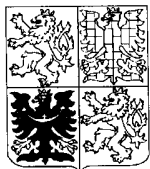


PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **10.03.1999**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **10.03.1998**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/037601**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.01.2001**
(Věstník č. 1/2001)

(86) PCT číslo: **PCT/US99/05193**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/46274**

(21) Číslo dokumentu:

2000 - 3282

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 H 21/04
C 07 K 14/755
C 12 N 15/11
C 12 N 15/12
A 61 K 38/37
A 61 P 7/04

(71) Přihlašovatel:

EMORY UNIVERSITY, Atlanta, CA, US;

(72) Původce:

Lollar John S., Decatur, GA, US;

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

**DNA kódující faktor VIII, proteinový produkt
exprimovaný touto DNA a modifikovaný faktor
VIII**

(57) Anotace:

Aminokyseliny ve specifických místech lidského faktoru VIII vytvářejí interakce s inhibičními protilátkami u pacientů s hemofilii, u kterých se vytvořily tyto protilátky po léčení faktorem VIII. Je popsán modifikovaný faktor VIII, kde je provedena substituce aminokyseliny v jednom nebo několika specifických místech. Modifikovaný faktor VIII není inhibován inhibičními protilátkami namířenými proti epitopům domén A2 nebo C2. Modifikovaný faktor VIII je užitečný pro jedince trpící hemofilii. K zabránění vzniku nebo působení inhibičních protilátek.

CZ 2000 - 3282 A3

DNA kódující faktor VIII, proteinový produkt exprimovaný touto DNA a modifikovaný faktor VIII.

Tato přihláška vynálezu se dovolává priority z patentové přihlášky Spojených Států č. 09/037 601 podané 10. března 1998.

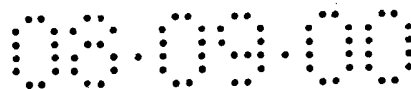
Uznání federální podpory výzkumu: Vláda má práva na tento vynález daná tím, že byl vytvořen na základě výzkumu, který byl zčásti financován granty Národního ústavu zdraví (NIH) č. HL40921, HL46215 a HL36094.

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

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 prekurzor přeměněn na proteázu, která štěpí následující proteinový prekurzor v řadě. Ve většině kroků jsou nutné kofaktory.



Faktor VIII cirkuluje jako inaktivní prekurzor 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. 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.

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 infúze 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 titer inhibitoru dostatečně nízký, lze zvládat potíže zvyšujícími se dávkami faktoru VIII. Avšak často je titer inhibitoru tak vysoký, že ho nelze

překonat dávkami faktoru VIII. Alternativní strategií je obejít potřebu faktorů VIII v průběhu normální hemostázy užitím komplexních přípravků faktoru IX (např. KONYNE[®], Proplex[®]) nebo rekombinantním lidským faktorem VIIIA. Navíc jelikož prasečí faktor VIII má obvykle podstatně nižší reaktivitu s inhibitory než lidský faktor VIII, užívá se přípravek 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 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.

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.

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.

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.

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

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"), neimnogenní lidský/ekvivalentní faktor VIII, neantigenní lidský/ekvivalentní faktor VIII nebo lidský/zvířecí faktor VIII, neimnogenní 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 neimnogenní lidský/ekvivalentní a/nebo lidský/zvířecí/ekvivalentní faktor VIII, a neantigenní neimnogenní lidský/zvířecí/ekvivalentní faktor VIII mající vyšší koagulační aktivitu.

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 mutagenese.

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 delecii jednoho nebo několika kodonů v B-doméně.

Některá provedení hybridního nebo hybridního ekvivalentního faktoru VIII podle předkládaného vynález 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

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 jakoukoliv funkční proteinovou molekulu faktoru VIII z jakéhokoliv 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) 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 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“ 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 kteréhokoliv savce kromě člověka. Termín „zvíře“ zde označuje prase a jakéhokoliv 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. 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 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 molekula faktoru VIII jednoho druhu, která 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 plazma 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. radioimunostest, ELISA nebo test "Bethesda" popsány 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-protilátka 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 antokoagulační test.

Obecný popis použitých postupů

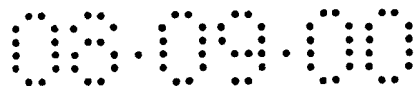
Patentová přihláška USA č. 07/864004 popisuje novou molekulu hybridního lidského/prasečího faktoru VIII s koagulační aktivitou, ve které byly určité prvky molekuly lidského nebo zvířecího faktoru VIII nahrazeny odpovídajícími prvky molekuly faktoru VIII jiného druhu. Patentové přihlášky US 08/212133 a PCT/US94/13200 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 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 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:

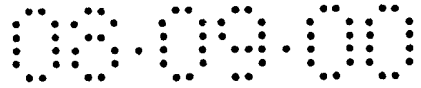
- 1) nahrazením lidských nebo prasečích podjednotek (těžké i lehké řetězce) odpovídajícími prasečími nebo lidskými podjednotkami,
- 2) nahrazením jedné nebo několika lidských nebo prasečích domén (A1, A2, A3, B, C1, C2) odpovídajícími prasečími nebo lidskými doménami,
- 3) nahrazením souvislé části jedné nebo několika lidských nebo prasečích domén odpovídajícími částmi prasečích nebo lidských domén,
- 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 aminokyselin 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).

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:

- 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 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

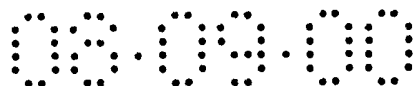


než lidském faktoru VIII alespoň jednou aminokyselinovou sekvencí obsahující jednu nebo několik aminokyselin, která nemá žádnou známou sekvenční identitu s faktorem VIII (tj. aminokyselinovou sekvencí odlišnou od sekvence faktoru VIII).

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.

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.

Jelikož současné údaje ukazují, že B doména nemá žádný inhibiční epitop a nemá žádný známý vliv na funkci faktoru VIII, v některých provedeníh 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 způsobu podle vynálezu.

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.

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

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.

Izolace jak lidských tak i zvířecích jednotlivých podjednotek zahrnuje disociaci dimeru těžký řetězec/lehký řetězec. To lze provést např. chelatací vápníku pomocí

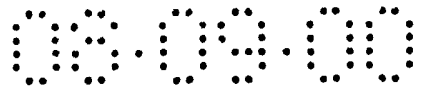
kyseliny etylendiamnitetraoctové (EDTA) následované monoS™ HPLC (Pharmacia-LKB, Piscataway, NJ). Hybridní molekuly lidského/zvířecího faktoru VIII se pak rekonstruuují z izolovaných podjednotek v přítomnosti vápníku. Hybridní faktory VIII lidský lehký řetězec/zvířecí těžký řetězec nebo zvířecí těžký řetězec/lidský lehký řetězec jsou izolovány od nezreagovaných těžkých řetězců pomocí postupu monoS™ 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

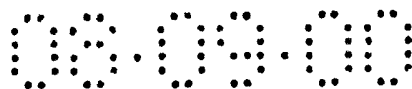
Předkládaný vynález poskytuje molekuly hybridního lidského/zvířecího faktoru VIII se substitucemi domén nebo



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 zviřecího faktoru VIII, po které následuje rekombinace lidských a zviřecích domén, takže vznikne hybridní lidský/zviřecí 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 monoS™ HPLC (Pharmacia-LKB, Piscataway, NJ). Doména A2 je izolována od faktoru VIIIA jako menšinová složka v monoS™ HPLC. Hybridní molekuly lidského/zviřecího faktoru VIII jsou pak rekonstituovány smícháním stejného objemu domény A2 jednoho biologického druhu a dimerů A1/A3-C1-C2 jiného druhu.

Hybridní lidské/zviřecí faktory VIII nebo jejich frty jsou izolovány ze směsi nezreagovaných dimerů a domén A2 pomocí postupu monoS™ 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, sekvence nukleových kyselin kódujících tyto hybridní molekuly, způsoby jejich 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 (Genentech), a dále v patentových přihláškách WO 87/04187, WO 88/08035, WO 88/03558 a v patentu USA č. 4 757 006, a na základě známé cDNA byla dedukována aminokyselinová sekvence. Patent USA č. 4 965 199 udělený Caponovi et al. 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 čínského křečka) a BHKC (fetální ledvinné křeččí buňky). Lidský faktor VIII byl modifikován tak, že byla odstraněna celá nebo část B-domény (patent USA č. 4 868 112) a byl učiněn pokus nahradit tuto doménu B faktoru VIII B doménou lidského faktoru V (patent USA č. 5 004 803). Sekvence cDNA kódující lidský faktor VIII a predikovaná aminokyselinová sekvence jsou zde uvedeny jako sekvence 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 sekvence prasečího faktoru VIII odpovídající úseku N-konce lehkého 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 sekvencování fragmentů ze čtyřech aminokyselin z N-koncového úseku prasečího faktoru VIII, ale nijak necharakterizoval polohu těchto fragmentů v molekule faktoru VIII. aminokyselinová sekvence 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 úplnou doménu A2 prasečího faktoru VIII a predikovaná aminokyselinová sekvence a také hybridní lidský/prasečí faktor VIII, kde jsou substituovány všechny domény, všechny podjednotky a specifické sekvence aminokyselin byly popsány v přihlášce vynálezu USA č. 07/864 004 nazvané "Hybridní lidský/prasečí faktor VIII" podané 7. dubna 1992 původci John S. Lollar a Marshall S. Runge, na jejímž základě byl udělen 15. listopadu 1994 patent USA č. 5 364 771 a dále také WO 93/20093. Sekvence cDNA kódující doménu A2 prasečího

faktoru VIII mající sekvenční identitu se zbytky 373-740 zralého lidského faktoru VIII uvedeného jako sekvence id. č. 1, je zde uvedena jako sekvence id. č. 3 a predikovaná aminokyselinová sekvence jako sekvence id. č. 4. Nedávno byly popsány v mezinárodní přihlášce WO 94/11503 nukleotidové a odpovídající aminokyselinové sekvence 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 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 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. Lidská 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 Willey & 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, sekvenci 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 kóovaný 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 odborníkoví 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 Willey & 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 (Lipofectin™, Life Technologies, Inc.). Expresi 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 peletuje, opláchne a resuspenduje ve vhodném pufru, a pak se rekombinantní hybridní faktor VIII purifikuje standardním způsobem, např. imunoafinitní chromatografií pomocí např. Sepharose™ s monoklonální protilátkou anti-A2.

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 řídicích 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 Willey & 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 savčích 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 čínské křečka (CHO), které lze kultivovat užitím rutinních postupů a kultivačních médií.

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 myši 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.

Jako příklad výhodného provedení lze uvést následující přípravu proteinu hybridního lidského/myšního faktoru VIII.

DNA klony odpovídající myšimu homologu genu lidského faktoru VIII byly izolovány a sekvencovány a byla predikována 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. Myší 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 žívá jako primer vnitřní ("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.

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.

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 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 připraveny a testovány na koagulační aktivitu následujícím způsobem. Jako specifický příklad výhodného provedení vynález poskytuje hybridní lidský/prasečí faktor VIII obsahující aminokyselinovou substituci v doméně A2. Je zřejmé, že odborník může stejné metody využít k přípravě dalších hybridních molekul jako je hybridní lidský/zvířecí, zvířecí/zvířecí nebo hybridní 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 disociace 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. 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 molekuly hybridního lidského/prasečího faktoru VIII se změněnou koagulační aktivitou byly vybrány kandidátní sekvence pro mutagenezi srovnáním aminokyselinových sekvencí lidské a prasečí domény A2 (sekvence id. č. 2 a 6), jak je uvedeno v tabulce I.

Tabulka I

Sekvence lidského faktoru VIII Vybrané jako vhodné pro mutagenezi.

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 aminokyselinové 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.

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 doménu A2 z prasete užitou k substituci v molekula lidského faktoru VIII, kterážto 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 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 křeččích buňkách, jak bylo již zmíněno výše. Ty lze purifikovat do homogenity metodami v oboru známými, např. chromatografií s heparin-Sepharose[™] 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 3000-4000 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, výhodné užitím metody SOE, jak ji popsali Ho, S.N. et al., Gene 77: 51-59, 1994 nebo dle příkladů 7 a 8. Lze také užít oligonukleotidy řízenou mutagenezi, 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 absorbance 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 znalostí vztahů mezi strukturou a funkcí v molekula faktoru VIII. Předpokládá se, že inhibitory působí tak, že narušují

některou z makromolekulárních interakcí spojenou se strukturou domén faktoru VIII nebo asociací 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 blokuji 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 blízce 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 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 ininhibičními protilátkami faktoru VIII ve srovnání s lidským nebo prasečím faktorem VIII nebo nemá žádnou imunoreaktivitu s ininhibičními protilátkami faktoru VIII.

Užitím postupů pro substituce aminokyselin v molekule faktoru VIII popsaných v předchozích částech přihlášky byla provedena mutační analýza, aby byly vybrány odpovídající aminokyselinové sekvence faktoru VIII jednoho biologického druhu, výhodně prasečí, které se užijí k nahrazení alespoň jedné sekvence obsahující jednu nebo více aminokyselin faktoru VIII jiného 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. Systematickým nahrazováním stále menších aminokyselinových sekvencí, po kterém vždy následuje 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 ekvivalentního 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 provedení 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 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 restričních míst pro štěpení cDNA a nebo pomocí metody SOE. Výsledné aminokyselinové 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 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 epitop byl eliminován v daném úseku substitucí odpovídající prasečí sekvencí. 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 identifikována 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 inhibítozem 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 Alp-A2p-A3p-C1H-C2P a Alp-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 Alp-A2p-A3H-C1p-C2p ale nikoliv s Alp-A2p-A3p-C1H-C2P hybridem. A naopak, pokud je třetí epitop v doméně C1, inhibiční IgG bude reagovat s Alp-A2p-A3p-C1H-C2P ale nikoliv s Alp-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 Alp-A2p-A3p-C1H-C2P a Alp-A2p-A3H-C1p-C2p, a eliminací C2 specifických protilátek průchodem Sepharose™ 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 popsaný 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 popsaný změnit metodou místně cílené mutageneze 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 mutageneze, 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 mutageneze jsou vedlejší aminokyselinové řetězce, které jsou dle předpokladu součástí epitopu, nahrazeny alaninovými zbytky pomocí místně cílené

mutageneze. 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 epitopu 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 mutageneze 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 hemofilií 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 plky 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 sekvenční 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% sekvenční identitou 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 bazí 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

aminokyselinová sekvence v těchto doménách nahrazena doménou jiného savce. Lze provést další mutagenezi 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. 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

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 jednou aminokyselinovou sekvencí obsahující jednu nebo více aminokyselin, která nemá žádnou známou aminokyselinovou sekvenci 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.

