) POZICE: 1..2277
 (D) DALŠÍ INFORMACE: /produkt= „doména“
 /poznámka= „cDNA kódující lidský faktor VIII“

10

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

CAGTGGGTAA GTTCCTTAAA TGCTCTGCAA AGAAATTGGG ACTTTTCATT AAATCAGAAA	60
TTTTACTTTT TTCCCTCCT GGGAGCTAAA GATATTTTAG AGAAGAATTA ACCTTTTGCT	120
TCTCCAGTTG AACATTTGTA GCAATAAGTC ATGCAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT	180
CTGTGCCTTT TGGGATTCTG CTTTAGTGCC ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA	240
CTGTCATGGG ACTATATGCA AAGTGATCTC GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTCCT	300
CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC ACCTCAGTCG TGTACAAAAA GACTCTGTTT	360
GTAGAATTCA CGGTTACCT TTTCAACATC GCTAAGCCAA GGCCACCCTG GATGGGTCTG	420

CTAGGTCCTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG	480
GCTTCCCCTC CTGTCACTCT TCATGCTGTT GGTGTATCCT ACTGGAAAGC TTCTGAGGGA	540
GCTGAATATG ATGATCAGAC CAGTCAAAGG GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTTCCCTGGT	600
GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCCTG AAAGAGAATG GTCCAATGGC CTCTGACCCA	660
CTGTGCCTTA CCTACTCATA TCTTTCTCAT GTGGACCTGG TAAAAGACTT GAATTCAGGC	720
CTCATTGGAG CCCTACTAGT ATGTAGAGAA GGGAGTCTGG CCAAGGAAAA GACACAGACC	780
TTGCACAAAT TTATACTACT TTTTGCTGTA TTTGATGAAG GGAAAAGTTG GCACTCAGAA	840
ACAAAGAACT CCTTGATGCA GGATAGGGAT GCTGCATCTG CTCGGGCCTG GCCTAAAATG	900
CACACAGTCA ATGGTTATGT AAACAGGTCT CTGCCAGGTC TGATTGGATG CCACAGGAAA	960
TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGGAAATGGGC ACCACTCCTG AAGTGCACCTC AATATTCCTC	1020
GAAGGTCACA CATTTCTTGT GAGGAACCAT CGCCAGGCGT CCTTGGAAT CTCGCCAATA	1080
ACTTTCCTTA CTGCTCAAAC ACTCTTGATG GACCTTGGAC AGTTTCTACT GTTTTGTCTAT	1140
ATCTCTTCCC ACCAACATGA TGGCATGGAA GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG	1200
GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA GAAGCGGAAG ACTATGATGA TGATCTTACT	1260
GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT GATGACAACT CTCCTTCCTT TATCCAAATT	1320
CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAAC TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG	1380
GACTGGGACT ATGCTCCCTT AGTCCTCGCC CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT	1440
TTGAACAATG GCCCTCAGCG GATTGGTAGG AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATACT	1500
ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT ATTCAGCATG AATCAGGAAT CTGGGGACCT	1560
TTACTTTATG GGGAAAGTTGG AGACACACTG TTGATTATAT TTAAGAATCA AGCAAGCAGA	1620
CCATATAACA TCTACCCTCA CGGAATCACT GATGTCCGTC CTTTGTATTG AAGGAGATTA	1680
CCAAAAGGTG TAAAACATTT GAAGGATTTT CCAATTCTGC CAGGAGAAAT ATTCAAATAT	1740
AAATGGACAG TGAATGTAGA AGATGGGCCA ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCGC	1800
TATTACTCTA GTTTCGTTAA TATGGAGAGA GATCTAGCTT CAGGACTCAT TGGCCCTCTC	1860
CTCATCTGCT ACAAAGAATC TGTAGATCAA AGAGGAAACC AGATAATGTC AGACAAGAGG	1920
AATGTCATCC TGTTTTCTGT ATTTGATGAG AACC GAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA	1980
CAACGCTTTC TCCCCAATCC AGCTGGAGTG CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCTCC	2040
AACATCATGC ACAGCATCAA TGGCTATGTT TTTGATAGTT TGCACTTGTC AGTTTGTGTTG	2100
CATGAGGTGG CATACTGGTA CATTCTAAGC ATTGGAGCAC AGACTGACTT CCTTTCTGTC	2160

TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA ATGGTCTATG AAGACACACT CACCCTATTC	2220
CCATTCTCAG GAGAACTGT CTTTCATGTG ATGGAAAACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG	2280
TGCCCAAAC CAGACTTTCG GAACAGAGGC ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT	2340
GACAAGAACA CTGGTGATTA TTACGAGGAC AGTTATGAAG ATATTTTCAGC ATACTTGCTG	2400
AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAAGC TTCTCCCAGA ATTCAAGACA CCCTAGCACT	2460
AGGCAAAAGC AATTTAATGC CACCACAATT CCAGAAAATG ACATAGAGAA GACTGACCCT	2520
TGGTTTGCAC ACAGAACACC TATGCCTAAA ATACAAAATG TCTCCTCIAG TGATTTGTTG	2580
ATGCTCTTGC GACAGAGTCC TACTCCACAT GGGCTATCCT TATCTGATCT CCAAGAAGCC	2640
AAATATGAGA CTTTTTCTGA TGATCCATCA CCTGGAGCAA TAGACAGTAA TAACAGCCTG	2700
TCTGAAATGA CACACTTCAG GCCACAGCTC CATCACAGTG GGGACATGGT ATTTACCCCT	2760
GAGTCAGGCC TCCAATTAAG ATTAAATGAG AAAGTGGGA CAACTGCAGC AACAGAGTTG	2820
AAGAACTTG ATTTCAAAGT TTCTAGTACA TCAATAATC TGATTTCAAC AATTCCATCA	2880
GACAATTTGG CAGCAGGTAC TGATAATACA AGTTCCTTAG GACCCCAAG TATGCCAGTT	2940
CATTATGATA GTCAATTAGA TACCACTCTA TTTGGCAAAA AGTCATCTCC CCTTACTGAG	3000
TCTGGTGGAC CTCTCAGCTT GAGTGAAGAA AATAATGATT CAAAGTTGTT AGAATCAGGT	3060
TTAATGAATA GCCAAGAAAG TTCATGGGGA AAAAATGTAT CGTCAACAGA GAGTGGTAGG	3120
TTATTTAAAG GGAAAAGAGC TCATGGACCT GCTTTGTTGA CTAAAGATAA TGCCTTATTC	3180
AAAGTTAGCA TCTCTTTGTT AAAGACAAAC AAACTTCCA ATAATTCAGC AACTAATAGA	3240
AAGACTCACA TTGATGGCCC ATCATTATTA ATTGAGAATA GTCCATCAGT CTGGCAAAAT	3300
ATATTAGAAA GTGACACTGA GTTTAAAAAA GTGACACCTT TGATTCATGA CAGAATGCTT	3360
ATGGACAAAA ATGCTACAGC TTTGAGGCTA AATCATATGT CAAATAAAAC TACTTCATCA	3420
AAAAACATGG AAATGGTCCA ACAGAAAAAA GAGGGCCCCA TTCCACCAGA TGCACAAAAT	3480
CCAGATATGT CGTTCCTTAA GATGCTATTC TTGCCAGAAT CAGCAAGGTG GATACAAAGG	3540
ACTCATGGAA AGAACTCTCT GAACTCTGGG CAAGGCCCCA GTCCAAAGCA ATTAGTATCC	3600
TTAGGACCAG AAAAATCTGT GGAAGGTCAG AATTCTTGT CTGAGAAAAA CAAAGTGGTA	3660
GTAGGAAAGG GTGAATTTAC AAAGGACGTA GGAATCAAAG AGATGGTTTT TCCAAGCAGC	3720
AGAAACCTAT TTCTTACTAA CTTGGATAAT TTACATGAAA ATAATACACA CAATCAAGAA	3780
AAAAAATTC AGGAAGAAAT AGAAAAGAAG GAAACATTAA TCCAAGAGAA TGTAGTTTGT	3840
CCTCAGATAC ATACAGTGAC TGGCACTAAG AATTTTCATGA AGAACCTTTT CTTACTGAGC	3900

ACTAGGCAAA ATGTAGAAGG TTCATATGAG GGGGCATATG CTCCAGTACT TCAAGATTTT	3960
AGGTCATTAA ATGATTCAAC AAATAGAACA AAGAAACACA CAGCTCATTT CTCAAAAAAA	4020
GGGGAGGAAG AAAACTTGGA AGGCTTGGGA AATCAAACCA AGCAAATTGT AGAGAAATAT	4080
GCATGCACCA CAAGGATATC TCCTAATACA AGCCAGCAGA ATTTTGTAC GCAACGTAGT	4140
AAGAGAGCTT TGAAACAATT CAGACTCCCA CTAGAAGAAA CAGAACTTGA AAAAAGGATA	4200
ATTGTGGATG ACACCTCAAC CCAGTGGTCC AAAAACATGA AACATTTGAC CCCGAGCACC	4260
CTCACACAGA TAGACTACAA TGAGAAGGAG AAAGGGGCCA TTAATCAGTC TCCCTTATCA	4320
GATTGCCTTA CGAGGAGTCA TAGCATCCCT CAAGCAAATA GATCTCCATT ACCCATTGCA	4380
AAGGTATCAT CATTTCCATC TATTAGACCT ATATATCTGA CCAGGGTCCT ATTCCAAGAC	4440
AACTCTTCTC ATCTTCCAGC AGCATCTTAT AGAAAGAAAG ATTCTGGGGT CCAAGAAAGC	4500
AGTCATTTCT TACAAGGAGC CAAAAAAAT AACCTTTCTT TAGCCATTCT AACCTTGGAG	4560
ATGACTGGTG ATCAAAGAGA GGTGGGCTCC CTGGGGACAA GTGCCACAAA TTCAGTCACA	4620
TACAAGAAAG TTGAGAACAC TGTCTCCCG AAACCAGACT TGCCCAAAAC ATCTGGCAAA	4680
GTTGAATTGC TTCCAAAAGT TCACATTTAT CAGAAGGACC TATTCCTAC GGAAACTAGC	4740
AATGGGTCTC CTGGCCATCT GGATCTCGTG GAAGGGAGCC TTCTTCAGGG AACAGAGGGA	4800
GCGATTAAAT GGAATGAAGC AAACAGACCT GGAAAAGTTC CCTTTCTGAG AGTAGCAACA	4860
GAAAGCTCTG CAAAGACTCC CTCCAAGCTA TTGGATCCTC TTGCTTGGGA TAACCACTAT	4920
GGTACTCAGA TACCAAAAGA AGAGTGGAAA TCCAAGAGA AGTCACCAGA AAAACAGCT	4980
TTTAAGAAAA AGGATACCAT TTTGTCCCTG AACGCTTGTG AAAGCAATCA TGCAATAGCA	5040
GCAATAAATG AGGGACAAAA TAAGCCCGAA ATAGAAGTCA CCTGGGCAAA GCAAGGTAGG	5100
ACTGAAAGGC TGTGCTCTCA AAACCCACCA GTCTTGAAAC GCCATCAACG GGAAATAACT	5160
CGTACTACTC TTCAGTCAGA TCAAGAGGAA ATTGACTATG ATGATACCAT ATCAGTTGAA	5220
ATGAAGAAGG AAGATTTTGA CATTTATGAT GAGGATGAAA ATCAGAGCCC CCGCAGCTTT	5280
CAAAAGAAAA CACGACACTA TTTTATTGCT GCAGTGGAGA GGCTCTGGGA TTATGGGATG	5340
AGTAGCTCCC CACATGTTCT AAGAAACAGG GCTCAGAGTG GCAGTGTCCC TCAGTTCAAG	5400
AAAGTTGTTT TCCAGGAATT TACTGATGGC TCCTTTACTC AGCCCTTATA CCGTGAGAA	5460
CTAAATGAAC ATTTGGGACT CCTGGGGCCA TATATAAGAG CAGAAGTTGA AGATAATATC	5520
ATGGTAACTT TCAGAAATCA GGCCTCTCGT CCCTATTCTT TCTATTCTAG CCTTATTCTT	5580
TATGAGGAAG ATCAGAGGCA AGGAGCAGAA CCTAGAAAAA ACTTTGTCAA GCCTAATGAA	5640

ACCAAACTT ACTTTTGGAA AGTGCAACAT CATATGGCAC CCACTAAAGA TGAGTTTGAC	5700
TGCAAAGCCT GGGCTTATTT CTCTGATGTT GACCTGGAAA AAGATGTGCA CTCAGGCCTG	5760
ATTGACCCC TTCTGGTCTG CCACACTAAC AACTGAACC CTGCTCATGG GAGACAAGTG	5820
ACAGTACAGG AATTGCTCT GTTTTTCACC ATCTTTGATG AGACCAAAG CTGGTACTTC	5880
ACTGAAAATA TGGAAAGAAA CTGCAGGGCT CCCTGCAATA TCCAGATGGA AGATCCCACT	5940
TTTAAAGAGA ATTATCGCTT CCATGCAATC AATGGCTACA TAATGGATAC ACTACCTGGC	6000
TTAGTAATGG CTCAGGATCA AAGGATTGCA TGGTATCTGC TCAGCATGGG CAGCAATGAA	6060
AACATCCATT CTATTCATTT CAGTGGACAT GTGTTCCTG TACGAAAAA AGAGGAGTAT	6120
AAAATGGCAC TGTACAATCT CTATCCAGGT GTTTTGTAGA CAGTGGAAAT GTTACCATCC	6180
AAAGCTGGAA TTGGCGGGT GGAATGCCTT ATTGGCGAGC ATCTACATGC TGGGATGAGC	6240
ACACTTTTTT TGGTGTACAG CAATAAGTGT CAGACTCCCC TGGGAATGGC TTCTGGACAC	6300
ATTAGAGATT TTCAGATTAC AGCTTCAGGA CAATATGGAC AGTGGGCCCC AAAGCTGGCC	6360
AGACTTCATT ATTCCGGATC AATCAATGCC TGGAGCACCA AGGAGCCCTT TTCTTGGATC	6420
AAGGTGGATC TGTGGCACC AATGATTATT CACGGCATCA AGACCCAGGG TGCCCGTCAG	6480
AAGTTCTCCA GCCTCTACAT CTCTCAGTTT ATCATCATGT ATAGTCTTGA TGGGAAGAAG	6540
TGGCAGACTT ATCGAGGAAA TTCCACTGGA ACCTTAATGG TCTTCTTTGG CAATGTGGAT	6600
TCATCTGGGA TAAACACAA TATTTTAAAC CCTCCAATTA TTGCTCGATA CATCCGTTTG	6660
CACCCAACTC ATTATAGCAT TCGCAGCACT CTTGCGATGG AGTTGATGGG CTGTGATTTA	6720
AATAGTTGCA GCATGCCATT GGAATGGAG AGTAAAGCAA TATCAGATGC ACAGATTACT	6780
GCTTCATCCT ACTTTACCAA TATGTTTGCC ACCTGGTCTC CTTCAAAAGC TCGACTTCAC	6840
CTCCAAGGGA GGAGTAATGC CTGGAGACCT CAGGTGAATA ATCCAAAAGA GTGGCTGCAA	6900
GTGGACTTCC AGAAGACAAT GAAAGTCACA GGAGTAACTA CTCAGGGAGT AAAATCTCTG	6960
CTTACCAGCA TGTATGTGAA GGAGTTCCTC ATCTCCAGCA GTCAAGATGG CCATCAGTGG	7020
ACTCTCTTTT TTCAGAATGG CAAAGTAAAG GTTTTTCAGG GAAATCAAGA CTCCTTCACA	7080
CCTGTGGTGA ACTCTCTAGA CCCACCGTTA CTGACTCGCT ACCTTCGAAT TCACCCCCAG	7140
AGTTGGGTGC ACCAGATTGC CCTGAGGATG GAGGTTCTGG GCTGCGAGGC ACAGGACCTC	7200
TACTGAGGGT GGCCACTGCA GCACCTGCCA CTGCCGTCAC CTCTCCCTCC TCAGCTCCAG	7260
GGCAGTGTCC CTCCCTGGCT TGCCTTCTAC CTTTGTGCTA AATCCTAGCA GACACTGCCT	7320
TGAAGCCTCC TGAATTAAC ATCATCAGTC CTGCATTTCT TTGGTGGGGG GCCAGGAGGG	7380

TGCATCCAAT TTAACCTAAC TCTTACCTAT TTTCTGCAGC TGCTCCCAGA TTACTCCTTC	7440
CTTCCAATAT AACTAGGCAA AAAGAAGTGA GGAGAAACCT GCATGAAAGC ATTCTTCCCT	7500
GAAAAGTTAG GCCTCTCAGA GTCACCACTT CCTCTGTTGT AGAAAACTA TGTGATGAAA	7560
CTTTGAAAAA GATATTTATG ATGTTAACAT TTCAGGTTAA GCCTCATACG TTTAAAAATA	7620
AACTCTCAGT TGTTTATTAT CCTGATCAAG CATGGAACAA AGCATGTTTC AGGATCAGAT	7680
CAATACAATC TTGGAGTCAA AAGGCAAATC ATTTGGACAA TCTGCAAAAT GGAGAGAATA	7740
CAATAACTAC TACAGTAAAG TCTGTTTCTG CTTCTTACA CATAGATATA ATTATGTTAT	7800
TTAGTCATTA TGAGGGGCAC ATTCTTATCT CCAAACTAG CATTCTTAAA CTGAGAATTA	7860
TAGATGGGGT TCAAGAATCC CTAAGTCCCC TGAAATTATA TAAGGCATTTC TGTATAAATG	7920
CAATGTGCA TTTTCTGAC GAGTGTCCAT AGATATAAAG CCATTGGTCT TAATTCTGAC	7980
CAATAAAAAA ATAAGTCAGG AGGATGCAAT TGTTGAAAGC TTTGAAATAA AATAACATGT	8040
CTTCTTGAAA TTTGTGATGG CCAAGAAAGA AAATGATGAT GACATTAGGC TTCTAAAGGA	8100
CATACATTTA ATATTTCTGT GGAAATATGA GGAAATCCA TGGTTATCTG AGATAGGAGA	8160
TACAAACTTT GTAATCTAA TAATGCACTC AGTTTACTCT CTCCCTCTAC TAATTCCTG	8220
CTGAAAATAA CACAACAAAA ATGTAACAGG GGAAATTATA TACCGTGA CTGAAAATAA	8280
GTCCTACTTA CATAGTTGAA ATATCAAGGA GGTGAGAAGA AAATTGGACT GGTGAAAACA	8340
GAAAAAACAC TCCAGTCTGC CATATCACCA CACAATAGGA TCCCCCTTCT TGCCCTCCAC	8400
CCCCATAAGA TTGTGAAGGG TTTACTGCTC CTTCCATCTG CCTGCACCCC TTCCTATGA	8460
CTACACAGAA CTCTCCTGAT AGTAAAGGGG GCTGGAGGCA AGGATAAGTT ATAGAGCAGT	8520
TGGAGGAAGC ATCCAAAGAC TGCAACCCAG GGCAAATGGA AACAGGAGA TCCTAATATG	8580
AAAGAAAAAT GGATCCCAAT CTGAGAAAAG GCAAAGAAT GGCTACTTTT TTCTATGCTG	8640
GAGTATTTTC TAATAATCCT GCTTGACCTT TATCTGACCT CTTTGGAAC TATAACATAG	8700
CTGTCACAGT ATAGTCACAA TCCACAAATG ATGCAGGTGC AAATGGTTTA TAGCCCTGTG	8760
AAGTTCTTAA AGTTTAGAGG CTAACCTACA GAAATGAATA AGTTGTTTG TTTTATAGCC	8820
CGGTAGAGGA GTTAACCCCA AAGGTGATAT GGTTTTATTT CTTGTTATGT TTAACCTGAT	8880
AATCTTATTT TGGCATTCTT TTCCATTGA CTATATACAT CTCTATTTCT CAAATGTTCA	8940
TGGAAGTAGC TCTTTTATTT TCCTGCTGGT TTCTTCAGTA ATGAGTTAAA TAAAACATTG	9000
ACACATACA	9009