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

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

Ve výhodném provedení vynálezu byla připravena ekvivalentní molekula prokoagulačního rekombinantního hybridního faktoru VIII, kde alespoň jedna sekvence obsahující jednu nebo více 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 v příkladech 7 a 8 a slouží jako příklad identifikace antigenních sekvencí v doméně A2 nebo jiných doménách lidského a zviřecího faktoru VIII a užití metod místně cílené mutagenese, 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 epitopu, 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 užitím 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.

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.

Fosfolipidové vesikuly 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 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.

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 vitamínu K, tkáňový faktor a von Willebrandův faktor (vWf) nebo jeho fragment, který obsahuje vazebné místo pro faktor VIII, a polysacharidy jako je např. sacharóza.

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 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 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 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 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 puftru, 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

gastrointestinálního 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.

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.

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.

Dávky přípravku hybridního nebo ekvivalentního hybridního faktoru VIII, které je třeba podávat pacientovi, který takové léčení potřebuje, kolísají v závislosti na závažnosti deficience faktoru VIII. Obecně je frekvence, trvání a velikost dávky nastavena v souladu se závažností a trváním krvácivé epizody každého pacienta. Tudíž 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 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 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).

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 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 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 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 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 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 neomezují.

Příklady provedení vynálezu

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.

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 reagentie 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 CaCl₂, a vizuálně se určoval čas vzniku fibrinové sraženiny.

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, vynesáním log₁₀ 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.

Jednostupňový 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

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 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 jednotek faktoru VIII byly rekonstituovány 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 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 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/A280)
Prasečí	21 300
Pocházející z lidské plazmy	3 600
Lidský rekombinantní	2 400

Příklad 3

Srovnání stability lidského a prasečího faktoru VIII

Výsledky jednostupňového testu pro faktor VIII jsou odrazem aktivace faktoru VIII na faktor VIIIA ve vzorku a možné ztráty aktivity vytvářeného faktoru VIIIA. Bylo prováděno přímé srovnání stability lidského a prasečího faktoru VIII. Vzorky z Mono Q[™] 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 dvojstupňového koagulačního testu. Typicky byla vrcholná aktivita (ve 2 minutách) 10 krát větší u prasečího faktoru VIIIA než u lidského faktoru VIIIA, a potom se aktivity obou faktorů VIIIA, prasečího i lidského, snižovaly, přičemž aktivita lidského faktoru VIIIA klesala rychleji.

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 Q™ HPLC aktivován trombinem a podroben kationtoměničové (Pharmacia, Inc.) Mono S™ 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 přidán FPR-CH₂Cl D-fenylprolylarginylchlormetylketon do koncentrace 0,2µM 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 nanesla rychlostí 2 ml/minutu na kolonu Mono S™ 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 jeden vrchol. Specifická aktivita vrcholové frakce byla přibližně 7 500 U/A₂₈₀. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE) vrcholové frakce Mono S™ 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 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 S™ HPLC

za stejných podmínek specifickou aktivitu $1,6 \times 10^6$ U/A₂₉₀. Analýza 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 S™ HPLC preparátů lidského faktoru VIII aktivovaného trombinem 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 podjednotku A2. Za tím účelem se prováděla izolace podle postupu, který zahrnoval snížení pH pufrů Mono S™ na pH 5. Lidský faktor VIII purifikovaný Mono Q™ (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 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 S™ HR 5/5 HPLC ekvilibrovanou 0,01M acetátem sodným, 5mM CaCl₂, 0,01% Tween-80, pH 5,0, a 0,1M NaCl. 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

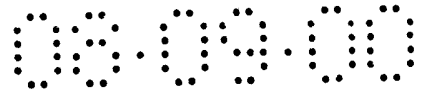
SDS-PAGE a barvení stříbrem. Specifická aktivita vrcholové frakce byla desetkrát větší než frakce získané v pH 6,0 (75 000 U/A₂₉₀ proti 7 500 U/A₂₉₀). Ale na rozdíl do prasečího faktoru VIIIA izolovaného v pH 6,0, který je trvale stabilní ve 4 °C, aktivita lidského faktoru VIIIA klesala rovnoměrně po dobu několika hodin po eluci z kolony Mono S™. 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

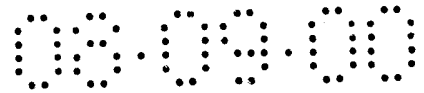
Příprava hybridního lidského/prasečího faktoru VIII rekonstitucí podjednotek

Lehké řetězce prasečího faktoru VIII a těžké řetězce faktoru VIII byly izolovány následujícím způsobem. K prasečímu faktoru VIII purifikovanému pomocí Mono Q™ byl přidán 0,5M roztok EDTA, pH 7,4, do konečné koncentrace 0,05M a byl ponechán při teplotě místnosti 18-24 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 S™ HR 5/5 předem ekvilibrovanou



pufrem 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 0,1-0,7M NaCl v pufru A rychlostí 1 ml/minutu a byl homogenní na SDS-PAGE. Těžké řetězce faktoru VIII byly izolovány prostřednictvím Mono Q™ HPLC (Pharmacia, Inc., Piscataway, N.J.) následujícím způsobem. Těžké řetězce faktoru VIII se neadsorbují na Mono S™ 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 nanášena na kolonu Mono Q™ 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 0,1-1,0M 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 nanášena na kolonu Mono S™ 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 0,1-1,0M 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 S™, nadbytek těžkých řetězců zajišťuje, že částí preparátu nejsou volné lehké řetězce. Rekonstituční pokusy následované purifikací Mono S™ 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

Příklad 5

Příprava aktivního hybridního lidského/prasečího faktoru VIII rekonstitucí domén

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 VIIIA (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 testu. Směs byla naředěna 1:8 pufrům B (20mM HEPES, 5mM CaCl_2 , 0,01% Tween-80, pH 7,4) a nanášena na kolonu Mono S[™] ekvilibrovanou v pufru B. Dimer A1/A3-C1-C2 byl eluován jako jeden ostrý vrchol v přibližně 0,4M NaCl při použití gradientu 0,1-1,0M 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 byla izolována jako minoritní složka (50 μg) v 0,3M NaCl na chromatogramu Mono S[™].

Hybridní prasečí/lidské molekuly faktoru VIII byly rekonstituovány z dimerů a domén následujícím způsobem. Koncentrace a podmínky pufrů byly tyto: prasečí A2, 0,63 μM v pufru A (5mM MES, 5mM CaCl_2 , 0,01% Tween-80, pH 6,0) a 0,3M NaCl, prasečí A1/A3-C1-C2, 0,27 μM v pufru B a 0,4M NaCl, pH 7,4, lidská A2, 1 μM v 0,3M NaCl, 10mM histidin-HCl, 5mM CaCl_2 , 0,01% Tween-20, pH 6,0, lidský A1/A3-C1-C2, 0,18 μM v 0,5M NaCl, 10mM histidin-Cl, 2,5mM CaCl_2 , 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.

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

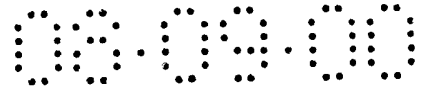
Vytvoření aktivity po smíchání domén A2 a dimerů A1/A3-C1-C2 bylo téměř kompletní po jedné hodině a bylo stabilní po přinejmenším 24 hodin při 37 °C. Tabulka IV ukazuje aktivitu rekonstituovaných hybridních molekul faktoru VIIIA, když byly testovány v 1 hodině. Dvoustupňový test, kterým byly získány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

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, 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.

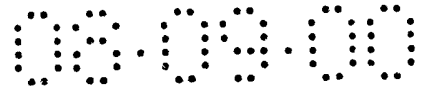
Příklad 6

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 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 reakcí), byly použity degenerované primery založené na známé sekvenci cDNA lidského faktoru VIII a přesný prasečí primer založený na části sekvence prasečího faktoru VIII. Byl izolován produkt PCR o velikosti 1 kb a byl amplifikován pomocí inserce do fagemidového vektoru Bluescript™ (Stratagene).

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



Příklad 7

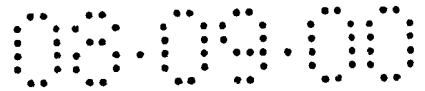
Příprava rekombinantního hybridního lidského/zvířecího faktoru VIII

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)].

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 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 prováděny následujícím způsobem.

Materiál

Metoxykarbonyl-D-cyklohexylglycyl-glycyl-arginin-p-nitroanilid (Spectrozyme™ Xa) a monoklonální protilátky anti-



faktor VIII ESH4 a ESH8 byly zakoupeny od firmy American Diagnostica (Greenwich, CT). Unilamelární (jednovrstevné) fosfatidylcholin/fosfatidylserinové (75/25, hmot.) vezikuly 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'-AARCAYCCNAARACNTGGG-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 Sequenase™ 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 (CircumVent™, New England Biolabs, Beverly, MA). Oblast obsahující epitop pro autoprottilátku 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 mutagenézi při použití fágové DNA obsahující uracil, jak je popsáno autory Kunkel, T.A. et al. (Meth. Enzymol., 204, 125-139, 1991), aby současně vystřihl 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'.

K produktu PCR byly přidány linkery ClaI, 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'-CCTTTATCCAAATACGTAGCGTTTGCCAAGAAG-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 SpeI/BamHI 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 SpeI/ApaI obsahující celou sekvenci A2 dosazen na odpovídající místo v sekvenci HB⁻ za vzniku konstruktu 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, jednostupňovým 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). Expresí 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 použítá 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 mutageneze, jako je metoda SOE, jak je ukázáno níže. Mohou být identifikovány sekvence zviřecího faktoru VIII, které nejsou antigenní ve srovnání s odpovídajícími antigenními lidskými sekvencemi, a mohou být tvořeny substituce pro vnesení zviřecích 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 mutagenezí. 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 zviřecí 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 (10-600 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.) vesikulů. 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-Sepharose 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. Tudiž 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 aminokyselinami, aby byl dále úžeji definován epitop A2. Kromě metody restričních míst byla užita 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 ledvinných buněk křečka a exprimovány (0,5 až 1 μ g, tj. přibližně 3 až 6 jednotek/ 10^7 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

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

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.

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.

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.

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.

Příklad 9

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

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 mutageneze. Kromě toho, pro usnadnění klonování byla restriční 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-Sepharose 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

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 známým 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 imunogenita (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 nabité 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 namysli, 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 Strategene (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 myši 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 deoxynucleotidtrifosfátů (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 agarózového gelu byla provedena pomocí soupravy GeneClean II (Bio 101) nebo Quiex II Gel Extraction Kit (Qiagen).

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 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.

Sekvencování plazmidu bylo provedeno užitím automatického sekvenátoru Applied Biosystems 373a a terminační soupravy s fluoresenčními barvivou 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 (dsDNA Cycle Sequencing System, Life Technologies).

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

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 s 5' prodlouženým dvojřetězcovým adaptorem (sekvence id. č. 13):

5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCGGGCAGGT-3'

3'-NH₂-CCCGTCCA-PO₄-5',

jehož krátký řetězce 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 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)

jakožto "antisense" 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 „antisense“ primer (sekvence id. č. 17):

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 při 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 užita sekvence z úseku signálního peptidu k navržení sekvence fosforylovaného "sense" primeru (sekvence id. č. 18):

5'-CCTCTCGAGCCACCATGTCTGAGCCACCATGCAGCTAGAGCTCTCCACCTG-3'

označeného RENEOPIGSP 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 inzerce do savčího expresního vektoru ReNeo použitého pro expresi fVIII (Lubin et al, 1994 viz výše). Místo obsahuje štěpné místo XhoI (podtržené). RENEOPIGSP 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. "Antisense" 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'-AGGAAATTCCTACTGGAACCTTN-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'

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.

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 restrikními místy (Sarkar G. et al., PCR Meth. Appl. 2: 318-322, 1993), PCR s "nepredikovatelným nasednutím primerů" (Dominguez, O. et al., Nucl. Acids Res. 22: 3247-3248, 1994) nebo screeningem cdNA prasečích jater, byly neúspěšné. Metoda 3'RACE byla znovu vyzkoušena s cdNA knihovnou ligovanou stejnými dvouřetězcovými adaptory, která byla užita k úspěšnému klonování 5'-konce cdNA prasečího fVIII. Tudíž selhání této metody nebylo způsobeno nepřítomností cdNA odpovídající exonu 26.

Ke klonování 3'-poloviny domény C2 byla užita metoda cíleného procházení genu pomocí PCR (Parker J.D. et al., Nucl. Acids Res.19: 3055-3060, 1991). "Sense" primer

specifický pro prasečí sekvenci nt 6904-6924 (sekvence id. č. 25):

5'- TCAGGGCAATCAGGACTCC -3'

byl syntetizován na základě počáteční sekvence domény C2 a byl použit v PCR společně s nespecifickým "kráčejším" primerem vybraným z oligonukleotidů 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'

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 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. Přímě 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 "antisense" 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 "antisense" primeru sekvence id. č. 34:

5'- CCTTGCAGGAATTCGATTCA-3'

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

5'- CCGTGGTGAACGCTCTGGACC-3'

a shodným "antisense" 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.

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

Srovnání přiřazením sekvencí úseků signálního peptidu, A1, A2, A3, C1 a C2 bylo provedeno pomocí počítačového programu CLUSTALW (Thompson, J.D. et al., Nucl. 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 myší domény A2 je uvedena v sekvenci id. č. 6 (aminokyseliny 392-759).

Příklad 11

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

Použité materiály

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 od Life Technologies a Curachem, Inc. Restriční 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 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 mutagenesí metodou SOE ("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 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 Plazmid 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 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 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 barvivou 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 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 mutagenezí metodou SOE. Fragment C1-C2 z tohoto plazmidu byl odstraněn restrikcí enzymy ApaI a NotI a ligován do HB⁻/ReNeo/NotI 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 mutageneze.

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 mutageneze. 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).

Expresse 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-fofstatidylcholinových (25/75 hmotn.) vesikulů. 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 supernatantů 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-Sepharose. Heparin-Sepharose (10 ml) byla ekvilibrována pufrům 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 naneseno na kolonu s heparin-Sepharose, která pak byla propláchnuta 30 ml ekvilibračního pufru bez azidu sodného. PB⁻ pak byl eluován pufrům 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⁻)

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 jednostupňovým 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.

Purifikace PB⁻

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.

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).

Charakterizace prasečího faktoru VIII

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 C2 a 3'UTR cDNA byla

obtížně klonovatelné. Zbytek domény C2 byl nakonec klonován metodou cíleného procházení genu PCR (Parker et al., 1991, viz výše).

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 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.

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.

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 nepřihřadil správně myši tyrosin odpovídající Tyr346 v lidském fVIII.

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

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 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 mutagenezí (Healey et al., 1995, viz výše). V tomto segmentu obsahujícím 25 aminokyselinových zbytků je relativně malý 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.

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 mutageneze tohoto úseku vedla k charakterizaci C2 epitopu, jehož hlavní antigenní determinanta byla neočekávaně lokalizována do úseku odpovídajícího aminokyselinám 2181-2243 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, že byla zkonstruována hybridní kódující DNA, a sice užitím nukleotidové sekvence kódující prasečí úsek C2 uvedené zde

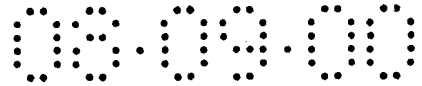
jako sekvence id.č. 37. každý hybrid byl exprimován v transfekovaných buňkách, takže hybridní faktor VIII mohl být částečně purifikován z růstového média. Aktivita, v nepřítomnosti jakéhokoliv inhibitoru, byla měřena jednostupňovým koagulační testem.

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 z 10 % rekombinantní lidskou doménou A2. Kromě toho C2-hybridní faktory VIII byly testovány proti myší 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.

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 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.

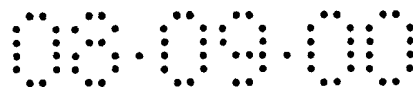
S odkazem na obr. 1H, je vidět, že v úseku 2181-2243 je rozdíl v 16 aminokyselinách mezi lidskou a prasečí sekvencí. Rozdíly byly nalezeny v aminokyselinách 2181, 2182, 2188, 2195-2197, 2199, 2207, 2216, 2222, 2224-2227, 2234, 2238 a 2243. Lze provést náhradu jedné nebo několika aminokyselin v těchto 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 náhražka 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.



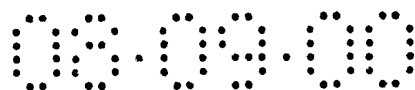
Popis obrázků

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



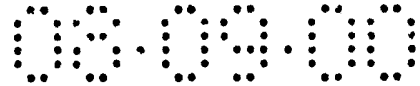
aminokyselinové sekvence lehkého řetězce aktivačního peptidu faktoru VIII člověka, prasete a myši (sekvence id. č. 2, aminokyseliny 1649-1689, sekvence id. č. 37, aminokyseliny 1450-1490, sekvence id. č. 6, aminokyseliny 1641-1678, v uvedeném pořadí). Obr. 1F poskytuje srovnání aminokyselinové sekvence 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 dvojitě 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 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.,



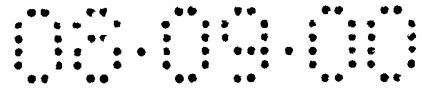
Biochemistry 25: 8343-8347, 1986). Domény A3, C1 a C2 jsou definovány jako segmenty zbytků 1690-2019, 2020-2172 a 2173-2332, v uvedeném pořadí (vehar et al., 1984, viz výše). Štěpná místa pro trombin (faktor IIa), faktor IXa, faktor X a APC (Fay et al., 1991, viz výše, Eaton, D. et al., Biochemistry 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 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 (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 sekvence id. č. 38 a odpovídající predikovaná aminokyselinová sekvence jako sekvence id. č. 39.

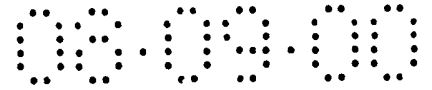
SEZNAM SEKVENCÍ

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:

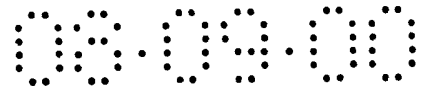
- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :
- (A) DÉLKA: 9009 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: dvojité
 - (D) TOPOLOGIE: není relevantní
- (ii) TYP MOLEKULY: cDNA na mRNA
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne
- (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:
- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
 - (F) TYP TKÁNĚ: Játra
- (ix) ZNAKY:
- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: různé znaky
 - (B) POZICE: 5125..7053
 - (D) DALŠÍ INFORMACE: /produkt= "struktura domény"
- /poznámka= "odpovídající doméně A3-C1-C2"
- (ix) ZNAKY:
- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: různé znaky
 - (B) POZICE: 1..2277
 - (D) DALŠÍ INFORMACE: /produkt= "struktura domény"
- /poznámka= " odpovídající doméně A1-A2"
- (ix) ZNAKY:
- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: různé znaky
 - (B) POZICE: 1..2277
 - (D) DALŠÍ INFORMACE: /produkt= "doména"
- /poznámka= "cDNA kódující lidský faktor VIII"
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 1:
- | | |
|---|-----|
| CAGTGGGTAA GTTCCTTAAA TGCTCTGCAA AGAAATTGGG ACTTTTCATT AAATCAGAAA | 60 |
| TTTTACTTTT TTCCCCTCCT GGGAGCTAAA GATATTTTAG AGAAGAATTA ACCTTTTGCT | 120 |
| TCTCCAGTTG AACATTTGTA GCAATAAGTC ATGCAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT | 180 |
| CTGTGCCTTT TGCGATTCTG CTTTAGTGCC ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA | 240 |
| CTGTCATGGG ACTATATGCA AAGTGATCTC GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCTT | 300 |
| CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC ACCTCAGTCG TGTACAAAAA GACTCTGTTT | 360 |
| GTAGAATTCA CGGTTACCT TTTCAACATC GCTAAGCCAA GGCCACCCTG GATGGGTCTG | 420 |



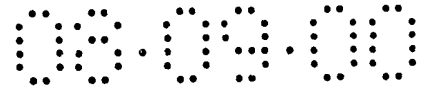
CTAGGTCCTA	CCATCCAGGC	TGAGGTTTAT	GATACAGTGG	TCATTACACT	TAAGAACATG	480
GCTTCCCATC	CTGTCAGTCT	TCATGCTGTT	GGTGTATCCT	ACTGGAAAGC	TTCTGAGGGA	540
GCTGAATATG	ATGATCAGAC	CAGTCAAAGG	GAGAAAGAAG	ATGATAAAGT	CTTCCCTGGT	600
GGAAGCCATA	CATATGTCTG	GCAGGTCCTG	AAAGAGAATG	GTCCAATGGC	CTCTGACCCA	660
CTGTGCCTTA	CCTACTCATA	TCTTTCTCAT	GTGGACCTGG	TAAAAGACTT	GAATTCAGGC	720
CTCATTGGAG	CCCTACTAGT	ATGTAGAGAA	GGGAGTCTGG	CCAAGGAAAA	GACACAGACC	780
TTGCACAAAT	TTATACTACT	TTTTGCTGTA	TTTGATGAAG	GGAAAAGTTG	GCACTCAGAA	840
ACAAAAGAACT	CCTTGATGCA	GGATAGGGAT	GCTGCATCTG	CTCGGGCCTG	GCCTAAAATG	900
CACACAGTCA	ATGGTTATGT	AAACAGGTCT	CTGCCAGGTC	TGATTGGATG	CCACAGGAAA	960
TCAGTCTATT	GGCATGTGAT	TGGAATGGGC	ACCACTCCTG	AAGTGCACTC	AATATTCCTC	1020
GAAGGTCACA	CATTTCTTGT	GAGGAACCAT	CGCCAGGCGT	CCTTGGAAT	CTCGCCAATA	1080
ACTTTCCTTA	CTGCTCAAAC	ACTCTTGATG	GACCTTGGAC	AGTTTCTACT	GTTTTGTGAT	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	TATGGCATA	1500
ACAGATGAAA	CCTTTAAGAC	TCGTGAAGCT	ATTCAGCATG	AATCAGGAAT	CTTGGGACCT	1560
TTACTTTATG	GGGAAGTTGG	AGACACACTG	TTGATTATAT	TTAAGAATCA	AGCAAGCAGA	1620
CCATATAACA	TCTACCCTCA	CGGAATCACT	GATGTCCGTC	CTTTGTATTC	AAGGAGATTA	1680
CCAAAAGGTG	TAAAACATTT	GAAGGATTTT	CCAATTCTGC	CAGGAGAAAT	ATTCAAATAT	1740
AAATGGACAG	TGACTGTAGA	AGATGGGCCA	ACTAAATCAG	ATCCTCGGTG	CCTGACCCGC	1800
TATTACTCTA	GTTTCGTTAA	TATGGAGAGA	GATCTAGCTT	CAGGACTCAT	TGGCCCTCTC	1860
CTCATCTGCT	ACAAAGAATC	TGTAGATCAA	AGAGGAAACC	AGATAATGTC	AGACAAGAGG	1920
AATGTCATCC	TGTTTTCTGT	ATTTGATGAG	AACCGAAGCT	GGTACCTCAC	AGAGAATATA	1980
CAACGCTTTC	TCCCAATCC	AGCTGGAGTG	CAGCTTGAGG	ATCCAGAGTT	CCAAGCCTCC	2040
AACATCATGC	ACAGCATCAA	TGGCTATGTT	TTTGATAGTT	TGCAGTTGTC	AGTTTGTGTTG	2100
CATGAGGTGG	CATACTGGTA	CATTCTAAGC	ATTGGAGCAC	AGACTGACTT	CCTTCTGTGC	2160



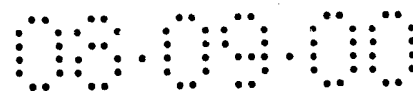
TTCTTCTCTG	GATATACCTT	CAAACACAAA	ATGGTCTATG	AAGACACACT	CACCCTATTC	2220
CCATTCTCAG	GAGAACTGT	CTTCATGTCG	ATGGAAAACC	CAGGTCTATG	GATTCTGGGG	2280
TGCCACAAC	CAGACTTTCG	GAACAGAGGC	ATGACCGCCT	TACTGAAGGT	TTCTAGTTGT	2340
GACAAGAACA	CTGGTGATTA	TTACGAGGAC	AGTTATGAAG	ATATTTCAGC	ATACTTGCTG	2400
AGTAAAAACA	ATGCCATTGA	ACCAAGAAGC	TTCTCCCAGA	ATTCAAGACA	CCCTAGCACT	2460
AGGCAAAAGC	AATTTAATGC	CACCACAATT	CCAGAAAATG	ACATAGAGAA	GACTGACCCT	2520
TGGTTTGCAC	ACAGAACACC	TATGCCTAAA	ATACAAAATG	TCTCCTCTAG	TGATTTGTTG	2580
ATGCTCTTGC	GACAGAGTCC	TACTCCACAT	GGGCTATCCT	TATCTGATCT	CCAAGAAGCC	2640
AAATATGAGA	CTTTTTCTGA	TGATCCATCA	CCTGGAGCAA	TAGACAGTAA	TAACAGCCTG	2700
TCTGAAATGA	CACACTTCAG	GCCACAGCTC	CATCACAGTG	GGGACATGGT	ATTTACCCTT	2760
GAGTCAGGCC	TCCAATTAAG	ATTAAATGAG	AACTGGGGA	CAACTGCAGC	AACAGAGTTG	2820
AAGAACTTG	ATTTCAAAGT	TTCTAGTACA	TCAAATAATC	TGATTTCAAC	AATTCCATCA	2880
GACAATTTGG	CAGCAGGTAC	TGATAATACA	AGTTCCTTAG	GACCCCAAG	TATGCCAGTT	2940
CATTATGATA	GTCAATTAGA	TACCACTCTA	TTTGGCAAAA	AGTCATCTCC	CCTTACTGAG	3000
TCTGGTGGAC	CTCTGAGCTT	GAGTGAAGAA	AATAATGATT	CAAAGTTGTT	AGAATCAGGT	3060
TTAATGAATA	GCCAAGAAAG	TTCATGGGGA	AAAAATGTAT	CGTCAACAGA	GAGTGGTAGG	3120
TTATTTAAAG	GGAAAAGAGC	TCATGGACCT	GCTTTGTTGA	CTAAAGATAA	TGCCTTATTC	3180
AAAGTTAGCA	TCTCTTTGTT	AAAGACAAAC	AAAACCTCCA	ATAATTCAGC	AACTAATAGA	3240
AAGACTCACA	TTGATGGCCC	ATCATTATTA	ATTGAGAATA	GTCCATCAGT	CTGGCAAAAAT	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	AATTTCTTGT	CTGAGAAAAA	CAAAGTGGTA	3660
GTAGGAAAGG	GTGAATTTAC	AAAGGACGTA	GGACTCAAAG	AGATGGTTTT	TCCAAGCAGC	3720
AGAAACCTAT	TTCTTACTAA	CTTGGATAAT	TTACATGAAA	ATAATACACA	CAATCAAGAA	3780
AAAAAAATTC	AGGAAGAAAT	AGAAAAGAAG	GAAACATTAA	TCCAAGAGAA	TGTAGTTTTG	3840
CCTCAGATAC	ATACAGTGAC	TGGCACTAAG	AATTTTCATGA	AGAACCTTTT	CTTACTGAGC	3900