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :

- (A) DÉLKA: 2332 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: není relevantní

(ii) TYP MOLEKULY: protein

(iii) HYPOTETICKÁ: ano

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(v) TYP FRAGMENTU: N-koncový

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
 (F) TYP TKÁNĚ: Játra

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 2:

Ala	Thr	Arg	Arg	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ala	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Asp	Tyr	1	5	10	15
Met	Gln	Ser	Asp	Leu	Gly	Glu	Leu	Pro	Val	Asp	Ala	Arg	Phe	Pro	Pro	20	25	30	
Arg	Val	Pro	Lys	Ser	Phe	Pro	Phe	Asn	Thr	Ser	Val	Val	Tyr	Lys	Lys	35	40	45	
Thr	Leu	Phe	Val	Glu	Phe	Thr	Val	His	Leu	Phe	Asn	Ile	Ala	Lys	Pro	50	55	60	
Arg	Pro	Pro	Trp	Met	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Thr	Ile	Gln	Ala	Glu	Val	65	70	75	80
Tyr	Asp	Thr	Val	Val	Ile	Thr	Leu	Lys	Asn	Met	Ala	Ser	His	Pro	Val	85	90	95	
Ser	Leu	His	Ala	Val	Gly	Val	Ser	Tyr	Trp	Lys	Ala	Ser	Glu	Gly	Ala	100	105	110	
Glu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Thr	Ser	Gln	Arg	Glu	Lys	Glu	Asp	Asp	Lys	Val	115	120	125	
Phe	Pro	Gly	Gly	Ser	His	Thr	Tyr	Val	Trp	Gln	Val	Leu	Lys	Glu	Asn	130	135	140	
Gly	Pro	Met	Ala	Ser	Asp	Pro	Leu	Cys	Leu	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Ser	145	150	155	160
His	Val	Asp	Leu	Val	Lys	Asp	Leu	Asn	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Ala	Leu	165	170	175	

Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
 180 185 190
 His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp
 195 200 205
 His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser
 210 215 220
 Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg
 225 230 235 240
 Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
 245 250 255
 Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu
 260 265 270
 Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile
 275 280 285
 Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
 290 295 300
 Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met
 305 310 315 320
 Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg
 325 330 335
 Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp
 340 345 350
 Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe
 355 360 365
 Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His
 370 375 380
 Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu
 385 390 395 400
 Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro
 405 410 415
 Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
 420 425 430
 Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile
 435 440 445
 Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
 450 455 460
 Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
 465 470 475 480

Thr	Asp	Val	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ser	Arg	Arg	Leu	Pro	Lys	Gly	Val	Lys	485	490	495	
His	Leu	Lys	Asp	Phe	Pro	Ile	Leu	Pro	Gly	Glu	Ile	Phe	Lys	Tyr	Lys	500	505	510	
Trp	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Gly	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	Arg	Cys	515	520	525	
Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg	Asp	Leu	Ala	530	535	540	
Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu	Ser	Val	Asp	545	550	555	560
Gln	Arg	Gly	Asn	Gln	Ile	Met	Ser	Asp	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Leu	Phe	565	570	575	
Ser	Val	Phe	Asp	Glu	Asn	Arg	Ser	Trp	Tyr	Leu	Thr	Glu	Asn	Ile	Gln	580	585	590	
Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Glu	Asp	Pro	Glu	Phe	595	600	605	
Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met	His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val	Phe	Asp	Ser	610	615	620	
Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	His	Glu	Val	Ala	Tyr	Trp	Tyr	Ile	Leu	625	630	635	640
Ser	Ile	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	Ser	Val	Phe	Phe	Ser	Gly	Tyr	645	650	655	
Thr	Phe	Lys	His	Lys	Met	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr	Leu	Phe	Pro	660	665	670	
Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Phe	Met	Ser	Met	Glu	Asn	Pro	Gly	Leu	Trp	675	680	685	
Ile	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly	Met	Thr	Ala	690	695	700	
Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Glu	705	710	715	720
Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys	Asn	Asn	Ala	725	730	735	
Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	His	Pro	Ser	Thr	Arg	740	745	750	
Gln	Lys	Gln	Phe	Asn	Ala	Thr	Thr	Ile	Pro	Glu	Asn	Asp	Ile	Glu	Lys	755	760	765	
Thr	Asp	Pro	Trp	Phe	Ala	His	Arg	Thr	Pro	Met	Pro	Lys	Ile	Gln	Asn	770	775	780	

Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro
 785 790 795 800
 His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe
 805 810 815
 Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser
 820 825 830
 Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val
 835 840 845
 Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly
 850 855 860
 Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser
 865 870 875 880
 Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala
 885 890 895
 Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His
 900 905 910
 Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro
 915 920 925
 Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp
 930 935 940
 Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp
 945 950 955 960
 Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys
 965 970 975
 Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys
 980 985 990
 Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala
 995 1000 1005
 Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu Asn
 1010 1015 1020
 Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu Phe Lys
 1025 1030 1035 1040
 Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp Lys Asn Ala
 1045 1050 1055
 Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr Thr Ser Ser Lys
 1060 1065 1070
 Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly Pro Ile Pro Pro Asp
 1075 1080 1085

Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys Met Leu Phe Leu Pro Glu		
1090	1095	1100
Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser		
1105	1110	1115 1120
Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys		
	1125	1130 1135
Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val		
	1140	1145 1150
Gly Lys Gly Glu Phe Thr Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe		
	1155	1160 1165
Pro Ser Ser Arg Asn Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu		
	1170	1175 1180
Asn Asn Thr His Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys		
1185	1190	1195 1200
Lys Glu Thr Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr		
	1205	1210 1215
Val Thr Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr		
	1220	1225 1230
Arg Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Glu Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu		
	1235	1240 1245
Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys His		
	1250	1255 1260
Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu Gly Leu		
1265	1270	1275 1280
Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys Thr Thr Arg		
	1285	1290 1295
Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr Gln Arg Ser Lys		
	1300	1305 1310
Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu Glu Thr Glu Leu Glu		
	1315	1320 1325
Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr Gln Trp Ser Lys Asn Met		
	1330	1335 1340
Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys		
1345	1350	1355 1360
Glu Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg		
	1365	1370 1375
Ser His Ser Ile Pro Gln Ala Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys		
	1380	1385 1390

Val Ser Ser Phe Pro Ser Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu
 1395 1400 1405
 Phe Gln Asp Asn Ser Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys
 1410 1415 1420
 Asp Ser Gly Val Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys Lys
 1425 1430 1435 1440
 Asn Asn Leu Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly Asp Gln
 1445 1450 1455
 Arg Glu Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr
 1460 1465 1470
 Lys Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr
 1475 1480 1485
 Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys Asp
 1490 1495 1500
 Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu Asp Leu
 1505 1510 1515 1520
 Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile Lys Trp Asn
 1525 1530 1535
 Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg Val Ala Thr Glu
 1540 1545 1550
 Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp Pro Leu Ala Trp Asp
 1555 1560 1565
 Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu Glu Trp Lys Ser Gln Glu
 1570 1575 1580
 Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser
 1585 1590 1595 1600
 Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly
 1605 1610 1615
 Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr
 1620 1625 1630
 Glu Arg Leu Cys Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg
 1635 1640 1645
 Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr
 1650 1655 1660
 Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr
 1665 1670 1675 1680
 Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg
 1685 1690 1695

His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser
 1700 1705 1710
 Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro
 1715 1720 1725
 Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr
 1730 1735 1740
 Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly
 1745 1750 1755 1760
 Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg
 1765 1770 1775
 Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr
 1780 1785 1790
 Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys
 1795 1800 1805
 Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala
 1810 1815 1820
 Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp
 1825 1830 1835 1840
 Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu
 1845 1850 1855
 Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr
 1860 1865 1870
 Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser
 1875 1880 1885
 Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn
 1890 1895 1900
 Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala
 1905 1910 1915 1920
 Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln
 1925 1930 1935
 Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn
 1940 1945 1950
 Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys
 1955 1960 1965
 Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu
 1970 1975 1980
 Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys
 1985 1990 1995 2000

Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val
 2005 2010 2015
 Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile
 2020 2025 2030
 Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro
 2035 2040 2045
 Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr
 2050 2055 2060
 Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile
 2065 2070 2075 2080
 Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu
 2085 2090 2095
 Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp
 2100 2105 2110
 Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly
 2115 2120 2125
 Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile
 2130 2135 2140
 Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser
 2145 2150 2155 2160
 Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met
 2165 2170 2175
 Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala
 2180 2185 2190
 Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala
 2195 2200 2205
 Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn
 2210 2215 2220
 Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val
 2225 2230 2235 2240
 Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr
 2245 2250 2255
 Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr
 2260 2265 2270
 Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp
 2275 2280 2285
 Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg
 2290 2295 2300

Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg
 2305 2310 2315 2320

Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
 2325 2330

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

- 5 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :
 (A) DÉLKA: 1130 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP VLÁKNA: dvojité
 (D) TOPOLOGIE: není relevantní
- 10 (ii) TYP MOLEKULY: cDNA na mRNA
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- 15 (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne
- (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:
 (A) ORGANISMUS: Prase
 (F) TYP TKÁNĚ: krev
- 20 (ix) ZNAKY:
 (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: různé znaky
 (B) POZICE: 1..1130
 (D) DALŠÍ INFORMACE: /produkt= „oblast“
 25 /poznámka= „cDNA kódující doménu A2 prasečího faktoru VIII“

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 3:

TAAGCACCCCT AAGACGTGGG TGCACTACAT CTCTGCAGAG GAGGAGGACT GGGACTACGC	60
CCCCGCGGTC CCCAGCCCCA GTGACAGAAG TTATAAAAGT CTCTACTTGA ACAGTGGTCC	120
TCAGCGAATT GGTAGGAAAT ACAAAAAAGC TCGATTCGTC GCTTACACGG ATGTAACATT	180
TAAGACTCGT AAAGCTATTC CGTATGAATC AGGAATCCTG GGACCTTTAC TTTATGGAGA	240
AGTTGGAGAC ACACTTTTGA TTATATTTAA GAATAAAGCG AGCCGACCAT ATAACATCTA	300
CCCTCATGGA ATCACTGATG TCAGCGCTTT GCACCCAGGG AGACTTCTAA AAGGTTGGAA	360
ACATTTGAAA GACATGCCAA TTCTGCCAGG AGAGACTTTC AAGTATAAAT GGACAGTGAC	420
TGTGGAAGAT GGGCCAACCA AGTCCGATCC TCGGTGCCTG ACCCGCTACT ACTCGAGCTC	480
CATTAATCTA GAGAAAGATC TGGCTTCGGG ACTCATTGGC CCTCTCCTCA TCTGCTACAA	540
AGAATCTGTA GACCAAAGAG GAAACCAGAT GATGTCAGAC AAGAGAAACG TCATCCTGTT	600
TTCTGTATTC GATGAGAATC AAAGCTGGTA CCTCGCAGAG AATATTCAGC GCTTCCTCCC	660

CAATCCGGAT GGATTACAGC CCCAGGATCC AGAGTTCCAA GCTTCTAACA TCATGCACAG 720
 CATCAATGGC TATGTTTTTG ATAGCTTGCA GCTGTCGGTT TGTTTGCACG AGGTGGCATA 780
 CTGGTACATT CTAAGTGTG GAGCACAGAC GGACTTCCTC TCCGTCTTCT TCTCTGGCTA 840
 CACCTTCAAA CACAAAATGG TCTATGAAGA CACACTCACC CTGTCCCCCT TCTCAGGAGA 900
 AACGGTCTTC ATGTCAATGG AAAACCCAGG TCTCTGGGTC CTAGGGTGCC ACAACTCAGA 960
 CTTGCCGAAC AGAGGGATGA CAGCCTTACT GAAGGTGTAT AGTTGTGACA GGGACATTGG 1020
 TGATTATTAT GACAACACTT ATGAAGATAT TCCAGGCTTC TTGCTGAGTG GAAAGAATGT 1080
 CATTGAACCC AGAAGCTTTG CCCAGAATTC AAGACCCCCT AGTGCGAGCA 1130

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

- 5 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 368 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární
- 10 (ii) TYP MOLEKULY: protein
- (iii) HYPOTETICKÁ: ano
- 15 (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne
- (v) TYP FRAGMENTU: N-koncový
- 20 (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:
 (A) ORGANISMUS: Prase
 (F) TYP TKÁNĚ: slezina
- 25 (ix) ZNAKY:
 (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: Protein
 (B) POZICE: 1..368
 (D) DALŠÍ INFORMACE: /poznámka= „predikovaná aminokyselinová sekvence domény A2 prasečího faktoru VIII, definovaná jako zbytky homologní k lidskému faktoru VIII, aminokyseliny 373–740. Zbytky 1–4 jsou ze známé prasečí aminokyselinové sekvence.“

30 (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 4:

Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His Tyr Ile Ser Ala
 1 5 10 15

Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Ala Val Pro Ser Pro Ser Asp
 20 25 30

Arg Ser Tyr Lys Ser Leu Tyr Leu Asn Ser Gly Pro Gln Arg Ile Gly
 35 40 45

Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys	Ala	Arg	Phe	Val	Ala	Tyr	Thr	Asp	Val	Thr	Phe	50	55	60
Lys	Thr	Arg	Lys	Ala	Ile	Pro	Tyr	Glu	Ser	Gly	Ile	Leu	Gly	Pro	Leu	65	70	75
Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Thr	Leu	Leu	Ile	Ile	Phe	Lys	Asn	Lys	85	90	95
Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro	His	Gly	Ile	Thr	Asp	Val	Ser	100	105	110
Ala	Leu	His	Pro	Gly	Arg	Leu	Leu	Lys	Gly	Trp	Lys	His	Leu	Lys	Asp	115	120	125
Met	Pro	Ile	Leu	Pro	Gly	Glu	Thr	Phe	Lys	Tyr	Lys	Trp	Thr	Val	Thr	130	135	140
Val	Glu	Asp	Gly	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	145	150	155
Tyr	Ser	Ser	Ser	Ile	Asn	Leu	Glu	Lys	Asp	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile	165	170	175
Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu	Ser	Val	Asp	Gln	Arg	Gly	Asn	180	185	190
Gln	Met	Met	Ser	Asp	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Leu	Phe	Ser	Val	Phe	Asp	195	200	205
Glu	Asn	Gln	Ser	Trp	Tyr	Leu	Ala	Glu	Asn	Ile	Gln	Arg	Phe	Leu	Pro	210	215	220
Asn	Pro	Asp	Gly	Leu	Gln	Pro	Gln	Asp	Pro	Glu	Phe	Gln	Ala	Ser	Asn	225	230	235
Ile	Met	His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val	Phe	Asp	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	245	250	255
Val	Cys	Leu	His	Glu	Val	Ala	Tyr	Trp	Tyr	Ile	Leu	Ser	Val	Gly	Ala	260	265	270
Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	Ser	Val	Phe	Phe	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Lys	His	275	280	285
Lys	Met	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr	Leu	Phe	Pro	Phe	Ser	Gly	Glu	290	295	300
Thr	Val	Phe	Met	Ser	Met	Glu	Asn	Pro	Gly	Leu	Trp	Val	Leu	Gly	Cys	305	310	315
His	Asn	Ser	Asp	Leu	Arg	Asn	Arg	Gly	Met	Thr	Ala	Leu	Leu	Lys	Val	325	330	335
Tyr	Ser	Cys	Asp	Arg	Asp	Ile	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Asp	Asn	Thr	Tyr	Glu	340	345	350
Asp	Ile	Pro	Gly	Phe	Leu	Leu	Ser	Gly	Lys	Asn	Val	Ile	Glu	Pro	Arg	355	360	365

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 7493 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP VLÁKNA: dvojité
 (D) TOPOLOGIE: není relevantní

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA na mRNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

- (A) ORGANISMUS: Mus musculus

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: repetice
 (B) POZICE: 1..407
 (D) DALŠÍ INFORMACE: /typ repetice= „koncová“
 /poznámka= „5' UTR“

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: různé znaky
 (B) POZICE: 7471..7476
 (D) DALŠÍ INFORMACE: /funkce= „signál polyA“

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: repetice
 (B) POZICE: 7368..7493
 (D) DALŠÍ INFORMACE: / typ repetice = „koncová“
 /poznámka= „3' UTR“

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: různé znaky
 (B) POZICE: 408..7367
 (D) DALŠÍ INFORMACE: /produkt= „koagulační faktor VIII“

(x) INFORMACE K PUBLIKACI:

- (A) AUTOŘI: Elder, F.
 Lakich, D.
 Gitschier, J.
 (B) TITUL: Sequence of the murine Factor VIII cDNA
 (C) ČASOPIS: Genomics
 (D) DÍL: 16
 (F) STRÁNKY: 374–379
 (G) DATUM: 1993