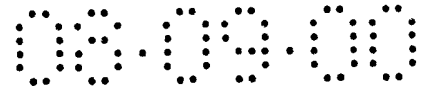
ACTAGGCAAA ATGTAGAAGG TTCATATGAG GGGGCATATG CTCCAGTACT TCAAGATTTT 3960
AGGTCATTAA ATGATTCAAC AAATAGAACA AAGAAACACA CAGCTCATTT CTCAAAAAAA 4020
GGGGAGGAAG AAAACTTGGA AGGCTTGGA AATCAAACCA AGCAAATTGT AGAGAAATAT 4080
GCATGCACCA CAAGGATATC TCCTAATACA AGCCAGCAGA ATTTTGTAC GCAACGTAGT 4140
AAGAGAGCTT TGAAACAATT CAGACTCCCA CTAGAAGAAA CAGAACTTGA AAAAAGGATA 4200
ATTGTGGATG ACACCTCAAC CCAGTGGTCC AAAAACATGA AACATTTGAC CCCGAGCACC 4260
CTCACACAGA TAGACTACAA TGAGAAGGAG AAAGGGGCCA TTA CTAGTC TCCCTTATCA 4320
GATTGCCTTA CGAGGAGTCA TAGCATCCCT CAAGCAAATA GATCTCCATT ACCCATTTGCA 4380
AAGGTATCAT CATTTCCATC TATTAGACCT ATATATCTGA CCAGGGTCTT ATTCCAAGAC 4440
AACTCTTCTC ATCTTCCAGC AGCATCTTAT AGAAAGAAAG ATTCTGGGGT CCAAGAAAGC 4500
AGTCATTTCT TACAAGGAGC CAAAAAAAT AACCTTCTT TAGCCATTCT AACCTTGGAG 4560
ATGACTGGTG ATCAAAGAGA GGTGGCTCC CTGGGGACAA GTGCCACAAA TTCAGTCACA 4620
TACAAGAAAG TTGAGAACAC TGTTCTCCCG AAACCAGACT TGCCCAAAAC ATCTGGCAAA 4680
GTTGAATTGC TTCCAAAAGT TCACATTTAT CAGAAGGACC TATTCCCTAC GGAAACTAGC 4740
AATGGGTCTC CTGGCCATCT GGATCTCGTG GAAGGGAGCC TTCTTCAGGG AACAGAGGGA 4800
GCGATTAAGT GGAATGAAGC AAACAGACCT GGAAAAGTTC CCTTTCTGAG AGTAGCAACA 4860
GAAAGCTCTG CAAAGACTCC CTCCAAGCTA TTGGATCCTC TTGCTTGGGA TAACCACTAT 4920
GGTACTCAGA TACCAAAAGA AGAGTGGAAA TCCCAAGAGA AGTCACCAGA AAAACAGCT 4980
TTTAAGAAAA AGGATAACCAT TTTGTCCCTG AACGCTTGTG AAAGCAATCA TGCAATAGCA 5040
GCAATAAATG AGGGACAAAA TAAGCCCGAA ATAGAAGTCA CCTGGGCAAA GCAAGGTAGG 5100
ACTGAAAGGC TGTGCTCTCA AAACCCACCA GTCTTGAAC 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 CCGTGGAGAA 5460
CTAAATGAAC ATTTGGGACT CCTGGGGCCA TATATAAGAG CAGAAGTTGA AGATAATATC 5520
ATGGTAACTT TCAGAAATCA GGCCTCTCGT CCCTATTCCT TCTATTCTAG CCTTATTTCT 5580
TATGAGGAAG ATCAGAGGCA AGGAGCAGAA CCTAGAAAAA ACTTTGTCAA GCCTAATGAA 5640



ACCAAACTT	ACTTTTGGAA	AGTGCAACAT	CATATGGCAC	CCACTAAAGA	TGAGTTTGAC	5700
TGCAAAGCCT	GGGCTTATTT	CTCTGATGTT	GACCTGGAAA	AAGATGTGCA	CTCAGGCCTG	5760
ATTGGACCCC	TTCTGGTCTG	CCACACTAAC	ACACTGAACC	CTGCTCATGG	GAGACAAGTG	5820
ACAGTACAGG	AATTTGCTCT	GTTTTTCACC	ATCTTTGATG	AGACCAAAAAG	CTGGTACTTC	5880
ACTGAAAATA	TGAAAGAAA	CTGCAGGGCT	CCCTGCAATA	TCCAGATGGA	AGATCCCCT	5940
TTTAAAGAGA	ATTATCGCTT	CCATGCAATC	AATGGCTACA	TAATGGATAC	ACTACCTGGC	6000
TTAGTAATGG	CTCAGGATCA	AAGGATTCGA	TGGTATCTGC	TCAGCATGGG	CAGCAATGAA	6060
AACATCCATT	CTATTCATTT	CAGTGGACAT	GTGTTCACTG	TACGAAAAAA	AGAGGAGTAT	6120
AAAATGGCAC	TGTACAATCT	CTATCCAGGT	GTTTTTGAGA	CAGTGGAAAT	GTTACCATCC	6180
AAAGCTGGAA	TTTGGCGGGT	GGAATGCCTT	ATTGGCGAGC	ATCTACATGC	TGGGATGAGC	6240
ACACTTTTTC	TGGTGTACAG	CAATAAGTGT	CAGACTCCCC	TGGGAATGGC	TTCTGGACAC	6300
ATTAGAGATT	TTCAGATTAC	AGCTTCAGGA	CAATATGGAC	AGTGGGCCCC	AAAGCTGGCC	6360
AGACTTCATT	ATTCCGGATC	AATCAATGCC	TGGAGCACCA	AGGAGCCCTT	TTCTTGGATC	6420
AAGGTGGATC	TGTTGGCACC	AATGATTATT	CACGGCATCA	AGACCCAGGG	TGCCCCGCAG	6480
AAGTTCTCCA	GCCTCTACAT	CTCTCAGTTT	ATCATCATGT	ATAGTCTTGA	TGGGAAGAAG	6540
TGGCAGACTT	ATCGAGGAAA	TTCCACTGGA	ACCTTAATGG	TCTTCTTTGG	CAATGTGGAT	6600
TCATCTGGGA	TAAAACACAA	TATTTTTAAC	CCTCCAATTA	TTGCTCGATA	CATCCGTTTG	6660
CACCCAACTC	ATTATAGCAT	TCGCAGCACT	CTTCGCATGG	AGTTGATGGG	CTGTGATTTA	6720
AATAGTTGCA	GCATGCCATT	GGGAATGGAG	AGTAAAGCAA	TATCAGATGC	ACAGATTACT	6780
GCTTCATCCT	ACTTTACCAA	TATGTTTGCC	ACCTGGTCTC	CTTCAAAGC	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	TCACCCCAG	7140
AGTTGGGTGC	ACCAGATTGC	CCTGAGGATG	GAGGTTCTGG	GCTGCGAGGC	ACAGGACCTC	7200
TACTGAGGGT	GGCCACTGCA	GCACCTGCCA	CTGCCGTCAC	CTCTCCCTCC	TCAGCTCCAG	7260
GGCAGTGTCC	CTCCCTGGCT	TGCCTTCTAC	CTTTGTGCTA	AATCCTAGCA	GACACTGCCT	7320
TGAAGCCTCC	TGAATTAAct	ATCATCAGTC	CTGCATTTCT	TTGGTGGGGG	GCCAGGAGGG	7380



TGCATCCAAT	TTAACTTAAC	TCTTACCTAT	TTTCTGCAGC	TGCTCCCAGA	TTACTCCTTC	7440
CTTCCAATAT	AACTAGGCAA	AAAGAAGTGA	GGAGAAACCT	GCATGAAAGC	ATTCTTCCCT	7500
GAAAAGTTAG	GCCTCTCAGA	GTCACCACTT	CCTCTGTTGT	AGAAAACTA	TGTGATGAAA	7560
CTTTGAAAA	GATATTTATG	ATGTTAACAT	TTCAGGTAA	GCCTCATACG	TTTAAAATAA	7620
AACTCTCAGT	TGTTTATTAT	CCTGATCAAG	CATGGAACAA	AGCATGTTTC	AGGATCAGAT	7680
CAATACAATC	TTGGAGTCAA	AAGGCAAATC	ATTTGGACAA	TCTGCAAAT	GGAGAGAATA	7740
CAATAACTAC	TACAGTAAAG	TCTGTTTCTG	CTTCCTTACA	CATAGATATA	ATTATGTTAT	7800
TTAGTCATTA	TGAGGGGCAC	ATTCTTATCT	CCAAAAGTAG	CATTCTTAAA	CTGAGAATTA	7860
TAGATGGGGT	TCAAGAATCC	CTAAGTCCCC	TGAAATTATA	TAAGGCATTC	TGTATAAATG	7920
CAAATGTGCA	TTTTTCTGAC	GAGTGTCCAT	AGATATAAAG	CCATTGGTCT	TAATTCTGAC	7980
CAATAAAAA	ATAAGTCAGG	AGGATGCAAT	TGTTGAAAGC	TTTGAAATAA	AATAACATGT	8040
CTTCTTGAAA	TTTGTGATGG	CCAAGAAAGA	AAATGATGAT	GACATTAGGC	TTCTAAAGGA	8100
CATACATTTA	ATATTTCTGT	GGAAATATGA	GGAAAATCCA	TGTTTATCTG	AGATAGGAGA	8160
TACAAACTTT	GTAATTCTAA	TAATGCCTC	AGTTTACTCT	CTCCCTCTAC	TAATTTCTG	8220
CTGAAAATAA	CACAACAAA	ATGTAACAGG	GGAAATTATA	TACCGTGACT	GAAAAGTAGA	8280
GTCCTACTTA	CATAGTTGAA	ATATCAAGGA	GGTCAGAAGA	AAATGGACT	GGTGAAAACA	8340
GAAAAACAC	TCCAGTCTGC	CATATCACCA	CACAATAGGA	TCCCCCTTCT	TGCCCTCCAC	8400
CCCCATAAGA	TTGTGAAGGG	TTTACTGCTC	CTTCCATCTG	CCTGCACCCC	TTCACTATGA	8460
CTACACAGAA	CTCTCCTGAT	AGTAAAGGGG	GCTGGAGGCA	AGGATAAGTT	ATAGAGCAGT	8520
TGGAGGAAGC	ATCCAAAGAC	TGCAACCCAG	GGCAAATGGA	AAACAGGAGA	TCCTAATATG	8580
AAAGAAAAAT	GGATCCCAAT	CTGAGAAAAG	GCAAAAGAAT	GGCTACTTTT	TTCTATGCTG	8640
GAGTATTTTC	TAATAATCCT	GCTTGACCCT	TATCTGACCT	CTTGGAAC	TATAACATAG	8700
CTGTACAGT	ATAGTCACAA	TCCACAAATG	ATGCAGGTGC	AAATGGTTTA	TAGCCCTGTG	8760
AAGTTCTTAA	AGTTTAGAGG	CTAACTTACA	GAAATGAATA	AGTTGTTTGT	TTTTATAGCC	8820
CGGTAGAGGA	GTTAACCCCA	AAGGTGATAT	GGTTTTATTT	CCTGTTATGT	TTAACTTGAT	8880
AATCTTATTT	TGGCATTCTT	TTCCCATGGA	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

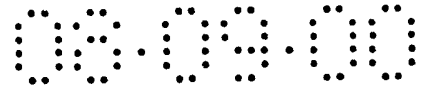
(v) TYP FRAGMENTU: N-koncový

(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

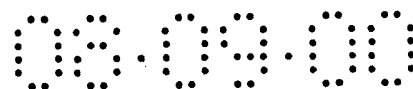
Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro
405 410 415

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

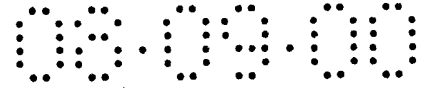
Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
705 710 715 720

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

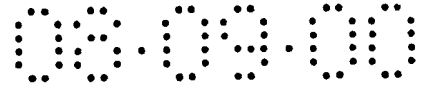
Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu Asn
1010 1015 1020

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

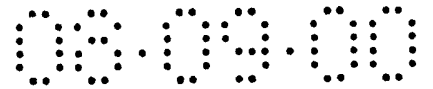
Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu Glu Thr Glu Leu Glu
1315 1320 1325

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

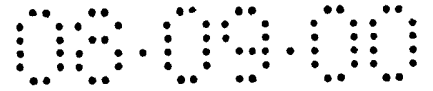
Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr
1620 1625 1630

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

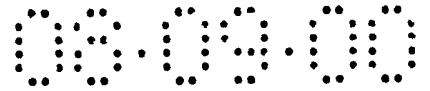
Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln
1925 1930 1935

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

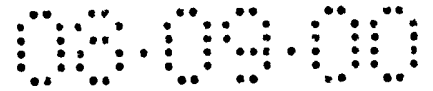
Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val
2225 2230 2235 2240

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:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :

- (A) DÉLKA: 1130 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: Prase
- (F) TYP TKÁNĚ: krev

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: různé znaky
- (B) POZICE: 1..1130
- (D) DALŠÍ INFORMACE: /produkt= "oblast"

/poznámka= "cDNA kódující doménu A2 prasečího faktoru VIII"

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

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

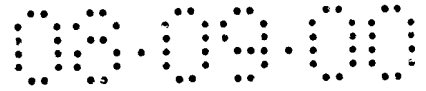
CAATCCGGAT GGATTACAGC CCCAGGATCC AGAGTTCCAA GCTTCTAACA TCATGCACAG 720
 CATCAATGGC TATGTTTTTG ATAGCTTGCA GCTGTCCGTT TGTTTGCACG AGGTGGCATA 780
 CTGGTACATT CTAAGTGTTG GAGCACAGAC GGA CTTCCTC TCCGTCTTCT TCTCTGGCTA 840
 CACCTTCAA CACAAAATGG TCTATGAAGA CACACTCACC CTGTTCCCCT TCTCAGGAGA 900
 AACGGTCTTC ATGTCAATGG AAAACCCAGG TCTCTGGGTC CTAGGGTGCC ACAACTCAGA 960
 CTTGCGGAAC 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:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :
 (A) DÉLKA: 368 aminokyselin
 (B) TYP: aminokyselina
 (C) TYP VLÁKNA: jednoduché
 (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: protein
- (iii) HYPOTETICKÁ: ano
- (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne
- (v) TYP FRAGMENTU: N-koncový
- (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:
 (A) ORGANISMUS: Prase
 (F) TYP TKÁNĚ: slezina
- (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."

(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 80

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
145 150 155 160

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
225 230 235 240

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
305 310 315 320

His Asn Ser Asp Leu Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala Leu Leu Lys Val
325 330 335

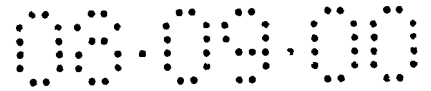
Tyr Ser Cys Asp Arg Asp Ile Gly Asp Tyr Tyr Asp Asn Thr Tyr Glu
340 345 350

Asp Ile Pro Gly Phe Leu Leu Ser Gly Lys Asn Val Ile Glu Pro Arg
 355 360 365

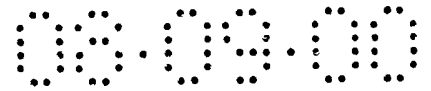
(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 5:

- (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:

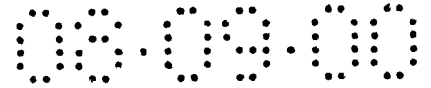
TCTAGAGTTT CTTTGCTACA GGTACCAAGG AACAGTCTTT TAGAATAGGC TAGGAATTTA



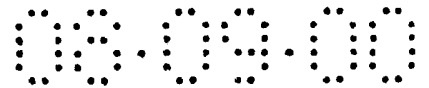
AATACACCTG AACGCCCCTC CTCAGTATTC TGTTCCTTTT CTTAAGGATT CAAACTTGTT 120
AGGATGCACC CAGCAGGAAA TGGGTTAAGC CTTAGCTCAG CCACTCTTCC TATTCCAGTT 180
TTCCTGTGCC TGCTTCCTAC TACCCAAAAG GAAGTAATCC TTCAGATCTG TTTTGTGCTA 240
ATGCTACTTT CACTCACAGT AGATAAACTT CCAGAAAATC CTCTGCAAAA TATTTAGGAC 300
TTTTTACTAA ATCATTACAT TTCTTTTTGT TCTTAAAAGC TAAAGTTATT TTAGAGAAGA 360
GTTAAATTTT CATTTCTTTA GTTGAACATT TTCTAGTAAT AAAAGCCATG CAAATAGCAC 420
TCTTCGCTTG CTTCTTTCTG AGCCTTTTCA ATTTCTGCTC TAGTGCCATC AGAAGATACT 480
ACCTTGGTGC AGTGGAAATTG TCCTGGAECT ATATTCAGAG TGATCTGCTC AGTGTGCTGC 540
ATACAGACTC AAGATTTCTT CCTAGAATGT CAACATCTTT TCCATTCAAC ACCTCCATCA 600
TGTATAAAAA GACTGTGTTT GTAGAGTACA AGGACCAGCT TTTCAACATT GCCAAGCCCA 660
GGCCACCCTG GATGGGTTTG CTAGGTCCTA CCATTTGGAC TGAGGTTTAT GACACAGTGG 720
TCATTACACT TAAAAACATG GCTTCTCATC CTGTGAGTCT 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
CCAAAGAAAAG AACACAGATG TTGTACCAAT TTGTACTGCT TTTTGCTGTA TTTGATGAAG 1080
GGAAGAGCTG GCACTCAGAA ACAAACGACT CTTATACACA GTCTATGGAT TCTGCATCTG 1140
CTAGAGACTG GCCTAAAATG CACACAGTCA ATGGCTATGT AAACAGGTCT CTTCCAGGTC 1200
TGATTGGATG CCATAGGAAA TCAGTCTACT GGCACGTGAT TGGAATGGGC ACCACTCCTG 1260
AAATACACTC AATATTCTC GAAGGTCACA CATTTTTTGT GAGGAACCAC CGTCAAGCTT 1320
CATTGGAGAT ATCACCAATA ACTTTCTTA CTGCTCAAAC ACTCTTGATA GATCTTGGGC 1380
AGTTCCTACT ATTTTGTGAT ATCTCTTCCC ATAAACATGA TGGCATGGAA GCTTATGTCA 1440
AAGTAGATAG CTGCCCTGAG GAATCCCAAT GGCAAAAGAA AAATAATAAT GAGGAAATGG 1500
AAGATTATGA TGATGATCTT TATTCAGAAA TGGATATGTT CACATTGGAT TATGACAGCT 1560
CTCCTTTTAT CCAAATTCGC TCGGTTGCTA AAAAGTACCC TAAAACCTGG ATACATTATA 1620
TTTCTGCTGA GGAGGAAGAC TGGGACTATG CACCTTCAGT TCCTACCTCG GATAATGGAA 1680
GTTATAAAAAG CCAGTATCTG AGCAATGGTC CTCATCGGAT TGGTAGGAAA TATAAAAAG 1740
TCAGATTTAT AGCATAACACA GATGAAACCT TTAAGACTCG TGAAACTATT CAGCATGAAT 1800



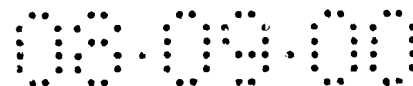
CAGGACTCTT	GGGACCTTTA	CTTTATGGAG	AAGTTGGAGA	CACACTGTTG	ATTATTTTTA	1860
AGAATCAAGC	AAGCCGACCA	TATAACATTT	ACCCTCATGG	AATCACTGAT	GTCAGTCCTC	1920
TACATGCAAG	GAGATTGCCA	AGAGGTATAA	AGCACGTGAA	GGATTTGCCA	ATTCATCCAG	1980
GAGAGATATT	CAAGTACAAG	TGGACAGTTA	CAGTAGAAGA	TGGACCAACT	AAATCAGATC	2040
CACGGTGCCT	GACCCGCTAT	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	TCTCAGTGT	GGAGCACAGA	2400
CAGACTTCTT	ATCTATCTTC	TTCTCTGGAT	ATACTTTCAA	ACACAAAATG	GTCTATGAAG	2460
ATACACTTAC	CCTGTTCCCA	TTCTCAGGAG	AAACTGTCTT	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	CCAAATGCAA	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
CAGGATTTC	AGATATGCCA	GTTCACTCTA	GTAGTAAATT	AAGTACTACT	GCATTTGGTA	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	AACAAAACAT	3480
ATAATCATTC	AACAATAAT	GAAAACTAC	ACACTGAGAG	CCCAACATCA	ATTGAGAATA	3540



GTACAACAGA	CTTGCAAGAT	GCCATATTAA	AGGTCAATAG	TGAGATTCAA	GAAGTAACAG	3600
CTTTGATTCA	TGATGGAACA	CTTTTAGGCA	AAAATTCTAC	ATATTTGAGA	CTAAACCATA	3660
TGCTAAATAG	AACTACCTCA	ACAAAAATA	AAGACATATT	TCATAGAAAA	GATGAAGATC	3720
CTATTCCACA	AGATGAAGAG	AATACAATCA	TGCCATTTTC	CAAGATGTTG	TTCTTGTCAG	3780
AATCTTCAA	TTGGTTTAAA	AAGACCAATG	GAAATAATTC	CTTGAACTCT	GAGCAAGAAC	3840
ATAGTCCAAA	GCAATTAGTA	TATTTAATGT	TTAAAAATA	TGTAAAAAAT	CAAAGTTTCT	3900
TGTCAGAGAA	AAATAAAGTC	ACAGTAGAAC	AGGATGGATT	TACAAAGAAC	ATAGGACTTA	3960
AAGACATGGC	TTTTCCACAT	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	ATAACAATT	CAACAAATAC	AGTACAGATT	CACATGGAGC	4260
ATTTCTTTAA	AAGAAGGAAG	GACAAGGAAA	CAAATTCAGA	AGGCTTGGTA	AATAAAACCA	4320
GAGAAATGGT	AAAAAATAT	CCAAGCCAGA	AGAATATTAC	TACTCAACGT	AGTAAACGGG	4380
CTTTGGGACA	ATTCAGACTG	TCAACTCAAT	GGCTTAAAAC	CATAAACTGT	TCAACACAGT	4440
GTATCATTAA	ACAGATAGAC	CACAGCAAGG	AAATGAAAAA	G TTCATTACT	AAATCTTCCT	4500
TATCAGATTC	TTCTGTGATT	AAAAGCACCA	CTCAGACAAA	TAGTTCTGAC	TCACACATTG	4560
TAAAAACATC	AGCATTTCCA	CCAATAGATC	TCAAAGGAG	TCCATTCCAA	AACAAATTTT	4620
CTCATGTTCA	AGCATCATCC	TACATTTATG	ACTTTAAGAC	AAAAAGTTCA	AGAATTCAAG	4680
AAAGCAATAA	TTTCTTAAAA	GAAACCAAAA	TAAATAACCC	TTCTTTAGCC	ATTCTACCAT	4740
GGAATATGTT	CATAGATCAA	GGAAAATTTA	CCTCCCCAGG	GAAAAGTAAC	ACAAACTCAG	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	TCAAACTGC	TAAATCATCA	TGCTTGGGAT	TATCATTATG	5100
CTGCACAGAT	ACCAAAGAT	ATGTGGAAAT	CCAAAGAGAA	GTCACCAGAA	ATTATATCCA	5160
TTAAGCAAGA	GGACACCATT	TTGTCTCTGA	GGCCTCATGG	AAACAGTCAT	TCAATAGGGG	5220
CAAATGAGAA	ACAAAATTGG	CCTCAAAGAG	AAACCACTTG	GGTAAAGCAA	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
GTTTGTGGG 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
AAAGGATTCG ATGGTATCTT CTCAGCATGG GCAACAATGA GAACATCCAA TCTATTCATT	6240
TCAGTGGACA TGTTTTCACT GTACGGAAAA AAGAGGAGTA TAAAATGGCA GTGTACAACC	6300
TCTACCCAGG TGTTTTTGAG ACTCTGGAAA TGATACCATC CAGAGCTGGA ATATGGCGAG	6360
TAGAATGCCT TATTGGCGAG CACTTACAGG CTGGGATGAG CACTCTTTTT CTGGTGTACA	6420
GCAAGCAGTG TCAGATTCTT CTTGGAATGG CTTCTGGAAG CATCCGTGAT TTCCAGATTA	6480
CAGCTTCAGG ACATTATGGA CAGTGGGCCC CAAACCTGGC AAGACTTCAT TATTCGGAT	6540
CAATCAATGC CTGGAGTACC AAGGAGCCCT TTTCTTGGAT CAAGGTAGAT CTGTTGGCAC	6600
CAATGATTGT TCATGGCATC AAGACTCAGG GTGCTCGTCA GAAATTTTCC AGCCTTTATA	6660
TCTCTCAATT TATCATCATG TATAGCCTGG ATGGGAAGAA GTGGCTGAGT TATCAAGGAA	6720
ATCCACTGG AACCTTAATG GTTTTCTTTG GCAATGTGGA CTCATCTGGG ATTAAGCATA	6780
ATAGTTTTAA TCCTCCAATT ATTGCTCGAT ATATCCGTTT GCACCCCACT CATTCTAGCA	6840
TCCGTAGTAC TCTTCGCATG GAGTTGATGG GCTGTGATTT AAACAGTTGC AGCATAACCAT	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 GGTTTTTTCAG GGAATCAGG ACTCATCCAC ACCTATGATG AATTCTCTAG 7260
ACCCACCATT ACTCACTCGC TATCTTCGAA TTCACCCCA GATCTGGGAG CACCAAATTG 7320
CTCTGAGGCT TGAGATTCTA GGATGTGAGG CCCAGCAGCA ATACTGAGGT AGCCTCTGCA 7380
TCACCTGCTT ATTCCCCTTC CTCAGCTCAA AGATTGTCTT AATGTTTTAT TGCTGTGAAG 7440
AGACACTATG ACCATGGCAA CTCTTTATAA AATAAAGCAT TTAATCAGGG CTT 7493

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 6:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :
(A) DÉLKA: 2319 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(C) TYP VLÁKNA: jednoduché
(D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: protein
- (iii) HYPOTETICKÁ: ano
- (iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne
- (v) TYP FRAGMENTU: N-koncový
- (vi) PŮVODNÍ ZDROJ:
(A) ORGANISMUS: *Mus musculus*
- (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
(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

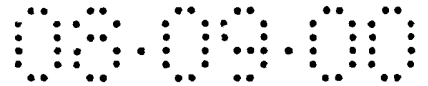
Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser
 260 265 270

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

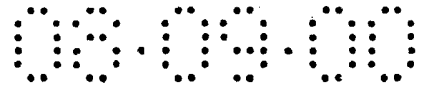
Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
565 570 575

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

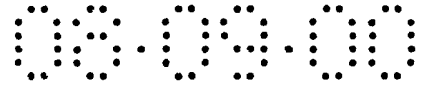
Glu Lys Ile Val Phe Thr Pro Gln Pro Gly Leu Gln Leu Arg Ser Asn
865 870 875 880