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

TCTAGAGTTT CTTTGCTACA GGTACCAAGG AACAGTCTTT TAGAATAGGC TAGGAATTTA

AATACACCTG AACGCCCCCTC CTCAGTATTC TGTTCCITTT CTTAAGGATT CAAACTTGTT	120
AGGATGCACC CAGCAGGAAA TGGGTTAAGC CTTAGCTCAG CCACTCTTCC TATTCCAGTT	180
TTCTGTGCCC TGCTTCCTAC TACCCAAAAG GAAGTAATCC TTCAGATCTG TTTTGTGCTA	240
ATGCTACTTT CACTCACAGT AGATAAACTT CCAGAAAATC CTCTGCAAAA TATTTAGGAC	300
TTTTTACTAA ATCATTACAT TTCTTTTGT TCTTAAAAGC TAAAGTTATT TTAGAGAAGA	360
GTTAAATTTT CATTTCTTTA GTTGAACATT TTCTAGTAAT AAPAGCCATG CAAATAGCAC	420
TCTTCGCTTG CTTCTTTCTG AGCCTTTTCA ATTTCTGCTC TAGTGCCATC AGAAGATACT	480
ACCTTGGTGC AGTGAATTG TCCTGGAACT ATATTCAGAG TGATCTGCTC AGTGTGCTGC	540
ATACAGACTC AAGATTTCTT CCTAGAATGT CAACATCTTT TCCATTCAAC ACCTCCATCA	600
TGTATAAAAA GACTGTGTTT GTAGAGTACA AGGACCAGCT TTTCAACATT GCCAAGCCCA	660
GGCCACCCTG GATGGGTTTG CTAGGTCCTA CCATTTGGAC TGAGGTTCAT GACACAGTGG	720
TCATTACACT TAAAAACATG GCTTCTCATC CTGTCAGTCT TCATGCTGTT GGTGTGTCCT	780
ACTGGAAAGC TTCTGAGGGA GATGAATATG AAGATCAGAC AAGCCAAATG GAGAAGGAAG	840
ATGATAAAGT TTTCCCTGGT GAAAGTCATA CTTATGTTTG GCAAGTCCTG AAAGAGAATG	900
GTCCAATGGC CTCTGACCCT CCATGTCTCA CTTACTCATA TATGTCTCAT GTGGATCTGG	960
TGAAAGATTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CTCTGCTAGT ATGTAAAGAA GGCAGTCTCT	1020
CCAAAGAAAG AACACAGATG TTGTACCAAT TTGTACTGCT TTTTGCTGTA TTTGATGAAG	1080
GGAAGAGCTG GCACTCAGAA ACAAACGACT CTTATACACA GTCTATGGAT TCTGCATCTG	1140
CTAGAGACTG GCCTAAAATG CACACAGTCA ATGGCTATGT AAACAGGTCT CTTCCAGGTC	1200
TGATTGGATG CCATAGGAAA TCAGTCTACT GGCACGTGAT TGAATGGGC ACCACTCCTG	1260
AAATACACTC AATATTCCTC GAAGGTCACA CATTTTTTGT GAGGAACCAC CGTCAAGCTT	1320
CATTGGAGAT ATCACCAATA ACTTTCCTTA CTGCTCAAAC ACTCTTGATA GATCTTGGGC	1380
AGTTCCTACT ATTTTGTCTAT ATCTCTTCCC ATAAACATGA TGGCATGGAA GCTTATGTCA	1440
AAGTAGATAG CTGCCCTGAG GAATCCCAAT GGCAAAAGAA AAATAATAAT GAGGAAATGG	1500
AAGATTATGA TGATGATCTT TATTCAGAAA TGGATATGTT CACATTGGAT TATGACAGCT	1560
CTCCTTTTAT CCAAAATTCGC TCGGTTGCTA AAAAGTACCC TAAAACTTGG ATACATTATA	1620
TTTCTGCTGA GGAGGAAGAC TGGGACTATG CACCTTCAGT TCCTACCTCG GATAATGGAA	1680
GTTATAAAAG CCAGTATCTG AGCAATGGTC CTCATCGGAT TGGTAGGAAA TATAAAAAAG	1740
TCAGATTTAT AGCATACACA GATGAAACCT TTAAGACTCG TGAAACTATT CAGCATGAAT	1800

CAGGACTCTT GGGACCTTTA CTTTATGGAG AAGTTGGAGA CACACTGTTG ATTATTTTTA	1860
AGAATCAAGC AAGCCGACCA TATAACATTT ACCCTCATGG AATCACTGAT GTCAGTCCTC	1920
TACATGCAAG GAGATTGCCA AGAGGTATAA AGCACGTGAA GGATTTGCCA ATTCATCCAG	1980
GAGAGATATT CAAGTACAAG TGGACAGTTA CAGTAGAAGA TGGACCAACT AAATCAGATC	2040
CACGGTGCCT GACCCGCTAT TATTCAAGTT TCATTAACCC TGAGAGAGAT CTAGCTTCAG	2100
GACTGATTGG CCCTCTTCTC ATCTGCTACA AAGAATCTGT AGATCAAAGG GGAAACCAGA	2160
TGATGTCAGA CAAAAGAAAT GTCATCCTGT TTTCTATATT TGATGAGAAC CAAAGCTGGT	2220
ACATCACAGA GAACATGCAA CGCTTCCTCC CCAATGCAGC TAAAACACAG CCCCAGGACC	2280
CTGGGTTCCA GGCCTCCAAC ATCATGCACA GCATCAATGG CTATGTTTTT GATAGCTTGG	2340
AGTTGACAGT TTGTTTGCAT GAGGTGGCAT ACTGGCACAT TCTCAGTGTG GGAGCACAGA	2400
CAGACTTCTT ATCTATCTTC TTCTCTGGAT ATACTTTCAA ACACAAAATG GTCTATGAAG	2460
ATACACTTAC CCTGTTCCCA TTCTCAGGAG AAAGTGTCTT TATGTCGATG GAAAACCCAG	2520
GTCTATGGGT CTTGGGGTGT CATAATTCAG ACTTTCGGAA GAGAGGTATG ACAGCATTGC	2580
TGAAAGTTTC TAGTTGTGAC AAGAGCACTA GTGATTATTA TGAAGAAATA TATGAAGATA	2640
TTCCAACACA GTTGGTGAAT GAGAACAATG TCATTGATCC CAGAAGCTTC TTCCAGAATA	2700
CAAATCATCC TAATACTAGG AAAAAGAAAT TCAAAGATTC CACAATTCCA AAAAATGATA	2760
TGGAGAAGAT TGAGCCTCAG TTTGAAGAGA TAGCAGAGAT GCTTAAAGTA CAGAGTGTCT	2820
CAGTTAGTGA CATGTTGATG CTCTTGGGAC AGAGTCATCC TACTCCACAT GGCTTATTTT	2880
TATCAGATGG CCAAGAAGCC ATCTATGAGG CTATTCATGA TGATCATTCA CCAATGCAA	2940
TAGACAGCAA TGAAGGCCCA TCTAAAGTGA CCCAACTCAG GCCAGAATCC CATCACAGTG	3000
AGAAAATAGT ATTTACTCCT CAGCCCGGCC TCCAGTTAAG ATCCAATAAA AGTTTGGAGA	3060
CAACTATAGA AGTAAAGTGG AAGAACTTG GTTTGCAAGT TTCTAGTTTG CCAAGTAATC	3120
TAATGACTAC AACAATTCTG TCAGACAATT TGAAAGCAAC TTTTGAAAAG ACAGATTCTT	3180
CAGGATTTCC AGATATGCCA GTTCACTCTA GTAGTAAATT AAGTACTACT GCATTGGGTA	3240
AGAAAGCATA TTCCCTTGTT GGGTCTCATG TACCTTTAAA CGCGAGTGAA GAAAATAGTG	3300
ATTCCAACAT ATTGGATTCA ACTTTAATGT ATAGTCAAGA AAGTTTACCA AGAGATAATA	3360
TATTATCAAT AGAGAATGAT AGATTACTCA GAGAGAAGAG GTTTCATGGA ATTGCTTTAT	3420
TGACCAAAGA TAATACTTTA TTCAAAGACA ATGTCTCCTT AATGAAAACA AACAAACAT	3480
ATAATCATTC AACAACATAAT GAAAACTAC ACACTGAGAG CCCAACATCA ATTGAGAATA	3540

GTACAACAGA CTTGCAAGAT GCCATATTAA AGGTCAATAG TGAGATTCAA GAAGTAACAG	3600
CTTTGATTCA TGATGGAACA CTTTtagGCA AAAATTCTAC ATATTTGAGA CTAAACCATA	3660
TGCTAAATAG AACTACCTCA ACAAAAAATA AAGACATATT TCATAGAAAA GATGAAGATC	3720
CTATTCCACA AGATGAAGAG AATACAATCA TGCCATTTTC CAAGATGTTG TTCTTGTCAG	3780
AATCTTCAAA TTGGTTTAAA AAGACCAATG GAAATAATTC CTTGAACTCT GAGCAAGAAC	3840
ATAGTCCAAA GCAATTAGTA TATTTAATGT TTAAAAATA TGTAAAAAT CAAAGTTTCT	3900
TGTCAGAGAA AAATAAGTC ACAGTAGAAC AGGATGGATT TACAAAGAAC ATAGGACTTA	3960
AAGACATGGC TTTCCACAT AATATGAGCA TATTTCTTAC CACTTTGTCT AACGTACATG	4020
AAAATGGTAG GCACAATCAA GAAAAAATA TTCAGGAAGA GATAGAGAAG GAAGCACTAA	4080
TTGAAGAGAA AGTAGTTTTG CCCCAGGTGC ACGAAGCAAC TGGCTCTAAG AATTTCTTGA	4140
AAGACATATT GATACTAGGC ACTAGGCAAA ATATAAGTTT ATATGAAGTA CATGTACCAG	4200
TACTTCAAAA CATCACATCA ATAAACAATT CAACAAATAC AGTACAGATT CACATGGAGC	4260
ATTTCTTTAA AAGAAGGAAG GACAAGGAAA CAAATTCAGA AGGCTTGGTA AATAAAACCA	4320
GAGAAATGGT AAAAACTAT CCAAGCCAGA AGAATATTAC TACTCAACGT AGTAAACGGG	4380
CTTTGGGACA ATTCAGACTG TCAACTCAAT GGCTTAAAC CATAACTGT TCAACACAGT	4440
GTATCATTAA ACAGATAGAC CACAGCAAGG AAATGAAAAA GTTCATTACT AAATCTTCCT	4500
TATCAGATTG TTCTGTGATT AAAAGCACCA CTCAGACAAA TAGTTCTGAC TCACACATTG	4560
TAAAAACATC AGCATTTCCA CCAATAGATC TCAAAAGGAG TCCATTCCAA AACAAATTTT	4620
CTCATGTTCA AGCATCATCC TACATTTATG ACTTTAAGAC AAAAAGTTCA AGAATTCAAG	4680
AAAGCAATAA TTTCTTAAAA GAAACCAAAA TAAATAACCC TTCTTTAGCC ATTCTACCAT	4740
GGAATATGTT CATAGATCAA GGAAAATTTA CCTCCCCAGG GAAAAGTAAC ACAAACCTCAG	4800
TCACATATAA GAAACGTGAG AACATTATTT TCTTGAAACC AACTTTGCCT GAAGAATCTG	4860
GCAAAATTGA ATTGCTTCCT CAAGTTTCCA TTCAAGAGGA AGAAATTTTA CCTACAGAAA	4920
CTAGCCATGG ATCTCCTGGA CACTTGAATC TCATGAAAGA GGTCTTTCTT CAGAAAATAC	4980
AGGGGCCTAC TAAATGGAAT AAAGCAAAGA GGCATGGAGA AAGTATAAAA GGTAAAACAG	5040
AGAGCTCTAA AAATACTCGC TCAAAACTGC TAAATCATCA TGCTTGGGAT TATCATTATG	5100
CTGCACAGAT ACCAAAAGAT ATGTGGAAAT CCAAAGAGAA GTCACCAGAA ATTATATCCA	5160
TTAAGCAAGA GGACACCATT TTGTCTCTGA GGCCTCATGG AAACAGTCAT TCAATAGGGG	5220
CAAATGAGAA ACAAATTTGG CCTCAAAGAG AAACCACTTG GTTAAAGCAA GGCCAAACTC	5280

AAAGGACATG CTCTCAAATC CCACCAGTGT TGAAACGACA TCAAAGGGAA CTTAGTGCTT	5340
TTCAATCAGA ACAAGAAGCA ACTGACTATG ATGATGCCAT CACCATTGAA ACAATCGAGG	5400
ATTTTGACAT TTACAGTGAG GACATAAAGC AAGGTCCCCG CAGCTTTCAA CAGAAAACAA	5460
GGCACTATTT TATTGCAGCT GTGGAACGAC TCTGGGACTA TGGGATGAGT ACATCTCATG	5520
TTCTACGAAA TAGGTATCAA AGTGACAATG TACCTCAGTT CAAGAAAGTA GTTTTCCAGG	5580
AATTTACTGA TGGCTCCTTT AGTCAGCCCT TATATCGTGG AGAATTAAAT GAACACCTGG	5640
GGTTGTTGGG CCCATATATA AGAGCAGAAG TTGAAGACAA CATTATGGTA ACTTTCAAAA	5700
ACCAGGCCTC CCGTCCCTAC TCCTTCTATT CTAGCCTCAT TTCTTATAAA GAAGATCAGA	5760
GAGGAGAAGA ACCTAGAAGA AACTTTGTCA AGCCTAATGA AACCAAAATT TATTTTTGGA	5820
AAGTACAACA TCATATGGCA CCCACAGAAG ATGAGTTTGA CTGCAAGGCC TGGGCTTATT	5880
TCTCTGATGT TGATCTTGAA AGAGATATGC ACTCGGGATT AATTGGACCC CTTCTGATTT	5940
GCCACGCGAA CACACTGAAT CCTGCTCATG GGAGACAAGT GTCAGTACAG GAATTTGCTC	6000
TGCTTTTCAC TATCTTTGAT GAGACCAAGA GCTGGTACTT CACTGAAAAC GTGAAAAGGA	6060
ACTGCAAGAC ACCCTGCAAT TTCCAGATGG AAGACCCAC TTTGAAAGAG AATTATCGCT	6120
TCCATGCAAT CAATGGTTAT GTAATGGATA CCCTACCAGG CTTAGTAATG GCTCAAGATC	6180
AAAGGATTGG ATGGTATCTT CTCAGCATGG GCAACAATGA GAACATCCAA TCTATTCAAT	6240
TCAGTGGACA TGTTTTCACT GTACGGAAAA AAGAGGAGTA TAAAATGGCA GTGTACAACC	6300
TCTACCCAGG TGTTTTTGAG ACTCTGGAAA TGATACCATC CAGAGCTGGA ATATGGCGAG	6360
TAGAATGCCT TATTGGCGAG CACTTACAGG CTGGGATGAG CACTCTTTTT CTGGTGTACA	6420
GCAAGCAGTG TCAGATTCCT CTTGGAATGG CTTCTGGAAG CATCCGTGAT TTCCAGATTA	6480
CAGCTTCAGG ACATTATGGA CAGTGGGCCC CAAACCTGGC AAGACTTCAT TATTCCGGAT	6540
CAATCAATGC CTGGAGTACC AAGGAGCCCT TTTCTTGGAT CAAGGTAGAT CTGTTGGCAC	6600
CAATGATTGT TCATGGCATC AAGACTCAGG GTGCTCGTCA GAAATTTTCC AGCCTTTATA	6660
TCTCTCAATT TATCATCATG TATAGCCTGG ATGGGAAGAA GTGGCTGAGT TATCAAGGAA	6720
ATTCCACTGG AACCTTAATG GTTTTCTTTG GCAATGTGGA CTCATCTGGG ATTAAGCATA	6780
ATAGTTTAA TCCTCCAATT ATTGCTCGAT ATATCCGTTT GCACCCCACT CATTCTAGCA	6840
TCCGTAGTAC TCTTCGCATG GAGTTGATGG GCTGTGATTT AAACAGTTGC AGCATACCAT	6900
TGGGAATGGA AAGTAAAGTA ATATCAGATA CACAAATCAC TGCCTCATCC TACTTCACCA	6960
ACATGTTTGC TACTTGGTCT CCTTCACAAG CTCGACTTCA CCTCCAGGGA AGGACTAATG	7020

CCTGGCGACC TCAGGTGAAT GATCCAAAAC AATGGTTGCA AGTGGACTTA CAAAAGACAA 7080
 TGAAAGTCAC TGGAATAATA ACCCAGGGAG TGAAATCTCT CTTTACCAGC ATGTTTGTGA 7140
 AAGAGTTCCT TATTTCCAGC AGTCAAGATG GCCATCACTG GACTCAAATT TTATACAATG 7200
 GCAAGGTAAA GGTTTTTCAG GGAATCAGG ACTCATCCAC ACCTATGATG AATTCTCTAG 7260
 ACCCACCATT ACTCACTCGC TATCTTCGAA TTCACCCCCA GATCTGGGAG CACCAAATTG 7320
 CTCTGAGGCT TGAGATTCTA GGATGTGAGG CCCAGCAGCA ATACTGAGGT AGCCTCTGCA 7380
 TCACCTGCTT ATTCCCCTTC CTCAGCTCAA AGATTGTCTT AATGTTTAT TGCTGTGAAG 7440
 AGACACTATG ACCATGGCAA CTCTTTATAA AATAAAGCAT TTAATCAGGG CTT 7493

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 6:

- 5 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 2319 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární
 10 (ii) TYP MOLEKULY: protein
 (iii) HYPOTETICKÁ: ano
 (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne
 15 (v) TYP FRAGMENTU: N-koncový
 (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:
 (A) ORGANISMUS: *Mus musculus*
 20 (x) INFORMACE K PUBLIKACI:
 (A) AUTOŘI: Elder, F.
 Lakich, D.
 Gitschier, J.
 25 (B) TITUL: Sequence of the Murine Factor VIII cDNA
 (C) ČASOPIS: Genomics
 (D) DÍL: 16
 (F) STRÁNKY: 374-379
 (G) DATUM: 1993
 30 (K) RELEVANTNÍ ZBYTKY V SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 6: OD
 1 DO 2319

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 6:

Met Gln Ile Ala Leu Phe Ala Cys Phe Phe Leu Ser Leu Phe Asn Phe
 1 5 10 15
 Cys Ser Ser Ala Ile Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
 20 25 30

Trp Asn Tyr Ile Gln Ser Asp Leu Leu Ser Val Leu His Thr Asp Ser
 35 40 45
 Arg Phe Leu Pro Arg Met Ser Thr Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Ile
 50 55 60
 Met Tyr Lys Lys Thr Val Phe Val Glu Tyr Lys Asp Gln Leu Phe Asn
 65 70 75 80
 Ile Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile
 85 90 95
 Trp Thr Glu Val His Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala
 100 105 110
 Ser His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala
 115 120 125
 Ser Glu Gly Asp Glu Tyr Glu Asp Gln Thr Ser Gln Met Glu Lys Glu
 130 135 140
 Asp Asp Lys Val Phe Pro Gly Glu Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val
 145 150 155 160
 Leu Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Pro Cys Leu Thr Tyr
 165 170 175
 Ser Tyr Met Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu
 180 185 190
 Ile Gly Ala Leu Leu Val Cys Lys Glu Gly Ser Leu Ser Lys Glu Arg
 195 200 205
 Thr Gln Met Leu Tyr Gln Phe Val Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu
 210 215 220
 Gly Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Asn Asp Ser Tyr Thr Gln Ser Met
 225 230 235 240
 Asp Ser Ala Ser Ala Arg Asp Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly
 245 250 255
 Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser
 260 265 270
 Val Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Ile His Ser
 275 280 285
 Ile Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Phe Val Arg Asn His Arg Gln Ala
 290 295 300
 Ser Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu
 305 310 315 320
 Ile Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Lys
 325 330 335

His Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu
 340 345 350
 Ser Gln Trp Gln Lys Lys Asn Asn Asn Glu Glu Met Glu Asp Tyr Asp
 355 360 365
 Asp Asp Leu Tyr Ser Glu Met Asp Met Phe Thr Leu Asp Tyr Asp Ser
 370 375 380
 Ser Pro Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys Tyr Pro Lys Thr
 385 390 395 400
 Trp Ile His Tyr Ile Ser Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415
 Ser Val Pro Thr Ser Asp Asn Gly Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Ser
 420 425 430
 Asn Gly Pro His Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Ile
 435 440 445
 Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Thr Ile Gln His Glu
 450 455 460
 Ser Gly Leu Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480
 Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495
 His Gly Ile Thr Asp Val Ser Pro Leu His Ala Arg Arg Leu Pro Arg
 500 505 510
 Gly Ile Lys His Val Lys Asp Leu Pro Ile His Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540
 Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Ile Asn Pro Glu Arg
 545 550 555 560
 Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575
 Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Met Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590
 Ile Leu Phe Ser Ile Phe Asp Glu Asn Gln Ser Trp Tyr Ile Thr Glu
 595 600 605
 Asn Met Gln Arg Phe Leu Pro Asn Ala Ala Lys Thr Gln Pro Gln Asp
 610 615 620
 Pro Gly Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640

Phe Asp Ser Leu Glu Leu Thr Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
 645 650 655
 His Ile Leu Ser Val Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Ile Phe Phe
 660 665 670
 Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
 675 680 685
 Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
 690 695 700
 Gly Leu Trp Val Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Lys Arg Gly
 705 710 715 720
 Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Ser Thr Ser Asp
 725 730 735
 Tyr Tyr Glu Glu Ile Tyr Glu Asp Ile Pro Thr Gln Leu Val Asn Glu
 740 745 750
 Asn Asn Val Ile Asp Pro Arg Ser Phe Phe Gln Asn Thr Asn His Pro
 755 760 765
 Asn Thr Arg Lys Lys Lys Phe Lys Asp Ser Thr Ile Pro Lys Asn Asp
 770 775 780
 Met Glu Lys Ile Glu Pro Gln Phe Glu Glu Ile Ala Glu Met Leu Lys
 785 790 795 800
 Val Gln Ser Val Ser Val Ser Asp Met Leu Met Leu Leu Gly Gln Ser
 805 810 815
 His Pro Thr Pro His Gly Leu Phe Leu Ser Asp Gly Gln Glu Ala Ile
 820 825 830
 Tyr Glu Ala Ile His Asp Asp His Ser Pro Asn Ala Ile Asp Ser Asn
 835 840 845
 Glu Gly Pro Ser Lys Val Thr Gln Leu Arg Pro Glu Ser His His Ser
 850 855 860
 Glu Lys Ile Val Phe Thr Pro Gln Pro Gly Leu Gln Leu Arg Ser Asn
 865 870 875 880
 Lys Ser Leu Glu Thr Thr Ile Glu Val Lys Trp Lys Lys Leu Gly Leu
 885 890 895
 Gln Val Ser Ser Leu Pro Ser Asn Leu Met Thr Thr Thr Ile Leu Ser
 900 905 910
 Asp Asn Leu Lys Ala Thr Phe Glu Lys Thr Asp Ser Ser Gly Phe Pro
 915 920 925
 Asp Met Pro Val His Ser Ser Ser Lys Leu Ser Thr Thr Ala Phe Gly
 930 935 940

Lys Lys Ala Tyr Ser Leu Val Gly Ser His Val Pro Leu Asn Ala Ser
 945 950 955 960
 Glu Glu Asn Ser Asp Ser Asn Ile Leu Asp Ser Thr Leu Met Tyr Ser
 965 970 975
 Gln Glu Ser Leu Pro Arg Asp Asn Ile Leu Ser Ile Glu Asn Asp Arg
 980 985 990
 Leu Leu Arg Glu Lys Arg Phe His Gly Ile Ala Leu Leu Thr Lys Asp
 995 1000 1005
 Asn Thr Leu Phe Lys Asp Asn Val Ser Leu Met Lys Thr Asn Lys Thr
 1010 1015 1020
 Tyr Asn His Ser Thr Thr Asn Glu Lys Leu His Thr Glu Ser Pro Thr
 1025 1030 1035 1040
 Ser Ile Glu Asn Ser Thr Thr Asp Leu Gln Asp Ala Ile Leu Lys Val
 1045 1050 1055
 Asn Ser Glu Ile Gln Glu Val Thr Ala Leu Ile His Asp Gly Thr Leu
 1060 1065 1070
 Leu Gly Lys Asn Ser Thr Tyr Leu Arg Leu Asn His Met Leu Asn Arg
 1075 1080 1085
 Thr Thr Ser Thr Lys Asn Lys Asp Ile Phe His Arg Lys Asp Glu Asp
 1090 1095 1100
 Pro Ile Pro Gln Asp Glu Glu Asn Thr Ile Met Pro Phe Ser Lys Met
 1105 1110 1115 1120
 Leu Phe Leu Ser Glu Ser Ser Asn Trp Phe Lys Lys Thr Asn Gly Asn
 1125 1130 1135
 Asn Ser Leu Asn Ser Glu Gln Glu His Ser Pro Lys Gln Leu Val Tyr
 1140 1145 1150
 Leu Met Phe Lys Lys Tyr Val Lys Asn Gln Ser Phe Leu Ser Glu Lys
 1155 1160 1165
 Asn Lys Val Thr Val Glu Gln Asp Gly Phe Thr Lys Asn Ile Gly Leu
 1170 1175 1180
 Lys Asp Met Ala Phe Pro His Asn Met Ser Ile Phe Leu Thr Thr Leu
 1185 1190 1195 1200
 Ser Asn Val His Glu Asn Gly Arg His Asn Gln Glu Lys Asn Ile Gln
 1205 1210 1215
 Glu Glu Ile Glu Lys Glu Ala Leu Ile Glu Glu Lys Val Val Leu Pro
 1220 1225 1230
 Gln Val His Glu Ala Thr Gly Ser Lys Asn Phe Leu Lys Asp Ile Leu
 1235 1240 1245

Ile Leu Gly Thr Arg Gln Asn Ile Ser Leu Tyr Glu Val His Val Pro
 1250 1255 1260
 Val Leu Gln Asn Ile Thr Ser Ile Asn Asn Ser Thr Asn Thr Val Gln
 1265 1270 1275 1280
 Ile His Met Glu His Phe Phe Lys Arg Arg Lys Asp Lys Glu Thr Asn
 1285 1290 1295
 Ser Glu Gly Leu Val Asn Lys Thr Arg Glu Met Val Lys Asn Tyr Pro
 1300 1305 1310
 Ser Gln Lys Asn Ile Thr Thr Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Gly Gln
 1315 1320 1325
 Phe Arg Leu Ser Thr Gln Trp Leu Lys Thr Ile Asn Cys Ser Thr Gln
 1330 1335 1340
 Cys Ile Ile Lys Gln Ile Asp His Ser Lys Glu Met Lys Lys Phe Ile
 1345 1350 1355 1360
 Thr Lys Ser Ser Leu Ser Asp Ser Ser Val Ile Lys Ser Thr Thr Gln
 1365 1370 1375
 Thr Asn Ser Ser Asp Ser His Ile Val Lys Thr Ser Ala Phe Pro Pro
 1380 1385 1390
 Ile Asp Leu Lys Arg Ser Pro Phe Gln Asn Lys Phe Ser His Val Gln
 1395 1400 1405
 Ala Ser Ser Tyr Ile Tyr Asp Phe Lys Thr Lys Ser Ser Arg Ile Gln
 1410 1415 1420
 Glu Ser Asn Asn Phe Leu Lys Glu Thr Lys Ile Asn Asn Pro Ser Leu
 1425 1430 1435 1440
 Ala Ile Leu Pro Trp Asn Met Phe Ile Asp Gln Gly Lys Phe Thr Ser
 1445 1450 1455
 Pro Gly Lys Ser Asn Thr Asn Ser Val Thr Tyr Lys Lys Arg Glu Asn
 1460 1465 1470
 Ile Ile Phe Leu Lys Pro Thr Leu Pro Glu Glu Ser Gly Lys Ile Glu
 1475 1480 1485
 Leu Leu Pro Gln Val Ser Ile Gln Glu Glu Glu Ile Leu Pro Thr Glu
 1490 1495 1500
 Thr Ser His Gly Ser Pro Gly His Leu Asn Leu Met Lys Glu Val Phe
 1505 1510 1515 1520
 Leu Gln Lys Ile Gln Gly Pro Thr Lys Trp Asn Lys Ala Lys Arg His
 1525 1530 1535
 Gly Glu Ser Ile Lys Gly Lys Thr Glu Ser Ser Lys Asn Thr Arg Ser
 1540 1545 1550

Lys Leu Leu Asn His His Ala Trp Asp Tyr His Tyr Ala Ala Gln Ile
 1555 1560 1565
 Pro Lys Asp Met Trp Lys Ser Lys Glu Lys Ser Pro Glu Ile Ile Ser
 1570 1575 1580
 Ile Lys Gln Glu Asp Thr Ile Leu Ser Leu Arg Pro His Gly Asn Ser
 1585 1590 1595 1600
 His Ser Ile Gly Ala Asn Glu Lys Gln Asn Trp Pro Gln Arg Glu Thr
 1605 1610 1615
 Thr Trp Val Lys Gln Gly Gln Thr Gln Arg Thr Cys Ser Gln Ile Pro
 1620 1625 1630
 Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Leu Ser Ala Phe Gln Ser Glu
 1635 1640 1645
 Gln Glu Ala Thr Asp Tyr Asp Asp Ala Ile Thr Ile Glu Thr Ile Glu
 1650 1655 1660
 Asp Phe Asp Ile Tyr Ser Glu Asp Ile Lys Gln Gly Pro Arg Ser Phe
 1665 1670 1675 1680
 Gln Gln Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp
 1685 1690 1695
 Asp Tyr Gly Met Ser Thr Ser His Val Leu Arg Asn Arg Tyr Gln Ser
 1700 1705 1710
 Asp Asn Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp
 1715 1720 1725
 Gly Ser Phe Ser Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu
 1730 1735 1740
 Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met
 1745 1750 1755 1760
 Val Thr Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser
 1765 1770 1775
 Leu Ile Ser Tyr Lys Glu Asp Gln Arg Gly Glu Glu Pro Arg Arg Asn
 1780 1785 1790
 Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Ile Tyr Phe Trp Lys Val Gln His
 1795 1800 1805
 His Met Ala Pro Thr Glu Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr
 1810 1815 1820
 Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Arg Asp Met His Ser Gly Leu Ile Gly
 1825 1830 1835 1840
 Pro Leu Leu Ile Cys His Ala Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg
 1845 1850 1855

Gln Val Ser Val Gln Glu Phe Ala Leu Leu Phe Thr Ile Phe Asp Glu
 1860 1865 1870
 Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Val Lys Arg Asn Cys Lys Thr
 1875 1880 1885
 Pro Cys Asn Phe Gln Met Glu Asp Pro Thr Leu Lys Glu Asn Tyr Arg
 1890 1895 1900
 Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Val Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val
 1905 1910 1915 1920
 Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Asn
 1925 1930 1935
 Asn Glu Asn Ile Gln Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val
 1940 1945 1950
 Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Val Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly
 1955 1960 1965
 Val Phe Glu Thr Leu Glu Met Ile Pro Ser Arg Ala Gly Ile Trp Arg
 1970 1975 1980
 Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu Gln Ala Gly Met Ser Thr Leu
 1985 1990 1995 2000
 Phe Leu Val Tyr Ser Lys Gln Cys Gln Ile Pro Leu Gly Met Ala Ser
 2005 2010 2015
 Gly Ser Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly His Tyr Gly Gln
 2020 2025 2030
 Trp Ala Pro Asn Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala
 2035 2040 2045
 Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala
 2050 2055 2060
 Pro Met Ile Val His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe
 2065 2070 2075 2080
 Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly
 2085 2090 2095
 Lys Lys Trp Leu Ser Tyr Gln Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val
 2100 2105 2110
 Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ser Phe Asn
 2115 2120 2125
 Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Ser Ser
 2130 2135 2140
 Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser
 2145 2150 2155 2160

Cys Ser Ile Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Val Ile Ser Asp Thr Gln
 2165 2170 2175
 Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro
 2180 2185 2190
 Ser Gln Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Thr Asn Ala Trp Arg Pro
 2195 2200 2205
 Gln Val Asn Asp Pro Lys Gln Trp Leu Gln Val Asp Leu Gln Lys Thr
 2210 2215 2220
 Met Lys Val Thr Gly Ile Ile Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Phe Thr
 2225 2230 2235 2240
 Ser Met Phe Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His
 2245 2250 2255
 His Trp Thr Gln Ile Leu Tyr Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly
 2260 2265 2270
 Asn Gln Asp Ser Ser Thr Pro Met Met Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu
 2275 2280 2285
 Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ile Trp Glu His Gln Ile
 2290 2295 2300
 Ala Leu Arg Leu Glu Ile Leu Gly Cys Glu Ala Gln Gln Gln Tyr
 2305 2310 2315

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 7:

5 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 40 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

10

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

15

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 7:

CCTTCCTTTA TCCAAATACG TAGATCAAGA GGAAATTGAC

40

20 (2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 8:

(1) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :

- (A) DÉLKA: 29 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

25

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

5 (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 8:

GTAGCGTTGC CAAGAAGCAC CCTAAGACG

29

10 (2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 37 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

15 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

20 (iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 9:

25 GAAGAGTAGT ACGAGTTATT TCTCTGGGTT CAATGAC

37

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 10:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

30 (A) DÉLKA: 33 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

35 (ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

40 (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 10:

CCTTTATCCA AATACGTAGC GTTTGCCAAG AAG

33

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 11:

45 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 19 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

5

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(ix) ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: různé znaky

10

(B) POZICE: 1..19

(D) DALŠÍ INFORMACE: /poznámka= „R je A nebo G a N je A, T, G nebo C.“

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 11:

AARCAATCCNA ARACNTGGG

19

15 (2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 12:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 25 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

20

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

25

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 12:

GCTCGCACTA GGGGGTCTTG AATTC

30

25

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 13:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 44 párů bází

35

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: obě

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

40

(A) DESCRIPTION: /desc = „oligonukleotidový primer, dvouvláknový od nukleotidů 37–44, 3' konec krátkého vlákna blokován aminoskupinou.“

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

45

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(ix) ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: různé znaky

(B) POZICE: 37..44

(D) DALŠÍ INFORMACE: /poznámka= „dvouvláknový v oblasti od nukleotidů 37–44, 3' konec je blokován aminoskupinou pro redukci nespecifického nasedání primerů.“

5 (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 13:

CTAATACGAC TCACTATAGG GCTCGAGCGG CCGCCCGGGC AGGT

44

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 14:

10 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 27 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

15

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

20 (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 14:

CCATCCTAAT ACGACTCACT ATAGGGC

27

25 (2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 15:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 24 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

30 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

35 (iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 15:

40 CCATTGACAT GAAGACCGTT TCTC

24

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 16:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

45 (A) DÉLKA: 23 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

50 (ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

5

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 16:

ACTCACTATA GGGCTCGAGC GGC

23

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 17:

10

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 24 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

15

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

20

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 17:

GGGTGCAAAG CGCTGACATC AGTG

24

25

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 18:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 50 párů bází

30

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

35

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

40

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 18:

CCTCTCGAGC CACCATGTCTG AGCCACCATG CAGCTAGAGC TCTCCACCTG

50

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 19:

45

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 31 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 19:

CGCGCGGCCG CGCATCTGGC AAAGCTGAGT T

31

10

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 20:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 27 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano

(ix) ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: různé znaky

(B) POZICE: 25..27

(D) DALŠÍ INFORMACE: /poznámka= „V pozici 25, R je A nebo G.“

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 20:

GAAATAAGCC CAGGCTTTGC AGTCRAA

27

35

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 21:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 22 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

40

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(ix) ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: různé znaky

(B) POZICE: 21..22

(D) DALŠÍ INFORMACE: /poznámka= „V pozici 22, N je A,G,C nebo T.“

50

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 21:

AGGAAATTCC ACTGGAACCT TN

22

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 22:

- 5 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 25 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární
- 10 (ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- 15 (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano
- (ix) ZNAKY:
 (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: různé znaky
 (B) POZICE: 1..25
- 20 (D) DALŠÍ INFORMACE: /poznámka= „V pozici 25, N je A,G,C nebo T.“

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 22:

CTGGGGGTGA ATTGAAGGT AGCGN

25

25 (2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 23:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 (A) DÉLKA: 23 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
- 30 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina
- 35 (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 23:

GAGTTCATCG GGAAGACCTG TTG

40

23

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 24:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
 45 (A) DÉLKA: 24 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární
- 50 (ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano

5

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 24:

ACAGCCCATC AACTCCATGC GAAG

24

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 25:

10

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 19 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

15

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

20

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 25:

TCAGGGCAAT CAGGACTCC

19

25

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 26:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 21 párů bází

30

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

35

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

40

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 26:

CCGTGGTGAA CGCTCTGGAC C

21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 27:

45

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 24 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 27:

GTAGAGGTCC TGTGCCTCGC AGCC

24

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 28:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 27 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(ix) ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: různé znaky

(B) POZICE: 1..27

(D) DALŠÍ INFORMACE: /poznámka= „S je G nebo C, K je G nebo T, R je A nebo G, a Y je C nebo T.“

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 28:

GTAGAGSTSC TGTGCCTCRC AKCCYAG

27

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 29:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 24 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 29:

CTTCGCATGG AGTTGATGGG CTGT

24

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 30:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 22 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 30:

AATCAGGACT CCTCCACCCC CG

22

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 31:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 20 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 31:

GGATCCACCC CACGAGCTGG

20

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 32:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 24 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 32:

CGCCCTGAGG CTCGAGGTTT TAGG

24

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 33:

5 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 22 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

10

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

15

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 33:

AATCAGGACT CCTCCACCCC CG

22

20 (2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 34:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 20 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

25

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

30

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ano

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 34:

CCTTGCAGGA ATTCGATTCA

35

20

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 35:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

40

(A) DÉLKA: 21 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: jednoduché

(D) TOPOLOGIE: lineární

45

(ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

50

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 35:

CCGTGGTGAA CGCTCTGGAC C

21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 36:

5

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 6402 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) TYP VLÁKNA: dvojité

10

(D) TOPOLOGIE: není relevantní

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA na mRNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

15

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANISMUS: Prase

20

(ix) ZNAKY:

(A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS

(B) POZICE: 1..6402

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 36:

ATG CAG CTA GAG CTC TCC ACC TGT GTC TTT CTG TGT CTC TTG CCA CTC	48
Met Gln Leu Glu Leu Ser Thr Cys Val Phe Leu Cys Leu Leu Pro Leu	
1 5 10 15	
GGC TTT AGT GCC ATC AGG AGA TAC TAC CTG GGC GCA GTG GAA CTG TCC	96
Gly Phe Ser Ala Ile Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser	
20 25 30	
TGG GAC TAC CGG CAA AGT GAA CTC CTC CGT GAG CTG CAC GTG GAC ACC	144
Trp Asp Tyr Arg Gln Ser Glu Leu Leu Arg Glu Leu His Val Asp Thr	
35 40 45	
AGA TTT CCT GCT ACA GCG CCA GGA GCT CTT CCG TTG GGC CCG TCA GTC	192
Arg Phe Pro Ala Thr Ala Pro Gly Ala Leu Pro Leu Gly Pro Ser Val	
50 55 60	
CTG TAC AAA AAG ACT GTG TTC GTA GAG TTC ACG GAT CAA CTT TTC AGC	240
Leu Tyr Lys Lys Thr Val Phe Val Glu Phe Thr Asp Gln Leu Phe Ser	
65 70 75 80	

25

GTT GCC AGG CCC AGG CCA CCA TGG ATG GGT CTG CTG GGT CCT ACC ATC Val Ala Arg Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile 85 90 95	288
CAG GCT GAG GTT TAC GAC ACG GTG GTC GTT ACC CTG AAG AAC ATG GCT Gln Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Thr Leu Lys Asn Met Ala 100 105 110	336
TCT CAT CCC GTT AGT CTT CAC GCT GTC GGC GTC TCC TTC TGG AAA TCT Ser His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Phe Trp Lys Ser 115 120 125	384
TCC GAA GGC GCT GAA TAT GAG GAT CAC ACC AGC CAA AGG GAG AAG GAA Ser Glu Gly Ala Glu Tyr Glu Asp His Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu 130 135 140	432
GAC GAT AAA GTC CTT CCC GGT AAA AGC CAA ACC TAC GTC TGG CAG GTC Asp Asp Lys Val Leu Pro Gly Lys Ser Gln Thr Tyr Val Trp Gln Val 145 150 155 160	480
CTG AAA GAA AAT GGT CCA ACA GCC TCT GAC CCA CCA TGT CTC ACC TAC Leu Lys Glu Asn Gly Pro Thr Ala Ser Asp Pro Pro Cys Leu Thr Tyr 165 170 175	528
TCA TAC CTG TCT CAC GTG GAC CTG GTG AAA GAC CTG AAT TCG GGC CTC Ser Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu 180 185 190	576
ATT GGA GCC CTG CTG GTT TGT AGA GAA GGG AGT CTG ACC AGA GAA AGG Ile Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Thr Arg Glu Arg 195 200 205	624
ACC CAG AAC CTG CAC GAA TTT GTA CTA CTT TTT GCT GTC TTT GAT GAA Thr Gln Asn Leu His Glu Phe Val Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu 210 215 220	672
GGG AAA AGT TGG CAC TCA GCA AGA AAT GAC TCC TGG ACA CGG GCC ATG Gly Lys Ser Trp His Ser Ala Arg Asn Asp Ser Trp Thr Arg Ala Met 225 230 235 240	720
GAT CCC GCA CCT GCC AGG GCC CAG CCT GCA ATG CAC ACA GTC AAT GGC Asp Pro Ala Pro Ala Arg Ala Gln Pro Ala Met His Thr Val Asn Gly 245 250 255	768
TAT GTC AAC AGG TCT CTG CCA GGT CTG ATC GGA TGT CAT AAG AAA TCA Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Lys Lys Ser 260 265 270	816
GTC TAC TGG CAC GTG ATT GGA ATG GGC ACC AGC CCG GAA GTG CAC TCC Val Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Ser Pro Glu Val His Ser 275 280 285	864
ATT TTT CTT GAA GGC CAC ACG TTT CTC GTG AGG CAC CAT CGC CAG GCT Ile Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg His His Arg Gln Ala 290 295 300	912

TCC TTG GAG ATC TCG CCA CTA ACT TTC CTC ACT GCT CAG ACA TTC CTG	960
Ser Leu Glu Ile Ser Pro Leu Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Phe Leu	
305 310 315 320	
ATG GAC CTT GGC CAG TTC CTA CTG TTT TGT CAT ATC TCT TCC CAC CAC	1008
Met Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His His	
325 330 335	
CAT GGT GGC ATG GAG GCT CAC GTC AGA GTA GAA AGC TGC GCC GAG GAG	1056
His Gly Gly Met Glu Ala His Val Arg Val Glu Ser Cys Ala Glu Glu	
340 345 350	
CCC CAG CTG CGG AGG AAA GCT GAT GAA GAG GAA GAT TAT GAT GAC AAT	1104
Pro Gln Leu Arg Arg Lys Ala Asp Glu Glu Glu Asp Tyr Asp Asp Asn	
355 360 365	
TTG TAC GAC TCG GAC ATG GAC GTG GTC CGG CTC GAT GGT GAC GAC GTG	1152
Leu Tyr Asp Ser Asp Met Asp Val Val Arg Leu Asp Gly Asp Asp Val	
370 375 380	
TCT CCC TTT ATC CAA ATC CGC TCG GTT GCC AAG AAG CAT CCC AAA ACC	1200
Ser Pro Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr	
385 390 395 400	
TGG GTG CAC TAC ATC TCT GCA GAG GAG GAG GAC TGG GAC TAC GCC CCC	1248
Trp Val His Tyr Ile Ser Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro	
405 410 415	
GCG GTC CCC AGC CCC AGT GAC AGA AGT TAT AAA AGT CTC TAC TTG AAC	1296
Ala Val Pro Ser Pro Ser Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Leu Tyr Leu Asn	
420 425 430	
AGT GGT CCT CAG CGA ATT GGT AGG AAA TAC AAA AAA GCT CGA TTC GTC	1344
Ser Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Ala Arg Phe Val	
435 440 445	
GCT TAC ACG GAT GTA ACA TTT AAG ACT CGT AAA GCT ATT CCG TAT GAA	1392
Ala Tyr Thr Asp Val Thr Phe Lys Thr Arg Lys Ala Ile Pro Tyr Glu	
450 455 460	
TCA GGA ATC CTG GGA CCT TTA CTT TAT GGA GAA GTT GGA GAC ACA CTT	1440
Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu	
465 470 475 480	
TTG ATT ATA TTT AAG AAT AAA GCG AGC CGA CCA TAT AAC ATC TAC CCT	1488
Leu Ile Ile Phe Lys Asn Lys Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro	
485 490 495	
CAT GGA ATC ACT GAT GTC AGC GCT TTG CAC CCA GGG AGA CTT CTA AAA	1536
His Gly Ile Thr Asp Val Ser Ala Leu His Pro Gly Arg Leu Leu Lys	
500 505 510	
GGT TGG AAA CAT TTG AAA GAC ATG CCA ATT CTG CCA GGA GAG ACT TTC	1584
Gly Trp Lys His Leu Lys Asp Met Pro Ile Leu Pro Gly Glu Thr Phe	
515 520 525	

AAG TAT AAA TGG ACA GTG ACT GTG GAA GAT GGG CCA ACC AAG TCC GAT Lys Tyr Lys Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp 530 535 540	1632
CCT CGG TGC CTG ACC CGC TAC TAC TCG AGC TCC ATT AAT CTA GAG AAA Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Ile Asn Leu Glu Lys 545 550 555 560	1680
GAT CTG GCT TCG GGA CTC ATT GGC CCT CTC CTC ATC TGC TAC AAA GAA Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu 565 570 575	1728
TCT GTA GAC CAA AGA GGA AAC CAG ATG ATG TCA GAC AAG AGA AAC GTC Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Met Met Ser Asp Lys Arg Asn Val 580 585 590	1776
ATC CTG TTT TCT GTA TTC GAT GAG AAT CAA AGC TGG TAC CTC GCA GAG Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Gln Ser Trp Tyr Leu Ala Glu 595 600 605	1824
AAT ATT CAG CGC TTC CTC CCC AAT CCG GAT GGA TTA CAG CCC CAG GAT Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Asp Gly Leu Gln Pro Gln Asp 610 615 620	1872
CCA GAG TTC CAA GCT TCT AAC ATC ATG CAC AGC ATC AAT GGC TAT GTT Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val 625 630 635 640	1920
TTT GAT AGC TTG CAG CTG TCG GTT TGT TTG CAC GAG GTG GCA TAC TGG Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp 645 650 655	1968
TAC ATT CTA AGT GTT GGA GCA CAG ACG GAC TTC CTC TCC GTC TTC TTC Tyr Ile Leu Ser Val Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe 660 665 670	2016
TCT GGC TAC ACC TTC AAA CAC AAA ATG GTC TAT GAA GAC ACA CTC ACC Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr 675 680 685	2064
CTG TTC CCC TTC TCA GGA GAA ACG GTC TTC ATG TCA ATG GAA AAC CCA Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro 690 695 700	2112
GGT CTC TGG GTC CTA GGG TGC CAC AAC TCA GAC TTG CGG AAC AGA GGG Gly Leu Trp Val Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Leu Arg Asn Arg Gly 705 710 715 720	2160
ATG ACA GCC TTA CTG AAG GTG TAT AGT TGT GAC AGG GAC ATT GGT GAT Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Tyr Ser Cys Asp Arg Asp Ile Gly Asp 725 730 735	2208
TAT TAT GAC AAC ACT TAT GAA GAT ATT CCA GGC TTC TTG CTG AGT GGA Tyr Tyr Asp Asn Thr Tyr Glu Asp Ile Pro Gly Phe Leu Leu Ser Gly 740 745 750	2256

AAG AAT GTC ATT GAA CCC AGA AGC TTT GCC CAG AAT TCA AGA CCC CCT Lys Asn Val Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ala Gln Asn Ser Arg Pro Pro 755 760 765	2304
AGT GCG AGC CAA AAG CAA TTC CAA ACC ATC ACA AGT CCA GAA GAT GAC Ser Ala Ser Gln Lys Gln Phe Gln Thr Ile Thr Ser Pro Glu Asp Asp 770 775 780	2352
GTG GAG CTT GAC CCG CAG TCT GGA GAG AGA ACC CAA GCA CTG GAA GAA Val Glu Leu Asp Pro Gln Ser Gly Glu Arg Thr Gln Ala Leu Glu Glu 785 790 795 800	2400
CTA AGT GTC CCC TCT GGT GAT GGG TCG ATG CTC TTG GGA CAG AAT CCT Leu Ser Val Pro Ser Gly Asp Gly Ser Met Leu Leu Gly Gln Asn Pro 805 810 815	2448
GCT CCA CAT GGC TCA TCC TCA TCT GAT CTT CAA GAA GCC AGG AAT GAG Ala Pro His Gly Ser Ser Ser Ser Asp Leu Gln Glu Ala Arg Asn Glu 820 825 830	2496
GCT GAT GAT TAT TTA CCT GGA GCA AGA GAA AGA AAC ACG GCC CCA TCC Ala Asp Asp Tyr Leu Pro Gly Ala Arg Glu Arg Asn Thr Ala Pro Ser 835 840 845	2544
GCA GCG GCA CGT CTC AGA CCA GAG CTG CAT CAC AGT GCC GAA AGA GTA Ala Ala Ala Arg Leu Arg Pro Glu Leu His His Ser Ala Glu Arg Val 850 855 860	2592
CTT ACT CCT GAG CCA GAG AAA GAG TTG AAG AAA CTT GAT TCA AAA ATG Leu Thr Pro Glu Pro Glu Lys Glu Leu Lys Lys Leu Asp Ser Lys Met 865 870 875 880	2640
TCT AGT TCA TCA GAC CTT CTA AAG ACT TCG CCA ACA ATT CCA TCA GAC Ser Ser Ser Ser Asp Leu Leu Lys Thr Ser Pro Thr Ile Pro Ser Asp 885 890 895	2688
ACG TTG TCA GCG GAG ACT GAA AGG ACA CAT TCC TTA GGC CCC CCA CAC Thr Leu Ser Ala Glu Thr Glu Arg Thr His Ser Leu Gly Pro Pro His 900 905 910	2736
CCG CAG GTT AAT TTC AGG AGT CAA TTA GGT GCC ATT GTA CTT GGC AAA Pro Gln Val Asn Phe Arg Ser Gln Leu Gly Ala Ile Val Leu Gly Lys 915 920 925	2784
AAT TCA TCT CAC TTT ATT GGG GCT GGT GTC CCT TTG GGC TCG ACT GAG Asn Ser Ser His Phe Ile Gly Ala Gly Val Pro Leu Gly Ser Thr Glu 930 935 940	2832
GAG GAT CAT GAA AGC TCC CTG GGA GAA AAT GTA TCA CCA GTG GAG AGT Glu Asp His Glu Ser Ser Leu Gly Glu Asn Val Ser Pro Val Glu Ser 945 950 955 960	2880
GAC GGG ATA TTT GAA AAG GAA AGA GCT CAT GGA CCT GCT TCA CTG ACC Asp Gly Ile Phe Glu Lys Glu Arg Ala His Gly Pro Ala Ser Leu Thr 965 970 975	2928

AAA GAC GAT GTT TTA TTT AAA GTT AAT ATC TCT TTG GTA AAG ACA AAC Lys Asp Asp Val Leu Phe Lys Val Asn Ile Ser Leu Val Lys Thr Asn 980 985 990	2976
AAG GCA CGA GTT TAC TTA AAA ACT AAT AGA AAG ATT CAC ATT GAT GAC Lys Ala Arg Val Tyr Leu Lys Thr Asn Arg Lys Ile His Ile Asp Asp 995 1000 1005	3024
GCA GCT TTA TTA ACT GAG AAT AGG GCA TCT GCA ACG TTT ATG GAC AAA Ala Ala Leu Leu Thr Glu Asn Arg Ala Ser Ala Thr Phe Met Asp Lys 1010 1015 1020	3072
AAT ACT ACA GCT TCG GGA TTA AAT CAT GTG TCA AAT TGG ATA AAA GGG Asn Thr Thr Ala Ser Gly Leu Asn His Val Ser Asn Trp Ile Lys Gly 1025 1030 1035 1040	3120
CCC CTT GGC AAG AAC CCC CTA AGC TCG GAG CGA GGC CCC AGT CCA GAG Pro Leu Gly Lys Asn Pro Leu Ser Ser Glu Arg Gly Pro Ser Pro Glu 1045 1050 1055	3168
CTT CTG ACA TCT TCA GGA TCA GGA AAA TCT GTG AAA GGT CAG AGT TCT Leu Leu Thr Ser Ser Gly Ser Gly Lys Ser Val Lys Gly Gln Ser Ser 1060 1065 1070	3216
GGG CAG GGG AGA ATA CGG GTG GCA GTG GAA GAG GAA GAA CTG AGC AAA Gly Gln Gly Arg Ile Arg Val Ala Val Glu Glu Glu Glu Leu Ser Lys 1075 1080 1085	3264
GGC AAA GAG ATG ATG CTT CCC AAC AGC GAG CTC ACC TTT CTC ACT AAC Gly Lys Glu Met Met Leu Pro Asn Ser Glu Leu Thr Phe Leu Thr Asn 1090 1095 1100	3312
TCG GCT GAT GTC CAA GGA AAC GAT ACA CAC AGT CAA GGA AAA AAG TCT Ser Ala Asp Val Gln Gly Asn Asp Thr His Ser Gln Gly Lys Lys Ser 1105 1110 1115 1120	3360
CGG GAA GAG ATG GAA AGG AGA GAA AAA TTA GTC CAA GAA AAA GTC GAC Arg Glu Glu Met Glu Arg Arg Glu Lys Leu Val Gln Glu Lys Val Asp 1125 1130 1135	3408
TTG CCT CAG GTG TAT ACA GCG ACT GGA ACT AAG AAT TTC CTG AGA AAC Leu Pro Gln Val Tyr Thr Ala Thr Gly Thr Lys Asn Phe Leu Arg Asn 1140 1145 1150	3456
ATT TTT CAC CAA AGC ACT GAG CCC AGT GTA GAA GGG TTT GAT CGG GGG Ile Phe His Gln Ser Thr Glu Pro Ser Val Glu Gly Phe Asp Gly Gly 1155 1160 1165	3504
TCA CAT GCG CCG GTG CCT CAA GAC AGC AGG TCA TTA AAT GAT TCG GCA Ser His Ala Pro Val Pro Gln Asp Ser Arg Ser Leu Asn Asp Ser Ala 1170 1175 1180	3552
GAG AGA GCA GAG ACT CAC ATA GCC CAT TTC TCA GCA ATT AGG GAA GAG Glu Arg Ala Glu Thr His Ile Ala His Phe Ser Ala Ile Arg Glu Glu 1185 1190 1195 1200	3600