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

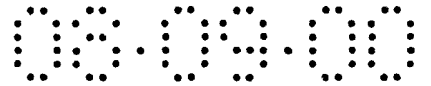
Asn Lys Val Thr Val Glu Gln Asp Gly Phe Thr Lys Asn Ile Gly Leu
1170 1175 1180

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

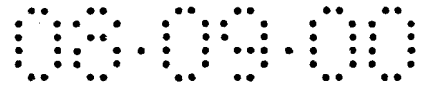
Ile Ile Phe Leu Lys Pro Thr Leu Pro Glu Glu Ser Gly Lys Ile Glu
1475 1480 1485

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

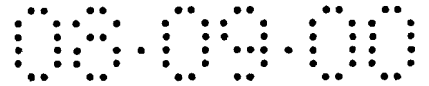
Leu Ile Ser Tyr Lys Glu Asp Gln Arg Gly Glu Glu Pro Arg Arg Asn
1780 1785 1790

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

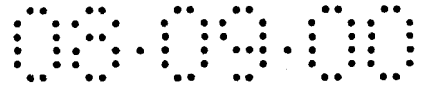
Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly
2085 2090 2095

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:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :

- (A) DÉLKA: 40 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 7:

CCTTCCTTTA TCCAAATACG TAGATCAAGA GGAAATTGAC

40

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 8:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :

- (A) DÉLKA: 29 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 8:

GTAGCGTTGC CAAGAAGCAC CCTAAGACG

29

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 9:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :

- (A) DÉLKA: 37 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 9:

GAAGAGTAGT ACGAGTTATT TCTCTGGGTT CAATGAC

37

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 10:

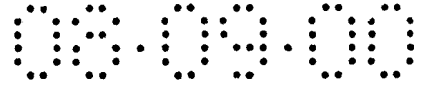
(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :

- (A) DÉLKA: 33 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 10:

CCTTTATCCA AATACGTAGC GTTTGCCAAG AAG

33

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 11:

(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

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

(ix) ZNAKY:

- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: různé znaky
- (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:

AARCAYCCNA ARACNTGGG

19

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 12:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :

- (A) DÉLKA: 25 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 12:

GCTCGCACTA GGGGTCTTG AATTC

25

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 13:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :
- (A) DÉLKA: 44 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: obě
 - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) TYP MOLEKULY: ostatní nukleová kyselina
- (A) DESCRIPTION: /desc = "oligonukleotidový primer, dvouvláknový od nukleotidů 37-44, 3' konec krátkého vlákna blokován aminoskupinou."
- (iii) HYPOTETICKÁ: ne
- (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."
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 13:

CTAATACGAC TCACTATAGG GCTCGAGCGG CCGCCCGGGC AGGT

44

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 14:

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

CCATCCTAAT ACGACTCACT ATAGGGC

27

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 15:

- (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 15:

CCATTGACAT GAAGACCGTT TCTC

24

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 16:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :
 - (A) DÉLKA: 23 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 16:

ACTCACTATA GGGCTCGAGC GGC

23

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 17:

- (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 17:

GGGTGCAAAG CGCTGACATC AGTG

24

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 18:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :

- (A) DÉLKA: 50 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 18:

CCTCTCGAGC CACCATGTGC AGCCACCATG CAGCTAGAGC TCTCCACCTG

50

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 19:

(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:

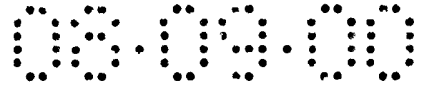
CGCGGGCCG CGCATCTGGC AAAGCTGAGT T

31

(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

(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
- (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."
- (xi) POPIS SEKVENCE: SEKVENCE S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 21:

AGGAAATTCC ACTGGAACCT TN

22

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 22:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :
 - (A) DÉLKA: 25 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: 1..25

(D) DALŠÍ INFORMACE:/poznámka="V pozici 25, N je A,G,C nebo T."

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

CTGGGGGTGA ATTCGAAGGT AGCGN

25

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 23:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :

(A) DÉLKA: 23 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 23:

GAGTTCATCG GGAAGACCTG TTG

23

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 24:

(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 24:

ACAGCCCATC AACTCCATGC GAAG

24

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 25:

- (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

(iv) OPAČNÁ ORIENTACE: ne

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

TCAGGGCAAT CAGGACTCC

19

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 26:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :
(A) DÉLKA: 21 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 26:

CCGTGGTGAA CGCTCTGGAC C

21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 27:

- (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 TGKGCCTCRC 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:

(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: ne

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

AATCAGGACT CCTCCACCCC CG

22

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 34:

(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: ano

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

CCTTGCAGGA ATTCGATTCA

20

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 35:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :

- (A) DÉLKA: 21 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 35:

CCGTGGTGAA CGCTCTGGAC C

21

(2) INFORMACE PRO SEKVENCI S IDENTIFIKAČNÍM ČÍSLEM 36:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :
 - (A) DÉLKA: 6402 párů bází
 - (B) TYP: nukleová kyselina
 - (C) TYP VLÁKNA: dvojité
 - (D) TOPOLOGIE: není relevantní

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA na mRNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

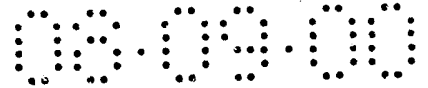
- (A) ORGANISMUS: Prase

(ix) ZNAKY:

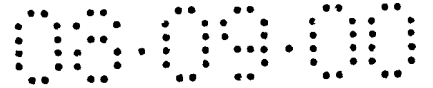
- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 1..6402

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

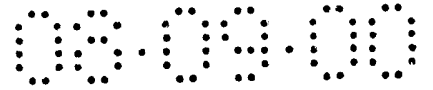
ATG CAG CTA GAG CTC TCC ACC TGT GTC TTT CTG TGT CTC TTG CCA CTC	48
Met Gln Leu Glu Leu Ser Thr Cys Val Phe Leu Cys Leu Leu Pro Leu	
1 5 10 15	
GGC TTT AGT GCC ATC AGG AGA TAC TAC CTG GGC GCA GTG GAA CTG TCC	96
Gly Phe Ser Ala Ile Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser	
20 25 30	
TGG GAC TAC CGG 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	



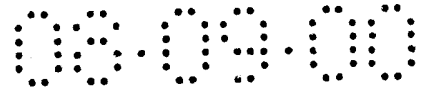
GTT GCC AGG CCC AGG CCA CCA TGG ATG GGT CTG CTG GGT CCT ACC ATC	288
Val Ala Arg Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile	
85 90 95	
CAG GCT GAG GTT TAC GAC ACG GTG GTC GTT ACC CTG AAG AAC ATG GCT	336
Gln Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Val Thr Leu Lys Asn Met Ala	
100 105 110	
TCT CAT CCC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



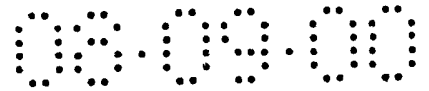
TCC	TTG	GAG	ATC	TCG	CCA	CTA	ACT	TTC	CTC	ACT	GCT	CAG	ACA	TTC	CTG	960
Ser	Leu	Glu	Ile	Ser	Pro	Leu	Thr	Phe	Leu	Thr	Ala	Gln	Thr	Phe	Leu	
305					310					315					320	
ATG	GAC	CTT	GGC	CAG	TTC	CTA	CTG	TTT	TGT	CAT	ATC	TCT	TCC	CAC	CAC	1008
Met	Asp	Leu	Gly	Gln	Phe	Leu	Leu	Phe	Cys	His	Ile	Ser	Ser	His	His	
				325					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				



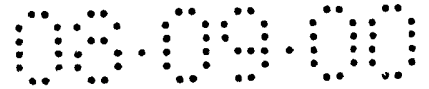
AAG TAT AAA TGG ACA GTG ACT GTG GAA GAT GGG CCA ACC AAG TCC GAT Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp 530 535 540	1632
CCT CGG TGC CTG ACC CGC TAC TAC TCG AGC TCC ATT AAT CTA GAG AAA Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Ile Asn Leu Glu Lys 545 550 555 560	1680
GAT CTG 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



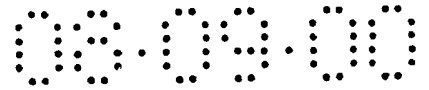
AAG AAT GTC ATT GAA CCC AGA AGC TTT GCC CAG AAT TCA AGA CCC CCT	2304
Lys Asn Val Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ala Gln Asn Ser Arg Pro Pro	
755 760 765	
AGT GCG AGC CAA AAG CAA TTC CAA ACC ATC ACA AGT CCA GAA GAT GAC	2352
Ser Ala Ser Gln Lys Gln Phe Gln Thr Ile Thr Ser Pro Glu Asp Asp	
770 775 780	
GTG GAG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



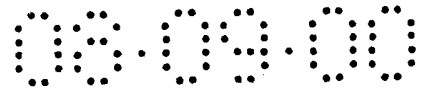
AAA GAC GAT GTT TTA TTT AAA GTT AAT ATC TCT TTG GTA AAG ACA AAC	2976
Lys Asp Asp Val Leu Phe Lys Val Asn Ile Ser Leu Val Lys Thr Asn	
980 985 990	
AAG GCA CGA GTT TAC TTA AAA ACT AAT AGA AAG ATT CAC ATT GAT GAC	3024
Lys Ala Arg Val Tyr Leu Lys Thr Asn Arg Lys Ile His Ile Asp Asp	
995 1000 1005	
GCA GCT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



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



CAC TCA GGC TTG ATC GGC CCC CTT CTG ATC TGC CGC GCC AAC ACC CTG 4992
His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Arg Ala Asn Thr Leu
1650 1655 1660

AAC GCT GCT CAC GGT AGA CAA GTG ACC GTG CAA GAA TTT GCT CTG TTT 5040
Asn Ala Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe
1665 1670 1675 1680

TTC ACT ATT TTT GAT GAG ACA AAG AGC TGG TAC TTC ACT GAA AAT GTG 5088
Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Val
1685 1690 1695

GAA AGG AAC TGC CGG GCC CCC TGC CAC CTG CAG ATG GAG GAC CCC ACT 5136
Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys His Leu Gln Met Glu Asp Pro Thr
1700 1705 1710

CTG AAA GAA AAC TAT CGC TTC CAT GCA ATC AAT GGC TAT GTG ATG GAT 5184
Leu Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Val Met Asp
1715 1720 1725

ACA CTC CCT GGC TTA GTA ATG GCT CAG AAT CAA AGG ATC CGA TGG TAT 5232
Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asn Gln Arg Ile Arg Trp Tyr
1730 1735 1740

CTG CTC AGC ATG GGC AGC AAT GAA AAT ATC CAT TCG ATT CAT TTT AGC 5280
Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser
1745 1750 1755 1760

GGA CAC GTG TTC AGT GTA CGG AAA AAG GAG GAG TAT AAA ATG GCC GTG 5328
Gly His Val Phe Ser Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Val
1765 1770 1775

TAC AAT CTC TAT CCG GGT GTC TTT GAG ACA GTG GAA ATG CTA CCG TCC 5376
Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser
1780 1785 1790

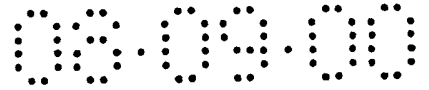
AAA GTT GGA ATT TGG CGA ATA GAA TGC CTG ATT GGC GAG CAC CTG CAA 5424
Lys Val Gly Ile Trp Arg Ile Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu Gln
1795 1800 1805

GCT GGG ATG AGC ACG ACT TTC CTG GTG TAC AGC AAG GAG TGT CAG GCT 5472
Ala Gly Met Ser Thr Thr Phe Leu Val Tyr Ser Lys Glu Cys Gln Ala
1810 1815 1820

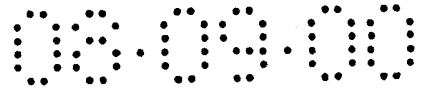
CCA CTG GGA ATG GCT TCT GGA CGC ATT AGA GAT TTT CAG ATC ACA GCT 5520
Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly Arg Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala
1825 1830 1835 1840

TCA GGA CAG TAT GGA CAG TGG GCC CCA AAG CTG GCC AGA CTT CAT TAT 5568
Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr
1845 1850 1855

TCC GGA TCA ATC AAT GCC TGG AGC ACC AAG GAT CCC CAC TCC TGG ATC 5616
Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Asp Pro His Ser Trp Ile
1860 1865 1870



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



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:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :
(A) DÉLKA: 2134 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLOGIE: lineární

(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

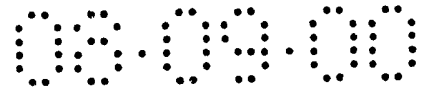
Gln Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Val Thr Leu Lys Asn Met Ala
100 105 110

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

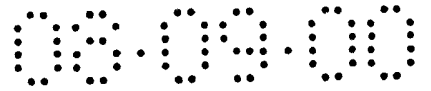
Trp Val His Tyr Ile Ser Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
405 410 415

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

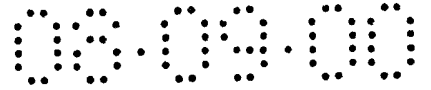
Gly Leu Trp Val Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Leu Arg Asn Arg Gly
705 710 715 720

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

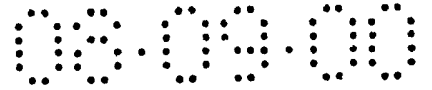
Ala Ala Leu Leu Thr Glu Asn Arg Ala Ser Ala Thr Phe Met Asp Lys
1010 1015 1020

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

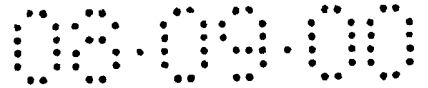
Gly Lys Ala Glu Phe Leu Pro Lys Val Arg Val His Arg Glu Asp Leu
1315 1320 1325