GCA CCC TTG GAA GCC CCG GGA AAT CGA ACA GGT CCA GGT CCG AGG AGT Ala Pro Leu Glu Ala Pro Gly Asn Arg Thr Gly Pro Gly Pro Arg Ser 1205 1210 1215	3648
GCG GTT CCC CGC CGC GTT AAG CAG AGC TTG AAA CAG ATC AGA CTC CCG Ala Val Pro Arg Arg Val Lys Gln Ser Leu Lys Gln Ile Arg Leu Pro 1220 1225 1230	3696
CTA GAA GAA ATA AAG CCT GAA AGG GGG GTG GTT CTG AAT GCC ACC TCA Leu Glu Glu Ile Lys Pro Glu Arg Gly Val Val Leu Asn Ala Thr Ser 1235 1240 1245	3744
ACC CGG TGG TCT GAA AGC AGT CCT ATC TTA CAA GGA GCC AAA AGA AAT Thr Arg Trp Ser Glu Ser Ser Pro Ile Leu Gln Gly Ala Lys Arg Asn 1250 1255 1260	3792
AAC CTT TCT TTA CCT TTC CTG ACC TTG GAA ATG GCC GGA GGT CAA GGA Asn Leu Ser Leu Pro Phe Leu Thr Leu Glu Met Ala Gly Gly Gln Gly 1265 1270 1275 1280	3840
AAG ATC AGC GCC CTG GGG AAA AGT GCC GCA GGC CCG CTG GCG TCC GGG Lys Ile Ser Ala Leu Gly Lys Ser Ala Ala Gly Pro Leu Ala Ser Gly 1285 1290 1295	3888
AAG CTG GAG AAG GCT GTT CTC TCT TCA GCA GGC TTG TCT GAA GCA TCT Lys Leu Glu Lys Ala Val Leu Ser Ser Ala Gly Leu Ser Glu Ala Ser 1300 1305 1310	3936
GGC AAA GCT GAG TTT CTT CCT AAA GTT CGA GTT CAT CGG GAA GAC CTG Gly Lys Ala Glu Phe Leu Pro Lys Val Arg Val His Arg Glu Asp Leu 1315 1320 1325	3984
TTG CCT CAA AAA ACC AGC AAT GTT TCT TGC GCA CAC GGG GAT CTC GGC Leu Pro Gln Lys Thr Ser Asn Val Ser Cys Ala His Gly Asp Leu Gly 1330 1335 1340	4032
CAG GAG ATC TTC CTG CAG AAA ACA CGG GGA CCT GTT AAC CTG AAC AAA Gln Glu Ile Phe Leu Gln Lys Thr Arg Gly Pro Val Asn Leu Asn Lys 1345 1350 1355 1360	4080
GTA AAT AGA CCT GGA AGG ACT CCC TCC AAG CTT CTG GGT CCC CCG ATG Val Asn Arg Pro Gly Arg Thr Pro Ser Lys Leu Leu Gly Pro Pro Met 1365 1370 1375	4128
CCC AAA GAG TGG GAA TCC CTA GAG AAG TCA CCA AAA AGC ACA GCT CTC Pro Lys Glu Trp Glu Ser Leu Glu Lys Ser Pro Lys Ser Thr Ala Leu 1380 1385 1390	4176
AGG ACG AAA GAC ATC ATC AGT TTA CCC CTG GAC CGT CAC GAA AGC AAT Arg Thr Lys Asp Ile Ile Ser Leu Pro Leu Asp Arg His Glu Ser Asn 1395 1400 1405	4224
CAT TCA ATA GCA GCA AAA AAT GAA GGA CAA GCC GAG ACC CAA AGA GAA His Ser Ile Ala Ala Lys Asn Glu Gly Gln Ala Glu Thr Gln Arg Glu 1410 1415 1420	4272

GCC GCC TGG ACG AAG CAG GGA GGG CCT GGA AGG CTG TGC GCT CCA AAG Ala Ala Trp Thr Lys Gln Gly Gly Pro Gly Arg Leu Cys Ala Pro Lys 1425 1430 1435 1440	4320
CCT CCG GTC CTG CGA CGG CAT CAG AGG GAC ATA AGC CTT CCT ACT TTT Pro Pro Val Leu Arg Arg His Gln Arg Asp Ile Ser Leu Pro Thr Phe 1445 1450 1455	4368
CAG CCG GAG GAA GAC AAA ATG GAC TAT GAT GAT ATC TTC TCA ACT GAA Gln Pro Glu Glu Asp Lys Met Asp Tyr Asp Asp Ile Phe Ser Thr Glu 1460 1465 1470	4416
ACG AAG GGA GAA GAT TTT GAC ATT TAC GGT GAG GAT GAA AAT CAG GAC Thr Lys Gly Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Gly Glu Asp Glu Asn Gln Asp 1475 1480 1485	4464
CCT CGC AGC TTT CAG AAG AGA ACC CGA CAC TAT TTC ATT GCT GCG GTG Pro Arg Ser Phe Gln Lys Arg Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val 1490 1495 1500	4512
GAG CAG CTC TGG GAT TAC GGG ATG AGC GAA TCC CCC CGG GCG CTA AGA Glu Gln Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Glu Ser Pro Arg Ala Leu Arg 1505 1510 1515 1520	4560
AAC AGG GCT CAG AAC GGA GAG GTG CCT CGG TTC AAG AAG GTG GTC TTC Asn Arg Ala Gln Asn Gly Glu Val Pro Arg Phe Lys Lys Val Val Phe 1525 1530 1535	4608
CGG GAA TTT GCT GAC GGC TCC TTC ACG CAG CCG TCG TAC CGC GGG GAA Arg Glu Phe Ala Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Gly Glu 1540 1545 1550	4656
CTC AAC AAA CAC TTG GGG CTC TTG GGA CCC TAC ATC AGA GCG GAA GTT Leu Asn Lys His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val 1555 1560 1565	4704
GAA GAC AAC ATC ATG GTA ACT TTC AAA AAC CAG GCG TCT CGT CCC TAT Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr 1570 1575 1580	4752
TCC TTC TAC TCG AGC CTT ATT TCT TAT CCG GAT GAT CAG GAG CAA GGG Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Pro Asp Asp Gln Glu Gln Gly 1585 1590 1595 1600	4800
GCA GAA CCT CGA CAC AAC TTC GTC CAG CCA AAT GAA ACC AGA ACT TAC Ala Glu Pro Arg His Asn Phe Val Gln Pro Asn Glu Thr Arg Thr Tyr 1605 1610 1615	4848
TTT TGG AAA GTG CAG CAT CAC ATG GCA CCC ACA GAA GAC GAG TTT GAC Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Glu Asp Glu Phe Asp 1620 1625 1630	4896
TGC AAA GCC TGG GCC TAC TTT TCT GAT GTT GAC CTG GAA AAA GAT GTG Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val 1635 1640 1645	4944

CAC TCA GGC TTG ATC GGC CCC CTT CTG ATC TGC CGC GCC AAC ACC CTG His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Arg Ala Asn Thr Leu 1650 1655 1660	4992
AAC GCT GCT CAC GGT AGA CAA GTG ACC GTG CAA GAA TTT GCT CTG TTT Asn Ala Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe 1665 1670 1675 1680	5040
TTC ACT ATT TTT GAT GAG ACA AAG AGC TGG TAC TTC ACT GAA AAT GTG Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Val 1685 1690 1695	5088
GAA AGG AAC TGC CGG GCC CCC TGC CAC CTG CAG ATG GAG GAC CCC ACT Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys His Leu Gln Met Glu Asp Pro Thr 1700 1705 1710	5136
CTG AAA GAA AAC TAT CGC TTC CAT GCA ATC AAT GGC TAT GTG ATG GAT Leu Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Val Met Asp 1715 1720 1725	5184
ACA CTC CCT GGC TTA GTA ATG GCT CAG AAT CAA AGG ATC CGA TGG TAT Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asn Gln Arg Ile Arg Trp Tyr 1730 1735 1740	5232
CTG CTC AGC ATG GGC AGC AAT GAA AAT ATC CAT TCG ATT CAT TTT AGC Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser 1745 1750 1755 1760	5280
GGA CAC GTG TTC AGT GTA CGG AAA AAG GAG GAG TAT AAA ATG GCC GTG Gly His Val Phe Ser Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Val 1765 1770 1775	5328
TAC AAT CTC TAT CCG GGT GTC TTT GAG ACA GTG GAA ATG CTA CCG TCC Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser 1780 1785 1790	5376
AAA GTT GGA ATT TGG CGA ATA GAA TGC CTG ATT GGC GAG CAC CTG CAA Lys Val Gly Ile Trp Arg Ile Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu Gln 1795 1800 1805	5424
GCT GGG ATG AGC ACG ACT TTC CTG GTG TAC AGC AAG GAG TGT CAG GCT Ala Gly Met Ser Thr Thr Phe Leu Val Tyr Ser Lys Glu Cys Gln Ala 1810 1815 1820	5472
CCA CTG GGA ATG GCT TCT GGA CGC ATT AGA GAT TTT CAG ATC ACA GCT Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly Arg Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala 1825 1830 1835 1840	5520
TCA GGA CAG TAT GGA CAG TGG GCC CCA AAG CTG GCC AGA CTT CAT TAT Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr 1845 1850 1855	5568
TCC GGA TCA ATC AAT GCC TGG AGC ACC AAG GAT CCC CAC TCC TGG ATC Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Asp Pro His Ser Trp Ile 1860 1865 1870	5616

AAG GTG GAT CTG TTG GCA CCA ATG ATC ATT CAC GGC ATC ATG ACC CAG Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Met Thr Gln 1875 1880 1885	5664
GGT GCC CGT CAG AAG TTT TCC AGC CTC TAC ATC TCC CAG TTT ATC ATC Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile 1890 1895 1900	5712
ATG TAC AGT CTT GAC GGG AGG AAC TGG CAG AGT TAC CGA GGG AAT TCC Met Tyr Ser Leu Asp Gly Arg Asn Trp Gln Ser Tyr Arg Gly Asn Ser 1905 1910 1915 1920	5760
ACG GGC ACC TTA ATG GTC TTC TTT GGC AAT GTG GAC GCA TCT GGG ATT Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ala Ser Gly Ile 1925 1930 1935	5808
AAA CAC AAT ATT TTT AAC CCT CCG ATT GTG GCT CGG TAC ATC CGT TTG Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Val Ala Arg Tyr Ile Arg Leu 1940 1945 1950	5856
CAC CCA ACA CAT TAC AGC ATC CGC AGC ACT CTT CGC ATG GAG TTG ATG His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met 1955 1960 1965	5904
GGC TGT GAT TTA AAC AGT TGC AGC ATG CCC CTG GGA ATG CAG AAT AAA Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Gln Asn Lys 1970 1975 1980	5952
GCG ATA TCA GAC TCA CAG ATC ACG GCC TCC TCC CAC CTA AGC AAT ATA Ala Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Ala Ser Ser His Leu Ser Asn Ile 1985 1990 1995 2000	6000
TTT GCC ACC TGG TCT CCT TCA CAA GCC CGA CTT CAC CTC CAG GGG CGG Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Gln Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg 2005 2010 2015	6048
ACG AAT GCC TGG CGA CCC CGG GTG AGC AGC GCA GAG GAG TGG CTG CAG Thr Asn Ala Trp Arg Pro Arg Val Ser Ser Ala Glu Glu Trp Leu Gln 2020 2025 2030	6096
GTG GAC CTG CAG AAG ACG GTG AAG GTC ACA GGC ATC ACC ACC CAG GGC Val Asp Leu Gln Lys Thr Val Lys Val Thr Gly Ile Thr Thr Gln Gly 2035 2040 2045	6144
GTG AAG TCC CTG CTC AGC AGC ATG TAT GTG AAG GAG TTC CTC GTG TCC Val Lys Ser Leu Leu Ser Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Val Ser 2050 2055 2060	6192
AGT AGT CAG GAC GGC CGC CGC TGG ACC CTG TTT CTT CAG GAC GGC CAC Ser Ser Gln Asp Gly Arg Arg Trp Thr Leu Phe Leu Gln Asp Gly His 2065 2070 2075 2080	6240
ACG AAG GTT TTT CAG GGC AAT CAG GAC TCC TCC ACC CCC GTG GTG AAC Thr Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Ser Thr Pro Val Val Asn 2085 2090 2095	6288

GCT CTG GAC CCC CCG CTG TTC ACG CGC TAC CTG AGG ATC CAC CCC ACG 6336
 Ala Leu Asp Pro Pro Leu Phe Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Thr
 2100 2105 2110

AGC TGG GCG CAG CAC ATC GCC CTG AGG CTC GAG GTT CTA GGA TGT GAG 6384
 Ser Trp Ala Gln His Ile Ala Leu Arg Leu Glu Val Leu Gly Cys Glu
 2115 2120 2125

GCA CAG GAT CTC TAC TGA 6402
 Ala Gln Asp Leu Tyr *
 2130

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 37:

5 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 2134 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(D) TOPOLOGIE: lineární

10 (ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 37:

Met Gln Leu Glu Leu Ser Thr Cys Val Phe Leu Cys Leu Leu Pro Leu
 1 5 10 15

Gly Phe Ser Ala Ile Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
 20 25 30

Trp Asp Tyr Arg Gln Ser Glu Leu Leu Arg Glu Leu His Val Asp Thr
 35 40 45

Arg Phe Pro Ala Thr Ala Pro Gly Ala Leu Pro Leu Gly Pro Ser Val
 50 55 60

Leu Tyr Lys Lys Thr Val Phe Val Glu Phe Thr Asp Gln Leu Phe Ser
 65 70 75 80

Val Ala Arg Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile
 85 90 95

Gln Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Val Thr Leu Lys Asn Met Ala
 100 105 110

Ser His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Phe Trp Lys Ser
 115 120 125

Ser Glu Gly Ala Glu Tyr Glu Asp His Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu
 130 135 140

Asp Asp Lys Val Leu Pro Gly Lys Ser Gln Thr Tyr Val Trp Gln Val
 145 150 155 160

Leu Lys Glu Asn Gly Pro Thr Ala Ser Asp Pro Pro Cys Leu Thr Tyr
 165 170 175

Ser Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu
 180 185 190
 Ile Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Thr Arg Glu Arg
 195 200 205
 Thr Gln Asn Leu His Glu Phe Val Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu
 210 215 220
 Gly Lys Ser Trp His Ser Ala Arg Asn Asp Ser Trp Thr Arg Ala Met
 225 230 235 240
 Asp Pro Ala Pro Ala Arg Ala Gln Pro Ala Met His Thr Val Asn Gly
 245 250 255
 Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Lys Lys Ser
 260 265 270
 Val Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Ser Pro Glu Val His Ser
 275 280 285
 Ile Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg His His Arg Gln Ala
 290 295 300
 Ser Leu Glu Ile Ser Pro Leu Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Phe Leu
 305 310 315 320
 Met Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His His
 325 330 335
 His Gly Gly Met Glu Ala His Val Arg Val Glu Ser Cys Ala Glu Glu
 340 345 350
 Pro Gln Leu Arg Arg Lys Ala Asp Glu Glu Glu Asp Tyr Asp Asp Asn
 355 360 365
 Leu Tyr Asp Ser Asp Met Asp Val Val Arg Leu Asp Gly Asp Asp Val
 370 375 380
 Ser Pro Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
 385 390 395 400
 Trp Val His Tyr Ile Ser Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415
 Ala Val Pro Ser Pro Ser Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Leu Tyr Leu Asn
 420 425 430
 Ser Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Ala Arg Phe Val
 435 440 445
 Ala Tyr Thr Asp Val Thr Phe Lys Thr Arg Lys Ala Ile Pro Tyr Glu
 450 455 460
 Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Lys Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495
 His Gly Ile Thr Asp Val Ser Ala Leu His Pro Gly Arg Leu Leu Lys
 500 505 510
 Gly Trp Lys His Leu Lys Asp Met Pro Ile Leu Pro Gly Glu Thr Phe
 515 520 525
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540
 Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Ile Asn Leu Glu Lys
 545 550 555 560
 Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575
 Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Met Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590
 Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Gln Ser Trp Tyr Leu Ala Glu
 595 600 605
 Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Asp Gly Leu Gln Pro Gln Asp
 610 615 620
 Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640
 Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
 645 650 655
 Tyr Ile Leu Ser Val Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
 660 665 670
 Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
 675 680 685
 Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
 690 695 700
 Gly Leu Trp Val Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Leu Arg Asn Arg Gly
 705 710 715 720
 Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Tyr Ser Cys Asp Arg Asp Ile Gly Asp
 725 730 735
 Tyr Tyr Asp Asn Thr Tyr Glu Asp Ile Pro Gly Phe Leu Leu Ser Gly
 740 745 750
 Lys Asn Val Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ala Gln Asn Ser Arg Pro Pro
 755 760 765
 Ser Ala Ser Gln Lys Gln Phe Gln Thr Ile Thr Ser Pro Glu Asp Asp
 770 775 780

Val Glu Leu Asp Pro Gln Ser Gly Glu Arg Thr Gln Ala Leu Glu Glu
 785 790 795 800
 Leu Ser Val Pro Ser Gly Asp Gly Ser Met Leu Leu Gly Gln Asn Pro
 805 810 815
 Ala Pro His Gly Ser Ser Ser Ser Asp Leu Gln Glu Ala Arg Asn Glu
 820 825 830
 Ala Asp Asp Tyr Leu Pro Gly Ala Arg Glu Arg Asn Thr Ala Pro Ser
 835 840 845
 Ala Ala Ala Arg Leu Arg Pro Glu Leu His His Ser Ala Glu Arg Val
 850 855 860
 Leu Thr Pro Glu Pro Glu Lys Glu Leu Lys Lys Leu Asp Ser Lys Met
 865 870 875 880
 Ser Ser Ser Ser Asp Leu Leu Lys Thr Ser Pro Thr Ile Pro Ser Asp
 885 890 895
 Thr Leu Ser Ala Glu Thr Glu Arg Thr His Ser Leu Gly Pro Pro His
 900 905 910
 Pro Gln Val Asn Phe Arg Ser Gln Leu Gly Ala Ile Val Leu Gly Lys
 915 920 925
 Asn Ser Ser His Phe Ile Gly Ala Gly Val Pro Leu Gly Ser Thr Glu
 930 935 940
 Glu Asp His Glu Ser Ser Leu Gly Glu Asn Val Ser Pro Val Glu Ser
 945 950 955 960
 Asp Gly Ile Phe Glu Lys Glu Arg Ala His Gly Pro Ala Ser Leu Thr
 965 970 975
 Lys Asp Asp Val Leu Phe Lys Val Asn Ile Ser Leu Val Lys Thr Asn
 980 985 990
 Lys Ala Arg Val Tyr Leu Lys Thr Asn Arg Lys Ile His Ile Asp Asp
 995 1000 1005
 Ala Ala Leu Leu Thr Glu Asn Arg Ala Ser Ala Thr Phe Met Asp Lys
 1010 1015 1020
 Asn Thr Thr Ala Ser Gly Leu Asn His Val Ser Asn Trp Ile Lys Gly
 1025 1030 1035 1040
 Pro Leu Gly Lys Asn Pro Leu Ser Ser Glu Arg Gly Pro Ser Pro Glu
 1045 1050 1055
 Leu Leu Thr Ser Ser Gly Ser Gly Lys Ser Val Lys Gly Gln Ser Ser
 1060 1065 1070
 Gly Gln Gly Arg Ile Arg Val Ala Val Glu Glu Glu Glu Leu Ser Lys
 1075 1080 1085

Gly Lys Glu Met Met Leu Pro Asn Ser Glu Leu Thr Phe Leu Thr Asn
 1090 1095 1100
 Ser Ala Asp Val Gln Gly Asn Asp Thr His Ser Gln Gly Lys Lys Ser
 1105 1110 1115 1120
 Arg Glu Glu Met Glu Arg Arg Glu Lys Leu Val Gln Glu Lys Val Asp
 1125 1130 1135
 Leu Pro Gln Val Tyr Thr Ala Thr Gly Thr Lys Asn Phe Leu Arg Asn
 1140 1145 1150
 Ile Phe His Gln Ser Thr Glu Pro Ser Val Glu Gly Phe Asp Gly Gly
 1155 1160 1165
 Ser His Ala Pro Val Pro Gln Asp Ser Arg Ser Leu Asn Asp Ser Ala
 1170 1175 1180
 Glu Arg Ala Glu Thr His Ile Ala His Phe Ser Ala Ile Arg Glu Glu
 1185 1190 1195 1200
 Ala Pro Leu Glu Ala Pro Gly Asn Arg Thr Gly Pro Gly Pro Arg Ser
 1205 1210 1215
 Ala Val Pro Arg Arg Val Lys Gln Ser Leu Lys Gln Ile Arg Leu Pro
 1220 1225 1230
 Leu Glu Glu Ile Lys Pro Glu Arg Gly Val Val Leu Asn Ala Thr Ser
 1235 1240 1245
 Thr Arg Trp Ser Glu Ser Ser Pro Ile Leu Gln Gly Ala Lys Arg Asn
 1250 1255 1260
 Asn Leu Ser Leu Pro Phe Leu Thr Leu Glu Met Ala Gly Gly Gln Gly
 1265 1270 1275 1280
 Lys Ile Ser Ala Leu Gly Lys Ser Ala Ala Gly Pro Leu Ala Ser Gly
 1285 1290 1295
 Lys Leu Glu Lys Ala Val Leu Ser Ser Ala Gly Leu Ser Glu Ala Ser
 1300 1305 1310
 Gly Lys Ala Glu Phe Leu Pro Lys Val Arg Val His Arg Glu Asp Leu
 1315 1320 1325
 Leu Pro Gln Lys Thr Ser Asn Val Ser Cys Ala His Gly Asp Leu Gly
 1330 1335 1340
 Gln Glu Ile Phe Leu Gln Lys Thr Arg Gly Pro Val Asn Leu Asn Lys
 1345 1350 1355 1360
 Val Asn Arg Pro Gly Arg Thr Pro Ser Lys Leu Leu Gly Pro Pro Met
 1365 1370 1375
 Pro Lys Glu Trp Glu Ser Leu Glu Lys Ser Pro Lys Ser Thr Ala Leu
 1380 1385 1390

Arg Thr Lys Asp Ile Ile Ser Leu Pro Leu Asp Arg His Glu Ser Asn
 1395 1400 1405
 His Ser Ile Ala Ala Lys Asn Glu Gly Gln Ala Glu Thr Gln Arg Glu
 1410 1415 1420
 Ala Ala Trp Thr Lys Gln Gly Gly Pro Gly Arg Leu Cys Ala Pro Lys
 1425 1430 1435 1440
 Pro Pro Val Leu Arg Arg His Gln Arg Asp Ile Ser Leu Pro Thr Phe
 1445 1450 1455
 Gln Pro Glu Glu Asp Lys Met Asp Tyr Asp Asp Ile Phe Ser Thr Glu
 1460 1465 1470
 Thr Lys Gly Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Gly Glu Asp Glu Asn Gln Asp
 1475 1480 1485
 Pro Arg Ser Phe Gln Lys Arg Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val
 1490 1495 1500
 Glu Gln Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Glu Ser Pro Arg Ala Leu Arg
 1505 1510 1515 1520
 Asn Arg Ala Gln Asn Gly Glu Val Pro Arg Phe Lys Lys Val Val Phe
 1525 1530 1535
 Arg Glu Phe Ala Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Gly Glu
 1540 1545 1550
 Leu Asn Lys His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val
 1555 1560 1565
 Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr
 1570 1575 1580
 Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Pro Asp Asp Gln Glu Gln Gly
 1585 1590 1595 1600
 Ala Glu Pro Arg His Asn Phe Val Gln Pro Asn Glu Thr Arg Thr Tyr
 1605 1610 1615
 Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Glu Asp Glu Phe Asp
 1620 1625 1630
 Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val
 1635 1640 1645
 His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Arg Ala Asn Thr Leu
 1650 1655 1660
 Asn Ala Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe
 1665 1670 1675 1680
 Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Val
 1685 1690 1695

Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys His Leu Gln Met Glu Asp Pro Thr
 1700 1705 1710

Leu Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Val Met Asp
 1715 1720 1725

Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asn Gln Arg Ile Arg Trp Tyr
 1730 1735 1740

Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser
 1745 1750 1755 1760

Gly His Val Phe Ser Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Val
 1765 1770 1775

Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser
 1780 1785 1790

Lys Val Gly Ile Trp Arg Ile Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu Gln
 1795 1800 1805

Ala Gly Met Ser Thr Thr Phe Leu Val Tyr Ser Lys Glu Cys Gln Ala
 1810 1815 1820

Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly Arg Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala
 1825 1830 1835 1840

Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr
 1845 1850 1855

Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Asp Pro His Ser Trp Ile
 1860 1865 1870

Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Met Thr Gln
 1875 1880 1885

Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile
 1890 1895 1900

Met Tyr Ser Leu Asp Gly Arg Asn Trp Gln Ser Tyr Arg Gly Asn Ser
 1905 1910 1915 1920

Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ala Ser Gly Ile
 1925 1930 1935

Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Val Ala Arg Tyr Ile Arg Leu
 1940 1945 1950

His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met
 1955 1960 1965

Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Gln Asn Lys
 1970 1975 1980

Ala Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Ala Ser Ser His Leu Ser Asn Ile
 1985 1990 1995 2000

Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Gln Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg
 2005 2010 2015
 Thr Asn Ala Trp Arg Pro Arg Val Ser Ser Ala Glu Glu Trp Leu Gln
 2020 2025 2030
 Val Asp Leu Gln Lys Thr Val Lys Val Thr Gly Ile Thr Thr Gln Gly
 2035 2040 2045
 Val Lys Ser Leu Leu Ser Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Val Ser
 2050 2055 2060
 Ser Ser Gln Asp Gly Arg Arg Trp Thr Leu Phe Leu Gln Asp Gly His
 2065 2070 2075 2080
 Thr Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Ser Thr Pro Val Val Asn
 2085 2090 2095
 Ala Leu Asp Pro Pro Leu Phe Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Thr
 2100 2105 2110
 Ser Trp Ala Gln His Ile Ala Leu Arg Leu Glu Val Leu Gly Cys Glu
 2115 2120 2125
 Ala Gln Asp Leu Tyr *
 2130

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 38:

5 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 4334 párů bází
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) TYP VLÁKNA: dvojité
 (D) TOPOLOGIE: není relevantní

10

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA na mRNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

15

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

(C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: Faktor VIII postrádající doménu B

(ix) ZNAKY:

20

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
 (B) POZICE: 3..4334

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 38:

GA ATG CAG CTA GAG CTC TCC ACC TGT GTC TTT CTG TGT CTC TTG CCA
 Met Gln Leu Glu Leu Ser Thr Cys Val Phe Leu Cys Leu Leu Pro
 1 5 10 15

47

CTC GGC TTT AGT GCC ATC AGG AGA TAC TAC CTG GGC GCA GTG GAA CTG Leu Gly Phe Ser Ala Ile Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu 20 25 30	95
TCC TGG GAC TAC CGG CAA AGT GAA CTC CTC CGT GAG CTG CAC GTG GAC Ser Trp Asp Tyr Arg Gln Ser Glu Leu Leu Arg Glu Leu His Val Asp 35 40 45	143
ACC AGA TTT CCT GCT ACA GCG CCA GGA GCT CTT CCG TTG GGC CCG TCA Thr Arg Phe Pro Ala Thr Ala Pro Gly Ala Leu Pro Leu Gly Pro Ser 50 55 60	191
GTC CTG TAC AAA AAG ACT GTG TTC GTA GAG TTC ACG GAT CAA CTT TTC Val Leu Tyr Lys Lys Thr Val Phe Val Glu Phe Thr Asp Gln Leu Phe 65 70 75	239
AGC GTT GCC AGG CCC AGG CCA CCA TGG ATG GGT CTG CTG GGT CCT ACC Ser Val Ala Arg Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr 80 85 90 95	287
ATC CAG GCT GAG GTT TAC GAC ACG GTG GTC GTT ACC CTG AAG AAC ATG Ile Gln Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Val Thr Leu Lys Asn Met 100 105 110	335
GCT TCT CAT CCC GTT AGT CTT CAC GCT GTC GGC GTC TCC TTC TGG AAA Ala Ser His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Phe Trp Lys 115 120 125	383
TCT TCC GAA GGC GCT GAA TAT GAG GAT CAC ACC AGC CAA AGG GAG AAG Ser Ser Glu Gly Ala Glu Tyr Glu Asp His Thr Ser Gln Arg Glu Lys 130 135 140	431
GAA GAC GAT AAA GTC CTT CCC GGT AAA AGC CAA ACC TAC GTC TGG CAG Glu Asp Asp Lys Val Leu Pro Gly Lys Ser Gln Thr Tyr Val Trp Gln 145 150 155	479
GTC CTG AAA GAA AAT GGT CCA ACA GCC TCT GAC CCA CCA TGT CTC ACC Val Leu Lys Glu Asn Gly Pro Thr Ala Ser Asp Pro Pro Cys Leu Thr 160 165 170 175	527
TAC TCA TAC CTG TCT CAC GTG GAC CTG GTG AAA GAC CTG AAT TCG GGC Tyr Ser Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly 180 185 190	575
CTC ATT GGA GCC CTG CTG GTT TGT AGA GAA GGG AGT CTG ACC AGA GAA Leu Ile Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Thr Arg Glu 195 200 205	623
AGG ACC CAG AAC CTG CAC GAA TTT GTA CTA CTT TTT GCT GTC TTT GAT Arg Thr Gln Asn Leu His Glu Phe Val Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp 210 215 220	671
GAA GGG AAA AGT TGG CAC TCA GCA AGA AAT GAC TCC TGG ACA CGG GCC Glu Gly Lys Ser Trp His Ser Ala Arg Asn Asp Ser Trp Thr Arg Ala 225 230 235	719

ATG GAT CCC GCA CCT GCC AGG GCC CAG CCT GCA ATG CAC ACA GTC AAT	767
Met Asp Pro Ala Pro Ala Arg Ala Gln Pro Ala Met His Thr Val Asn	
240 245 250 255	
GGC TAT GTC AAC AGG TCT CTG CCA GGT CTG ATC GGA TGT CAT AAG AAA	815
Gly Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Lys Lys	
260 265 270	
TCA GTC TAC TGG CAC GTG ATT GGA ATG GGC ACC AGC CCG GAA GTG CAC	863
Ser Val Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Ser Pro Glu Val His	
275 280 285	
TCC ATT TTT CTT GAA GGC CAC ACG TTT CTC GTG AGG CAC CAT CGC CAG	911
Ser Ile Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg His His Arg Gln	
290 295 300	
GCT TCC TTG GAG ATC TCG CCA CTA ACT TTC CTC ACT GCT CAG ACA TTC	959
Ala Ser Leu Glu Ile Ser Pro Leu Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Phe	
305 310 315	
CTG ATG GAC CTT GGC CAG TTC CTA CTG TTT TGT CAT ATC TCT TCC CAC	1007
Leu Met Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His	
320 325 330 335	
CAC CAT GGT GGC ATG GAG GCT CAC GTC AGA GTA GAA AGC TGC GCC GAG	1055
His His Gly Gly Met Glu Ala His Val Arg Val Glu Ser Cys Ala Glu	
340 345 350	
GAG CCC CAG CTG CGG AGG AAA GCT GAT GAA GAG GAA GAT TAT GAT GAC	1103
Glu Pro Gln Leu Arg Arg Lys Ala Asp Glu Glu Glu Asp Tyr Asp Asp	
355 360 365	
AAT TTG TAC GAC TCG GAC ATG GAC GTG GTC CGG CTC GAT GGT GAC GAC	1151
Asn Leu Tyr Asp Ser Asp Met Asp Val Val Arg Leu Asp Gly Asp Asp	
370 375 380	
GTG TCT CCC TTT ATC CAA ATC CGC TCG GTT GCC AAG AAG CAT CCC AAA	1199
Val Ser Pro Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys	
385 390 395	
ACC TGG GTG CAC TAC ATC TCT GCA GAG GAG GAG GAC TGG GAC TAC GCC	1247
Thr Trp Val His Tyr Ile Ser Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala	
400 405 410 415	
CCC GCG GTC CCC AGC CCC AGT GAC AGA AGT TAT AAA AGT CTC TAC TTG	1295
Pro Ala Val Pro Ser Pro Ser Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Leu Tyr Leu	
420 425 430	
AAC AGT GGT CCT CAG CGA ATT GGT AGG AAA TAC AAA AAA GCT CGA TTC	1343
Asn Ser Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Ala Arg Phe	
435 440 445	
GTC GCT TAC ACG GAT GTA ACA TTT AAG ACT CGT AAA GCT ATT CCG TAT	1391
Val Ala Tyr Thr Asp Val Thr Phe Lys Thr Arg Lys Ala Ile Pro Tyr	
450 455 460	

GAA TCA GGA ATC CTG GGA CCT TTA CTT TAT GGA GAA GTT GGA GAC ACA Glu Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr 465 470 475	1439
CTT TTG ATT ATA TTT AAG AAT AAA GCG AGC CGA CCA TAT AAC ATC TAC Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Lys Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr 480 485 490 495	1487
CCT CAT GGA ATC ACT GAT GTC AGC GCT TTG CAC CCA GGG AGA CTT CTA Pro His Gly Ile Thr Asp Val Ser Ala Leu His Pro Gly Arg Leu Leu 500 505 510	1535
AAA GGT TGG AAA CAT TTG AAA GAC ATG CCA ATT CTG CCA GGA GAG ACT Lys Gly Trp Lys His Leu Lys Asp Met Pro Ile Leu Pro Gly Glu Thr 515 520 525	1583
TTC AAG TAT AAA TGG ACA GTG ACT GTG GAA GAT GGG CCA ACC AAG TCC Phe Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser 530 535 540	1631
GAT CCT CGG TGC CTG ACC CGC TAC TAC TCG AGC TCC ATT AAT CTA GAG Asp Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Ile Asn Leu Glu 545 550 555	1679
AAA GAT CTG GCT TCG GGA CTC ATT GGC CCT CTC CTC ATC TGC TAC AAA Lys Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys 560 565 570 575	1727
GAA TCT GTA GAC CAA AGA GGA AAC CAG ATG ATG TCA GAC AAG AGA AAC Glu Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Met Met Ser Asp Lys Arg Asn 580 585 590	1775
GTC ATC CTG TTT TCT GTA TTC GAT GAG AAT CAA AGC TGG TAC CTC GCA Val Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Gln Ser Trp Tyr Leu Ala 595 600 605	1823
GAG AAT ATT CAG CGC TTC CTC CCC AAT CCG GAT GGA TTA CAG CCC CAG Glu Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Asp Gly Leu Gln Pro Gln 610 615 620	1871
GAT CCA GAG TTC CAA GCT TCT AAC ATC ATG CAC AGC ATC AAT GGC TAT Asp Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr 625 630 635	1919
GTT TTT GAT AGC TTG CAG CTG TCG GTT TGT TTG CAC GAG GTG GCA TAC Val Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr 640 645 650 655	1967
TGG TAC ATT CTA AGT GTT GGA GCA CAG ACG GAC TTC CTC TCC GTC TTC Trp Tyr Ile Leu Ser Val Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe 660 665 670	2015
TTC TCT GGC TAC ACC TTC AAA CAC AAA ATG GTC TAT GAA GAC ACA CTC Phe Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu 675 680 685	2063

ACC CTG TTC CCC TTC TCA GGA GAA ACG GTC TTC ATG TCA ATG GAA AAC Thr Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn 690 695 700	2111
CCA GGT CTC TGG GTC CTA GGG TGC CAC AAC TCA GAC TTG CGG AAC AGA Pro Gly Leu Trp Val Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Leu Arg Asn Arg 705 710 715	2159
GGG ATG ACA GCC TTA CTG AAG GTG TAT AGT TGT GAC AGG GAC ATT GGT Gly Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Tyr Ser Cys Asp Arg Asp Ile Gly 720 725 730 735	2207
GAT TAT TAT GAC AAC ACT TAT GAA GAT ATT CCA GGC TTC TTG CTG AGT Asp Tyr Tyr Asp Asn Thr Tyr Glu Asp Ile Pro Gly Phe Leu Leu Ser 740 745 750	2255
GGA AAG AAT GTC ATT GAA CCC AGA GAC ATA AGC CTT CCT ACT TTT CAG Gly Lys Asn Val Ile Glu Pro Arg Asp Ile Ser Leu Pro Thr Phe Gln 755 760 765	2303
CCG GAG GAA GAC AAA ATG GAC TAT GAT GAT ATC TTC TCA ACT GAA ACG Pro Glu Glu Asp Lys Met Asp Tyr Asp Asp Ile Phe Ser Thr Glu Thr 770 775 780	2351
AAG GGA GAA GAT TTT GAC ATT TAC GGT GAG GAT GAA AAT CAG GAC CCT Lys Gly Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Gly Glu Asp Glu Asn Gln Asp Pro 785 790 795	2399
CGC AGC TTT CAG AAG AGA ACC CGA CAC TAT TTC ATT GCT GCG GTG GAG Arg Ser Phe Gln Lys Arg Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu 800 805 810 815	2447
CAG CTC TGG GAT TAC GGG ATG AGC GAA TCC CCC CGG GCG CTA AGA AAC Gln Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Glu Ser Pro Arg Ala Leu Arg Asn 820 825 830	2495
AGG GCT CAG AAC GGA GAG GTG CCT CGG TTC AAG AAG GTG GTC TTC CGG Arg Ala Gln Asn Gly Glu Val Pro Arg Phe Lys Lys Val Val Phe Arg 835 840 845	2543
GAA TTT GCT GAC GGC TCC TTC ACG CAG CCG TCG TAC CGC GGG GAA CTC Glu Phe Ala Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Gly Glu Leu 850 855 860	2591
AAC AAA CAC TTG GGG CTC TTG GGA CCC TAC ATC AGA GCG GAA GTT GAA Asn Lys His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu 865 870 875	2639
GAC AAC ATC ATG GTA ACT TTC AAA AAC CAG GCG TCT CGT CCC TAT TCC Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser 880 885 890 895	2687
TTC TAC TCG AGC CTT ATT TCT TAT CCG GAT GAT CAG GAG CAA GGG GCA Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Pro Asp Asp Gln Glu Gln Gly Ala 900 905 910	2735