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

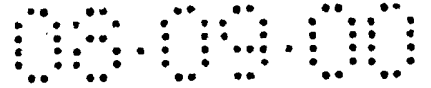
Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Glu Asp Glu Phe Asp
1620 1625 1630

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

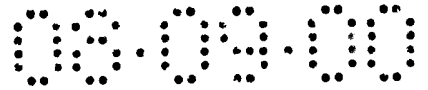
Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ala Ser Gly Ile
1925 1930 1935

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:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :

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

(ii) TYP MOLEKULY: cDNA na mRNA

(iii) HYPOTETICKÁ: ne

(vi) PŮVODNÍ ZDROJ:

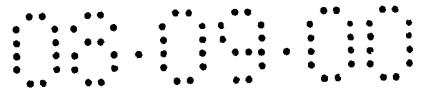
- (C) INDIVIDUÁLNÍ IZOLÁT: Faktor VIII postrádající doménu B

(ix) ZNAKY:

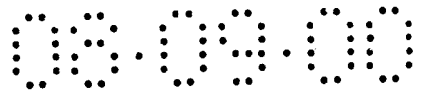
- (A) JMÉNO/OZNAČENÍ: CDS
- (B) POZICE: 3..4334

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

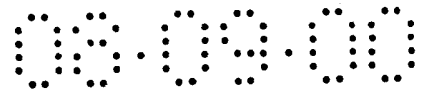
GA ATG CAG CTA GAG CTC TCC ACC TGT GTC TTT CTG TGT CTC TTG CCA
Met Gln Leu Glu Leu Ser Thr Cys Val Phe Leu Cys Leu Leu Pro
1 5 10 15



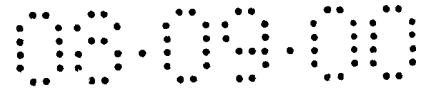
CTC	GGC	TTT	AGT	GCC	ATC	AGG	AGA	TAC	TAC	CTG	GGC	GCA	GTG	GAA	CTG	95
Leu	Gly	Phe	Ser	Ala	Ile	Arg	Arg	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ala	Val	Glu	Leu	
				20					25					30		
TCC	TGG	GAC	TAC	CGG	CAA	AGT	GAA	CTC	CTC	CGT	GAG	CTG	CAC	GTG	GAC	143
Ser	Trp	Asp	Tyr	Arg	Gln	Ser	Glu	Leu	Leu	Arg	Glu	Leu	His	Val	Asp	
			35					40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



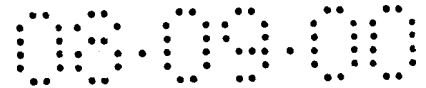
ATG GAT CCC GCA CCT GCC AGG GCC CAG CCT GCA ATG CAC ACA GTC AAT	767
Met Asp Pro Ala Pro Ala Arg Ala Gln Pro Ala Met His Thr Val Asn	
240 245 250 255	
GGC TAT GTC AAC AGG TCT CTG CCA GGT CTG ATC GGA TGT CAT AAG AAA	815
Gly Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Lys Lys	
260 265 270	
TCA GTC 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	



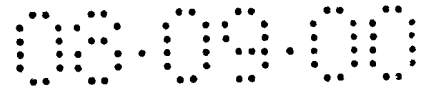
GAA TCA GGA ATC CTG GGA CCT TTA CTT TAT GGA GAA GTT GGA GAC ACA Glu Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr 465 470 475	1439
CTT TTG ATT ATA TTT AAG AAT AAA GCG AGC CGA CCA TAT AAC ATC TAC Leu Leu Ile Ile Phe Lys Asn Lys Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr 480 485 490 495	1487
CCT CAT 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 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



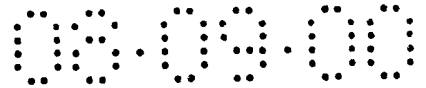
ACC CTG TTC CCC TTC TCA GGA GAA ACG GTC TTC ATG TCA ATG GAA AAC	2111
Thr Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn	
690 695 700	
CCA GGT CTC TGG GTC CTA GGG TGC CAC AAC TCA GAC TTG CGG AAC AGA	2159
Pro Gly Leu Trp Val Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Leu Arg Asn Arg	
705 710 715	
GGG ATG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



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



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:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE :
(A) DÉLKA: 1444 aminokyselin
(B) TYP: aminokyselina
(D) TOPOLOGIE: lineární

(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

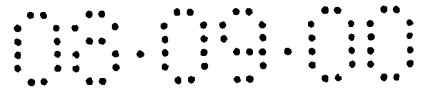
Trp Asp Tyr Arg Gln Ser Glu Leu Leu Arg Glu Leu His Val Asp Thr
35 40 45

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

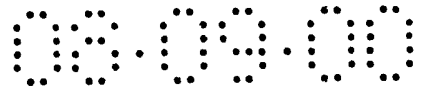
His Gly Gly Met Glu Ala His Val Arg Val Glu Ser Cys Ala Glu Glu
340 345 350

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

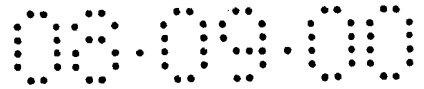
Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
645 650 655

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

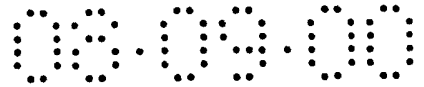
Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser
945 950 955 960

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

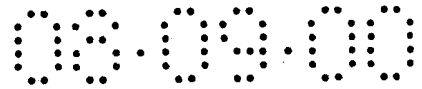
Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Val Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro
1250 1255 1260

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 :

- (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:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens

(ix) ZNAKY:

- (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:

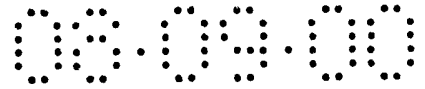
Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser



P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Izolovaná a purifikovaná DNA, která obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující aminokyselinovou sekvenci prasečího faktoru VIII uvedenou jako sekvence id. č. 37.
2. DNA podle nároku 1, která obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou zde jako sekvence id. č. 36.
3. 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.
4. DNA podle nároku 3, která obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou jako sekvence id. č. 36 od pozice 58 do 1173.
5. 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.
6. DNA podle nároku 5, která obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou jako sekvence id. č. 36 od pozice 4471 do 5460.
7. 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.



8. DNA podle nároku 7, která obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou jako sekvence id. č. 36 od pozice 5461 do 5919.
9. 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.
10. DNA podle nároku 9, která obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou jako sekvence id. č. 36 od pozice 5920 do 6399.
11. DNA podle nároku 1, kde nukleotidové sekvence kóduje aminokyselinovou sekvenci uvedenou jako sekvence id. č. 39.
12. DNA podle nároku 11, která obsahuje nukleotidovou sekvenci uvedenou jako sekvence id. č. 38.
13. DNA kódující hybridní lidský/prasečí faktor VIII obsahující substituce kódující sekvencí 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.
14. DNA podle nároku 13, kde kódující DNA prasečího faktoru VIII je sekvence nukleotidů 5944 až 6132 v sekvenci id. č. 36.
15. DNA kódující prasečí faktor VIII obsahující kodony kódující aminokyseliny 20 až 2133 v sekvenci id. č. 37.

16. DNA podle nároku 15, která má nukleotidovou sekvenci nukleotidů 58 až 6399 sekvence id. č. 36.
17. DNA kódující prasečí faktor VIII bez domény B, která obsahuje kodony kódující aminokyseliny 20 až 1443 v sekvenci id. č. 39.
18. DNA podle nároku 17, která má nukleotidovou sekvenci nukleotidů 60 až 4331 sekvence id. č. 38.
19. Izolovaný a purifikovaný protein, který je produktem exprese DNA podle nároku 17.
20. Izolovaný a purifikovaný protein, který je produktem exprese DNA podle nároku 18.
21. Modifikovaný lidský faktor VIII, který obsahuje substituce aminokyselin v jedné nebo několika pozicích 2181 až 2243 podle sekvence id. č. 2, kde tyto substituce jsou vloženy aminokyseliny redukující imunoreaktivitu na místo přirozeně se vyskytující aminokyseliny, přičemž modifikovaný faktor VIII má prokoagulační aktivitu.
22. Modifikovaný faktor VIII podle nároku 21, kde substituce jsou provedeny v jedné nebo více pozicích 2181, 2182, 2195, 2196, 2197, 2199, 2207, 2216, 2222, 2224, 2225, 2226, 2227, 2228, 2234, 2238 a 2243 podle sekvence id. č. 2.
23. Modifikovaný faktor VIII podle nároku 21, kde substituce jsou provedeny v jedné nebo více pozicích 2181, 2195,

2196, 2207, 2226, 2227, 2228 a 2234 podle sekvence id. č. 2.

24. Způsob modifikace faktoru VIII, takže jeho reaktivita s inhibičními protilátkami je nižší a přitom prokoagulační aktivita je zachována, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje krok, kdy se nahradí přirozeně se vyskytující aminokyselina alespoň v jedné pozici č. 2181 až 2243 podle sekvence id. č. 2 aminokyselinou snižující imunoreaktivitu.
25. Způsob podle nároku 24 v y z n a č u j í c í s e t í m, že substituce aminokyseliny v pozici č. 2181 až 2243 podle sekvence id. č. 2 je provedena pomocí exprese DNA kódující modifikovaný faktor VIII, přičemž tato DNA má alespoň jeden kodon modifikovaný tak, že v úseku aminokyselin č. 2181 až 2243 kóduje substituovanou aminokyselinu.
26. Způsob podle nároku 24 v y z n a č u j í c í s e t í m, že aminokyselina snižující imunoreaktivitu je alanin, methionin, leucin, serin nebo glycin.
27. Způsob podle nároku 26 v y z n a č u j í c í s e t í m, že aminokyselina snižující imunoreaktivitu je alanin.
28. Způsob podle nároku 24 v y z n a č u j í c í s e t í m, že substituce aminokyselinou snižující imunoreaktivitu je provedena alespoň v jedné pozici 2181, 2182, 2195, 2196, 2197, 2199, 2207, 2216, 2222, 2224, 2225, 2226, 2227, 2228, 2234, 2238 a 2243 podle sekvence id. č. 2.

29. Způsob přípravy prasečího faktoru VIII v y z n a č u j í c í s e t í m, 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.
30. Způsob podle nároku 29 v y z n a č u j í c í s e t í m, že DNA má nukleotidovou sekvenci v podstatě jako sekvence id. č. 36 obsahující přinejmenším nukleotidy 58 až 6399.
31. Způsob podle nároku 29 v y z n a č u j í c í s e t í m, že DNA kóduje aminokyselinovou sekvenci uvedenou zde jako sekvence id. č. 37.
32. Způsob podle nároku 31 v y z n a č u j í c í s e t í m, že DNA má nukleotidovou sekvenci uvedenou zde jako sekvence id. č. 36.
33. Způsob přípravy prasečího faktoru VIII bez domény B v y z n a č u j í c í s e t í m, 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.
34. Způsob podle nároku 33 v y z n a č u j í c í s e t í m, že DNA má nukleotidovou sekvenci v podstatě jako sekvence id. č. 38 obsahující přinejmenším nukleotidy 60 až 4331.

35. Způsob podle nároku 33 v y z n a č u j í c í s e t í m,
že DNA kóduje aminokyselinovou sekvenci uvedenou zde jako
sekvence id. č. 39.

36. Způsob podle nároku 33 v y z n a č u j í c í s e t í m,
že DNA má nukleotidovou sekvenci uvedenou zde jako
sekvence id. č. 38 od nukleotidu č. 3 do nukleotidu
č. 4331.

Signální peptid

člověk	-19	MQIELSTCFF	LCLLRFCFS
prase		MQLELSTCVF	LCLLPLGFS
myš		MQIALFACFF	LSLFNFCSS
		** * * *	* * *

Obr. 1A

Doména A1

člověk	1	ATRRYYLGAV	ELSWDYMQSD	LG-ELPVDAR	FPPRVPKSFP	FNTSVVYKKT
prase		AIRRYYLGA	ELSWDYRQSE	LLRELHVDTR	FPATAPGALP	LGPSVLYKKT
myš		AIRRYYLGA	ELSWNYIQSD	LLSVLHTDSR	FLPRMSTSFP	FNTSIMYKKT
		*****	**** * **	* * * * *	* * * * *	* * ****

Obr. 1B

50	LFVEFTDHLF	NIAKPRPPWM	GLLGPTIQAE	VYDVTVVITLK	NMASHPVSLH
	VFVEFTDQLF	SVARPRPPWM	GLLGPTIQAE	VYDVTVVITLK	NMASHPVSLH
	VFVEYKQLF	NIAKPRPPWM	GLLGPTIWTE	VHDTVVITLK	NMASHPVSLH
	*** * **	* *****	***** *	* * **** *	***** **

100	AVGVSYWYKAS	EGAEYDDQTS	QREKEDDKVF	PGGSHTYVWQ	VLKENGPMAS
	AVGVSWFKSS	EGAEYEDHTS	QREKEDDKVL	PGKSQTYVWQ	VLKENGPTAS
	AVGVSYWYKAS	EGDEYEDQTS	QMEKEDDKVF	PGESHTYVWQ	VLKENGPMAS
	***** * *	** ***** *	* ***** *	** * *****	***** **

150	DPLCLTYSYL	SHVDLVKDLN	SGLIGALLVC	REGSLAKEKT	QTLHKFILLF
	DPPCLTYSYL	SHVDLVKDLN	SGLIGALLVC	REGSLTRERT	QNLHEFVLLF
	DPPCLTYSYM	SHVDLVKDLN	SGLIGALLVC	KEGSLSKERT	QMLYQFVLLF
	*****	*****	*****	**** * *	* * * **