GAA CCT CGA CAC AAC TTC GTC CAG CCA AAT GAA ACC AGA ACT TAC TTT Glu Pro Arg His Asn Phe Val Gln Pro Asn Glu Thr Arg Thr Tyr Phe 915 920 925	2783
TGG AAA GTG CAG CAT CAC ATG GCA CCC ACA GAA GAC GAG TTT GAC TGC Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Glu Asp Glu Phe Asp Cys 930 935 940	2831
AAA GCC TGG GCC TAC TTT TCT GAT GTT GAC CTG GAA AAA GAT GTG CAC Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His 945 950 955	2879
TCA GGC TTG ATC GGC CCC CTT CTG ATC TGC CGC GCC AAC ACC CTG AAC Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Arg Ala Asn Thr Leu Asn 960 965 970 975	2927
GCT GCT CAC GGT AGA CAA GTG ACC GTG CAA GAA TTT GCT CTG TTT TTC Ala Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe 980 985 990	2975
ACT ATT TTT GAT GAG ACA AAG AGC TGG TAC TTC ACT GAA AAT GTG GAA Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Val Glu 995 1000 1005	3023
AGG AAC TGC CGG GCC CCC TGC CAC CTG CAG ATG GAG GAC CCC ACT CTG Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys His Leu Gln Met Glu Asp Pro Thr Leu 1010 1015 1020	3071
AAA GAA AAC TAT CGC TTC CAT GCA ATC AAT GGC TAT GTG ATG GAT ACA Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Val Met Asp Thr 1025 1030 1035	3119
CTC CCT GGC TTA GTA ATG GCT CAG AAT CAA AGG ATC CGA TGG TAT CTG Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asn Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu 1040 1045 1050 1055	3167
CTC AGC ATG GGC AGC AAT GAA AAT ATC CAT TCG ATT CAT TTT AGC GGA Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly 1060 1065 1070	3215
CAC GTG TTC AGT GTA CGG AAA AAG GAG GAG TAT AAA ATG GCC GTG TAC His Val Phe Ser Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Val Tyr 1075 1080 1085	3263
AAT CTC TAT CCG GGT GTC TTT GAG ACA GTG GAA ATG CTA CCG TCC AAA Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys 1090 1095 1100	3311
GTT GGA ATT TGG CGA ATA GAA TGC CTG ATT GGC GAG CAC CTG CAA GCT Val Gly Ile Trp Arg Ile Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu Gln Ala 1105 1110 1115	3359
GGG ATG AGC ACG ACT TTC CTG GTG TAC AGC AAG GAG TGT CAG GCT CCA Gly Met Ser Thr Thr Phe Leu Val Tyr Ser Lys Glu Cys Gln Ala Pro 1120 1125 1130 1135	3407

CTG GGA ATG GCT TCT GGA CGC ATT AGA GAT TTT CAG ATC ACA GCT TCA Leu Gly Met Ala Ser Gly Arg Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser 1140 1145 1150	3455
GGA CAG TAT GGA CAG TGG GCC CCA AAG CTG GCC AGA CTT CAT TAT TCC Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser 1155 1160 1165	3503
GGA TCA ATC AAT GCC TGG AGC ACC AAG GAT CCC CAC TCC TGG ATC AAG Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Asp Pro His Ser Trp Ile Lys 1170 1175 1180	3551
GTG GAT CTG TTG GCA CCA ATG ATC ATT CAC GGC ATC ATG ACC CAG GGT Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Met Thr Gln Gly 1185 1190 1195	3599
GCC CGT CAG AAG TTT TCC AGC CTC TAC ATC TCC CAG TTT ATC ATC ATG Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met 1200 1205 1210 1215	3647
TAC AGT CTT GAC GGG AGG AAC TGG CAG AGT TAC CGA GGG AAT TCC ACG Tyr Ser Leu Asp Gly Arg Asn Trp Gln Ser Tyr Arg Gly Asn Ser Thr 1220 1225 1230	3695
GGC ACC TTA ATG GTC TTC TTT GGC AAT GTG GAC GCA TCT GGG ATT AAA Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ala Ser Gly Ile Lys 1235 1240 1245	3743
CAC AAT ATT TTT AAC CCT CCG ATT GTG GCT CGG TAC ATC CGT TTG CAC His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Val Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His 1250 1255 1260	3791
CCA ACA CAT TAC AGC ATC CGC AGC ACT CTT CGC ATG GAG TTG ATG GGC Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly 1265 1270 1275	3839
TGT GAT TTA AAC AGT TGC AGC ATG CCC CTG GGA ATG CAG AAT AAA GCG Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Gln Asn Lys Ala 1280 1285 1290 1295	3887
ATA TCA GAC TCA CAG ATC ACG GCC TCC TCC CAC CTA AGC AAT ATA TTT Ile Ser Asp Ser Gln Ile Thr Ala Ser Ser His Leu Ser Asn Ile Phe 1300 1305 1310	3935
GCC ACC TGG TCT CCT TCA CAA GCC CGA CTT CAC CTC CAG GGG CGG ACG Ala Thr Trp Ser Pro Ser Gln Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Thr 1315 1320 1325	3983
AAT GCC TGG CGA CCC CGG GTG AGC AGC GCA GAG GAG TGG CTG CAG GTG Asn Ala Trp Arg Pro Arg Val Ser Ser Ala Glu Glu Trp Leu Gln Val 1330 1335 1340	4031
GAC CTG CAG AAG ACG GTG AAG GTC ACA GGC ATC ACC ACC CAG GGC GTG Asp Leu Gln Lys Thr Val Lys Val Thr Gly Ile Thr Thr Gln Gly Val 1345 1350 1355	4079

AAG TCC CTG CTC AGC AGC ATG TAT GTG AAG GAG TTC CTC GTG TCC AGT	4127
Lys Ser Leu Leu Ser Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Val Ser Ser	
1360 1365 1370 1375	
AGT CAG GAC GGC CGC CGC TGG ACC CTG TTT CTT CAG GAC GGC CAC ACG	4175
Ser Gln Asp Gly Arg Arg Trp Thr Leu Phe Leu Gln Asp Gly His Thr	
1380 1385 1390	
AAG GTT TTT CAG GGC AAT CAG GAC TCC TCC ACC CCC GTG GTG AAC GCT	4223
Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Ser Thr Pro Val Val Asn Ala	
1395 1400 1405	
CTG GAC CCC CCG CTG TTC ACG CGC TAC CTG AGG ATC CAC CCC ACG AGC	4271
Leu Asp Pro Pro Leu Phe Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Thr Ser	
1410 1415 1420	
TGG GCG CAG CAC ATC GCC CTG AGG CTC GAG GTT CTA GGA TGT GAG GCA	4319
Trp Ala Gln His Ile Ala Leu Arg Leu Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala	
1425 1430 1435	
CAG GAT CTC TAC TGA	4334
Gln Asp Leu Tyr *	
1440	

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 39:

5 (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 1444 aminokyselin

(B) TYP: aminokyselina

(D) TOPOLOGIE: lineární

10 (ii) TYP MOLEKULY: protein

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 39:

Met Gln Leu Glu Leu Ser Thr Cys Val Phe Leu Cys Leu Leu Pro Leu	
1 5 10 15	
Gly Phe Ser Ala Ile Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser	
20 25 30	
Trp Asp Tyr Arg Gln Ser Glu Leu Leu Arg Glu Leu His Val Asp Thr	
35 40 45	
Arg Phe Pro Ala Thr Ala Pro Gly Ala Leu Pro Leu Gly Pro Ser Val	
50 55 60	
Leu Tyr Lys Lys Thr Val Phe Val Glu Phe Thr Asp Gln Leu Phe Ser	
65 70 75 80	
Val Ala Arg Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile	
85 90 95	
Gln Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Val Thr Leu Lys Asn Met Ala	
100 105 110	

Ser His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Phe Trp Lys Ser
 115 120 125
 Ser Glu Gly Ala Glu Tyr Glu Asp His Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu
 130 135 140
 Asp Asp Lys Val Leu Pro Gly Lys Ser Gln Thr Tyr Val Trp Gln Val
 145 150 155 160
 Leu Lys Glu Asn Gly Pro Thr Ala Ser Asp Pro Pro Cys Leu Thr Tyr
 165 170 175
 Ser Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu
 180 185 190
 Ile Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Thr Arg Glu Arg
 195 200 205
 Thr Gln Asn Leu His Glu Phe Val Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu
 210 215 220
 Gly Lys Ser Trp His Ser Ala Arg Asn Asp Ser Trp Thr Arg Ala Met
 225 230 235 240
 Asp Pro Ala Pro Ala Arg Ala Gln Pro Ala Met His Thr Val Asn Gly
 245 250 255
 Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Lys Lys Ser
 260 265 270
 Val Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Ser Pro Glu Val His Ser
 275 280 285
 Ile Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg His His Arg Gln Ala
 290 295 300
 Ser Leu Glu Ile Ser Pro Leu Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Phe Leu
 305 310 315 320
 Met Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His His
 325 330 335
 His Gly Gly Met Glu Ala His Val Arg Val Glu Ser Cys Ala Glu Glu
 340 345 350
 Pro Gln Leu Arg Arg Lys Ala Asp Glu Glu Glu Asp Tyr Asp Asp Asn
 355 360 365
 Leu Tyr Asp Ser Asp Met Asp Val Val Arg Leu Asp Gly Asp Asp Val
 370 375 380
 Ser Pro Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
 385 390 395 400
 Trp Val His Tyr Ile Ser Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415

Ala Val Pro Ser Pro Ser Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Leu Tyr Leu Asn
 420 425 430
 Ser Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Ala Arg Phe Val
 435 440 445
 Ala Tyr Thr Asp Val Thr Phe Lys Thr Arg Lys Ala Ile Pro Tyr Glu
 450 455 460
 Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480
 Leu Ile Ile Phe Lys Asn Lys Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495
 His Gly Ile Thr Asp Val Ser Ala Leu His Pro Gly Arg Leu Leu Lys
 500 505 510
 Gly Trp Lys His Leu Lys Asp Met Pro Ile Leu Pro Gly Glu Thr Phe
 515 520 525
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540
 Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Ile Asn Leu Glu Lys
 545 550 555 560
 Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575
 Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Met Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590
 Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Gln Ser Trp Tyr Leu Ala Glu
 595 600 605
 Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Asp Gly Leu Gln Pro Gln Asp
 610 615 620
 Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640
 Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
 645 650 655
 Tyr Ile Leu Ser Val Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
 660 665 670
 Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
 675 680 685
 Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
 690 695 700
 Gly Leu Trp Val Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Leu Arg Asn Arg Gly
 705 710 715 720

Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Tyr Ser Cys Asp Arg Asp Ile Gly Asp
 725 730 735
 Tyr Tyr Asp Asn Thr Tyr Glu Asp Ile Pro Gly Phe Leu Leu Ser Gly
 740 745 750
 Lys Asn Val Ile Glu Pro Arg Asp Ile Ser Leu Pro Thr Phe Gln Pro
 755 760 765
 Glu Glu Asp Lys Met Asp Tyr Asp Asp Ile Phe Ser Thr Glu Thr Lys
 770 775 780
 Gly Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Gly Glu Asp Glu Asn Gln Asp Pro Arg
 785 790 795 800
 Ser Phe Gln Lys Arg Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Gln
 805 810 815
 Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Glu Ser Pro Arg Ala Leu Arg Asn Arg
 820 825 830
 Ala Gln Asn Gly Glu Val Pro Arg Phe Lys Lys Val Val Phe Arg Glu
 835 840 845
 Phe Ala Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Gly Glu Leu Asn
 850 855 860
 Lys His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp
 865 870 875 880
 Asn Ile Met Val Thr Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe
 885 890 895
 Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Pro Asp Asp Gln Glu Gln Gly Ala Glu
 900 905 910
 Pro Arg His Asn Phe Val Gln Pro Asn Glu Thr Arg Thr Tyr Phe Trp
 915 920 925
 Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Glu Asp Glu Phe Asp Cys Lys
 930 935 940
 Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser
 945 950 955 960
 Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Arg Ala Asn Thr Leu Asn Ala
 965 970 975
 Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr
 980 985 990
 Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Val Glu Arg
 995 1000 1005
 Asn Cys Arg Ala Pro Cys His Leu Gln Met Glu Asp Pro Thr Leu Lys
 1010 1015 1020

Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Val Met Asp Thr Leu
1025 1030 1035 1040

Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asn Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu
1045 1050 1055

Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His
1060 1065 1070

Val Phe Ser Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Val Tyr Asn
1075 1080 1085

Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Val
1090 1095 1100

Gly Ile Trp Arg Ile Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu Gln Ala Gly
1105 1110 1115 1120

Met Ser Thr Thr Phe Leu Val Tyr Ser Lys Glu Cys Gln Ala Pro Leu
1125 1130 1135

Gly Met Ala Ser Gly Arg Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly
1140 1145 1150

Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly
1155 1160 1165

Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Asp Pro His Ser Trp Ile Lys Val
1170 1175 1180

Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Met Thr Gln Gly Ala
1185 1190 1195 1200

Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr
1205 1210 1215

Ser Leu Asp Gly Arg Asn Trp Gln Ser Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly
1220 1225 1230

Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ala Ser Gly Ile Lys His
1235 1240 1245

Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Val Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro
1250 1255 1260

Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys
1265 1270 1275 1280

Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Gln Asn Lys Ala Ile
1285 1290 1295

Ser Asp Ser Gln Ile Thr Ala Ser Ser His Leu Ser Asn Ile Phe Ala
1300 1305 1310

Thr Trp Ser Pro Ser Gln Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Thr Asn
1315 1320 1325

Ala Trp Arg Pro Arg Val Ser Ser Ala Glu Glu Trp Leu Gln Val Asp
 1330 1335 1340

Leu Gln Lys Thr Val Lys Val Thr Gly Ile Thr Thr Gln Gly Val Lys
 1345 1350 1355 1360

Ser Leu Leu Ser Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Val Ser Ser Ser
 1365 1370 1375

Gln Asp Gly Arg Arg Trp Thr Leu Phe Leu Gln Asp Gly His Thr Lys
 1380 1385 1390

Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Ser Thr Pro Val Val Asn Ala Leu
 1395 1400 1405

Asp Pro Pro Leu Phe Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Thr Ser Trp
 1410 1415 1420

Ala Gln His Ile Ala Leu Arg Leu Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln
 1425 1430 1435 1440

Asp Leu Tyr *

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 40:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 5 (A) DÉLKA: 19 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: není relevantní

(ii) TYP MOLEKULY: peptid

(iii) HYPOTETICKÁ: ano

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

15 (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(ix) ZNAKY:

- 20 (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: Peptid
 (B) POZICE: 1..19
 (D) DALŠÍ INFORMACE: /poznámka= „Signální peptid lidského faktoru VIII.“

(xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 40:

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
 1 5 10 15

Cys Phe Ser

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Izolovaná a purifikovaná DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující aminokyselinovou sekvenci prasečího faktoru VIII uvedenou jako sekvence id. č. 37, kde DNA obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou zde jako sekvence id. č. 36.
2. Izolovaná a purifikovaná DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující doménu A1 prasečího faktoru VIII uvedenou jako aminokyseliny 20 až 391 v sekvenci id. č. 37, kde DNA obsahuje nukleotidovou sekvenci id. č. 36 od pozice 58 do 1173.
3. Izolovaná a purifikovaná DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující doménu A3 prasečího faktoru VIII uvedenou jako aminokyseliny 1491 až 1820 v sekvenci id. č. 37, kde DNA obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou jako sekvence id. č. 36 od pozice 4471 do 5460.
4. Izolovaná a purifikovaná DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující doménu C1 prasečího faktoru VIII uvedenou jako aminokyseliny 1821 až 1973 v sekvenci id. č. 37, kde DNA obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou jako sekvence id. č. 36 od pozice 5461 do 5919.
5. Izolovaná a purifikovaná DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující doménu C2 prasečího faktoru VIII uvedenou jako aminokyseliny 1974 až 2133 v sekvenci id. č. 37, kde DNA obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou jako sekvence id. č. 36 od pozice 5920 do 6399.
6. DNA podle nároku 1, kde nukleotidové sekvence kóduje aminokyselinovou sekvenci uvedenou jako sekvence id. č. 39.
7. DNA podle nároku 6, která obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou jako sekvence id. č. 38.
8. DNA kódující hybridní lidský/prasečí faktor VIII obsahující substituce kódující sekvenci prasečího faktoru VIII, kde nukleotidová sekvence lidského faktoru VIII kódující aminokyseliny číslo 2181 až 2243 je nahrazena nukleotidovou sekvencí kódující aminokyseliny č. 1982 až 2004 v sekvenci id. č. 37.
9. DNA podle nároku 8, kde kódující DNA prasečího faktoru VIII je sekvence nukleotidů 5944 až 6132 v sekvenci id. č. 36.
10. DNA kódující prasečí faktor VIII obsahující kodony kódující aminokyseliny 20 až 2133 v sekvenci id. č. 37, kde DNA má nukleotidovou sekvenci nukleotidů 58 až 6399 sekvence id. č. 36.
11. DNA kódující prasečí faktor VIII bez domény B, která obsahuje kodony kódující aminokyseliny 20 až 1443 v sekvenci id. č. 39.
12. DNA podle nároku 11, která má nukleotidovou sekvenci nukleotidů 60 až 4331 sekvence id. č. 38.
13. Izolovaný a purifikovaný protein, který je produktem exprese DNA podle nároku 11.
14. Izolovaný a purifikovaný protein, který je produktem exprese DNA podle nároku 12.
15. Způsob přípravy prasečího faktoru VIII, **vyznačující se tím**, že obsahuje krok, kdy je exprimována DNA kódující aminokyselinovou sekvenci id. č. 37 obsahující alespoň aminokyseliny 20 až 2133 ve vhodné savčí hostitelské buňce v kultivačním médiu a protein faktoru VIII se purifikuje z hostitelských buněk nebo z kultivačního média.

16. Způsob podle nároku 15, **vyznačující se tím**, že DNA má nukleotidovou sekvenci v podstatě jako sekvence id. č. 36 obsahující přinejmenším nukleotidy 58 až 6399.

5 17. Způsob podle nároku 15, **vyznačující se tím**, že DNA kóduje aminokyselinovou sekvenci uvedenou zde jako sekvence id. č. 37.

18. Způsob podle nároku 17, **vyznačující se tím**, že DNA má nukleotidovou sekvenci uvedenou zde jako sekvence id. č. 36.

10

19. Způsob přípravy prasečího faktoru VIII bez domény B, **vyznačující se tím**, že obsahuje krok, kdy je exprimována DNA kódující aminokyselinovou sekvenci id. č. 36 obsahující alespoň aminokyseliny 20 až 1443 ve vhodné savčí hostitelské buňce v kultivačním médiu a protein faktoru VIII se purifikuje z hostitelských buněk nebo z kultivačního média.

15

20. Způsob podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že DNA má nukleotidovou sekvenci v podstatě jako sekvence id. č. 38 obsahující přinejmenším nukleotidy 60 až 4331.

20

21. Způsob podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že DNA kóduje aminokyselinovou sekvenci uvedenou zde jako sekvence id. č. 39.

22. Způsob podle nároku 19, **vyznačující se tím**, že DNA má nukleotidovou sekvenci uvedenou zde jako sekvence id. č. 38 od nukleotidu č. 3 do nukleotidu č. 4331.

25

Konec dokumentu