200	AVFDEGKSWH	SETKNSLMQD	RDAASARAWP	KMHTVNGYVN	RSLPGLIGCH
	AVFDEGKSWH	SARNSWTRA	MDPAPARAQP	AMHTVNGYVN	RSLPGLIGCH
	AVFDEGKSWH	SETNDSYTQS	MDSASARDWP	KMHTVNGYVN	RSLPGLIGCH
	*****	* *	* * * * *	*****	*****

250	RKSVYWHVIG	MGTTPEVHSI	FLEGHTFLVR	NHRQASLEIS	PITFLTAQTL
	KKSVYWHVIG	MGTSPEVHSI	FLEGHTFLVR	HHRQASLEIS	PLTFLTAQTF
	RKSVYWHVIG	MGTTPEIHSI	FLEGHTFFVR	NHRQASLEIS	PITFLTAQTL
	*****	*** ** **	***** **	*****	*****

300	LMDLGQFLLF	CHISSHQHDG	MEAYVKVDSC	PEEPQLRMKN	NEEAEDYDDD
	LMDLGQFLLF	CHISSHHGG	MEAHVRVESC	AEEPQLRKA	DE-EEDYDDN
	LIDLQFLLF	CHISSHKHDG	MEAYVKVDSC	PEESQWQKN	NN-EEMEDYD
	* *****	***** * *	*** * * **	** * *	* *

APC/IXa ♦

350	LTDSEMDVVR	FDDDNSPSFI	QIR
	LYDSMDVVR	LDGDDVSPFI	QIR
	DDLYSEMDMF	TLDYDSSPFI	QIR
		** ***	

Doména A2

člověk 373	SVAKKHPKTW	VHYIAAEED	WDYAPLVLAP	DDRSYKSQYL	NNGPQRIGRK
prase	SVAKKHPKTW	VHYISAEED	WDYAPAVPSP	SDRSYKSLYL	NSGPQRIGRK
myš	SVAKKYPKTW	IHYISAEED	WDYAPSVPTS	DNGSYKSQYL	SNGPHRIGRK
	*****	****	*****	*****	****

Obr. 1C

423	YKKVRFMAYT	DETFKTREAI	QHESGILGPL	LYGEVGD TLL	IIFKNQASRP
	YKKARFVAYT	DVTFKTRKAI	PYESGILGPL	LYGEVGD TLL	IIFKNKASRP
	YKKVRFIAYT	DETFKTRETI	QHESGLLGPL	LYGEVGD TLL	IIFKNQASRP
	*** ** **	* *****	* ** ** **	*****	*****

A2 inhibiční epitop

473	YNIYPHGITD	VRPLYSRRLP	KGVKHLKDFP	ILPGEIFKYK	WTVTVEDGPT
	YNIYPHGITD	VSALHPGRLL	KGWKHLKDMP	ILPGETFKYK	WTVTVEDGPT
	YNIYPHGITD	VSPLHARRLP	RGIKHVKDLP	IHPGEIFKYK	WTVTVEDGPT
	*****	* * **	** ** ** *	* ** ** **	*****

vazba faktorů IXa

APC

523	KSDPRCLTRY	YSSFVNMERD	LASGLIGPLL	ICYKESVDQR	GNQIMSDKRN
	KSDPRCLTRY	YSSINLEKD	LASGLIGPLL	ICYKESVDQR	GNQMMSDKRN
	KSDPRCLTRY	YSSFINPERD	LASGLIGPLL	ICYKESVDQR	GNQMMSDKRN
	*****	*** * * *	*****	*****	*** *****

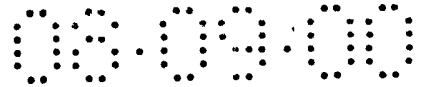
573	VILFSVFDEN	RSWYL TENIQ	RFLPNPAGVQ	LEDPEFQASN	IMHSINGYVF
	VILFSVFDEN	QSWYLAENIQ	RFLPNPDGLQ	PQDPEFQASN	IMHSINGYVF
	VILFSIFDEN	QSWYITENMQ	RFLPNAAKTQ	PQDPGFQASN	IMHSINGYVF
	*****	*** ** *	*****	** *****	*****

623	DSLQLSVCLH	EVAYWYILSI	GAQTDFLSVF	FSGYTFKHKM	VYEDTLTLFP
	DSLQLSVCLH	EVAYWYILSV	GAQTDFLSVF	FSGYTFKHKM	VYEDTLTLFP
	DSLELTVCLH	EVAYWHILSV	GAQTDFLSIF	FSGYTFKHKM	VYEDTLTLFP
	*** * ****	***** **	***** *	*****	*****

673	FSGETVFMSM	ENPGLWILGC	HNSDFRNRGM	TALLKVSSCD	KNTGDYYEDS
	FSGETVFMSM	ENPGLWVLGC	HNSDLRNRGM	TALLKVYSCD	RDIGDYYDNT
	FSGETVFMSM	ENPGLWVLGC	HNSDFRKRGM	TALLKVSSCD	KSTSDYYEEI
	*****	*****	***** * **	*****	* **

♦♦
IIa/Xa/APC

723	YEDISAYLLS	KNNAIEPR
	YEDIPGFLLS	GKNVIEPR
	YEDIPTQLVN	ENNVIDPR
	****	* * **

**Doména B**

člověk 741	SFSQNSRHPS	TRQKQFNATT	IPENDIEKTD	PWFAHRTMP	KIQNVSSSDL
prase	SFAQNSRPPS	ASQKQFQTIT	SPEDDVE-LD	PQSGERTQAL	EELSVPSGDG
myš	SFFQNTNHPN	TRKKKFKDST	IPKNDMEKIE	PQFEEIAEML	KVQSVSVSDM
	** ** *	* * *	* * ** *	*	* *
791	LMLLRQS-PT	PHGLSLSDLQ	EAKYETFSDD	PSPGAIDSNN	SLSEMTHFRP
	SMLLGQN-PA	PHGSSSDLQ	EARNEA--DD	YLPGARERNT	APSAAARLRP
	LMLLGQSHPT	PHGLFLSDGQ	EAIYEAIHDD	HSPNAIDSNE	GPSKVTQLRP
	*** *	*** * *	** * ** *	* * *	* **
840	QLHHSQDMVF	TPESGLQLRL	NEKLGTTAAT	ELKKLDFKVS	ST-SNNLIS-
	ELHHSQAEVRL	TPEP-----	-----EK	ELKKLDSKMS	SSDILLKTSP
	ESHHSQEKIVF	TPQPGLQLRS	NKSLETTIEV	KWKKLGLQVS	SLPSNLMTT-
	** * *	**		*** *	**
888	TIPSDNLAAGT	DNTSSLGPPS	MPVHYDSQLD	TTLFGKKSSP	LTESGGPLSL
	TIPSDTLAET	ERTHSLGPPH	PQVNFERSQLG	AIVLGKNSSH	FIGAGVPLGS
	TILSDNLKATF	EKTDSSGFPD	MPVHSSSKLS	TAFGKKAYS	LVGSHVPLNA
	** * * *	* * * *	* * *	**	**
939	SEENNSDKLL	ESGLMNSQES	SWGKNVSSTE	SGRLFKGKRA	HGPALLTKDN
	TEED-----	-----HES	SLGENVSPVE	SDGIFEKERA	HGPASLTKDD
	SEENSQSNIL	DSTLMYSQES	LPRDNILSIE	NDRLREKRF	HGIALLTKDN
	**	**	* *	*	** * ****
989	ALFKVISILL	KTNKTSNNSA	TNRKTHIDGP	SLLIENSPSV	WQNILESQTE
	VLFKVNISLV	KTNKARVYLK	TNRKIHIDDA	ALLTENRAS-	-----
	TLFKDNVSLM	KTNKTYNHST	TNEKLHTESP	TSIENSTTDL	QDAILKVNSE
	*** **	****	** * *		
1039	FKKVTPLIHD	RMLMDKNATA	LRLNHMSNKT	TSSKNMEMVQ	QKKEGPIPPD
	-----	ATFMDKNTTA	SGLNHVSN--	-----	-----
	IQEVTAIHD	GTLGKNSTY	LRLNHMLNRT	TSTKNKDIFH	RKDEDPIPPQ
	* **	**	*** *		
1089	AQNPDMSEFFK	MLFLPESARW	IQRTHGKNSL	NSGQGPSKQ	LVSLGPEKSV
	-----	-----W	IKGPLGKNPL	SSERGPSPEL	LTSSGSGKSV
	EENTIMPFSK	MLFLSESSNW	FKKTNGNNSL	NSEQEHSPKQ	LVYLMFKKYV
		*	* * *	* **	* **
1139	EGQNFLSEKN	KVVVGKGEFT	KDVGLKEMVF	PSSRNLFITN	LDNLHENNTH
	KGQSSGQGRI	RVAVEEEELS	KG---KEMML	PNSELTFLTN	SADVQGNQTH
	KNQSFLEKN	KVTVEQDGFT	KNIGLKDMAF	PHNMSIFLTT	LSNVHENGHR
	*	* *	* *	* ***	* **
1189	NQEKKIQEEI	EKKETLIQEN	VVLPQIHTVT	GTKNFMKNLF	LLSTRQNVG
	SQGKKSREEM	ERREKLVQEK	VDLPQVYTAT	GTKNFLRNIF	HQSTEPSVEG
	NQEKNIQEEI	EK-EALI EEK	VVLPQVHEAT	GSKNFLKDIL	ILGTRQNI--
	* *	* * *	* **	* **	
1239	SYDGAYAPVL	QDFRSLNDST	NRTKKHTAHF	SK--KGEEN	LEGLGNQTKQ
	FDGGSHAPVP	QDSRSLNDSA	ERAETHIAHF	SAIR--EEAP	LEAPGNRT--
	SLYEVHVPVL	QNITSINNST	NTVQIHMEHF	FKRRKDKETN	SEGLVNKTR
	**	* * * *	* **	*	* *

Obr. 1D

1287 IVEKYACTTR ISPNTSQNF VTQRSKRALK QFRLPLEETE LEKRIIVDDT
 ----- ---GPGRSA VPRRVKQSLK QIRLPLEEIK PERGVVLNAT
 MVKNYP---- -----SQKNI TTQRSKRALG QFRL-----

1337 STQWSKNMKH LTPSTLTQID YNEKEKGAIT QSPLSDCLTR SHSIPQANRS
 STRWS-----
 STQWLKTINC STQCIKQID HSKEMKKFIT KSSLSDS-SV IKSTTQTNSS
 ** *

1387 PLPIAKVSSF PSIRPIYLTR VLFQDNSSHL PAASY----R KKDSGVQESS
 -----ESS
 DSHIVKTSAF P---PIDLKR SPFQNKFSHV QASSYIYDFK TKSSRIQESN
 **

1433 HFLQGAKKNN LSLAILTLEM TGDQREVGSL GTSATNSVTY KKVENTVLPK
 PILQGAKRNN LSLPFLTLEM AGGQKISAL GKSAAGPLAS GKLEKAVLSS
 NFLKETKINN PSLAILPWNM FIDQKFTSP GKSNTNSVTY KKRENIIFLK
 * * * * * * * * * *

1483 PDLPKTSGKV ELLPKVHIYQ KDLFPTETSN GSPGHLDLVE GSLLQGTEGA
 AGLSEASGKA EFLPKVRVHR EDLLPQKTSN VSCAHGDLGQ EIFLQKTRGP
 PTLPEESGKI ELLPQVSIQE EEILPTETSH GSPGHLNLMK EVFLQKIQGP
 *** * * * * * * * * *

1533 IKWNEANRPG KVPFLRVATE SSAKTPSKLL DPLAWDNHYG TQIPKEEWS
 VNLNKVNRPG -----RTPSKLL -----G PPMPKE-WES
 TKWNKAKRHG ESIGKTES- -SKNTRSKLL NHHAWDYHYA AQIPKDMWS
 * * * * * * * * *

1583 QEKSPEKTAF KKKDTI-LSLN ACESNHAIAA INEQNKPEI EVTWAKQGRT
 LEKSPKSTAL RTKDIISLPLD RHESNHSIAA KNEGQAETQR EAAWTKQGGP
 KEKSPEIISI KQEDTI-LSLR PHGNSHSIGA -NEKQNPQR ETTWVKQGQT
 **** * * * * * * * *

1633 ERLCSONPPY LKRHQR
 GRLCAPKPPV LRRHQR
 QRTCSQIPPV LKRHQR
 * * * * * * * *

Aktivační peptid lehkého řetězce

člověk 1649 EITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPR I Ia/Xa
 prase DISLPTFQPEEDKMDYDDIFSTETKGEDFDIYGEDENQDPR
 myš EL--SAFQSEQEATDYDDAITIET-IEDFDIYSEDIKQGP
 * * * * * * * * *

Obr. 1E

Doména A3

				IXa Xa		
člověk	1690	SFQKKTRHYF	IAAVERLWDY	GMSSSPHVLK	NRAQSGSVKQ	FKKWFQEFK
prase		SFQKRTRHYF	IAAVEQLWDY	GMSESPRALR	NRAQNGEVPR	FKKWFREFA
myš		SVQKQTRHYF	IAAVERLWDY	GMSTS-HVLK	NRYQSDNVKQ	FKKWFQEFK
		* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *	* * * * *

Obr. 1F

1740	DGSFTQPLYR	GELNEHLGLL	GPYIRAEVED	NIMVTFRNQA	SRPYSFYSSL
	DGSFTQPSYR	GELNKHLGLL	GPYIRAEVED	NIMVTFKNQA	SRPYSFYSSL
	DGSFSQPLYR	GELNEHLGLL	GPYIRAEVED	NIMVTFKNQA	SRPYSFYSSL
	****	** **	**** * * * *	*****	*****

vazba faktorů IXa

1790	<u>ISYEEDQRQG</u>	<u>AEPRKNFVKP</u>	<u>NETKTYFWKV</u>	<u>QHHMAPTKDE</u>	<u>FDCKAWAYFS</u>
	ISYPDDQEQG	AEPRHNFVQP	NETRTYFWKV	QHHMAPTEDE	FDCKAWAYFS
	ISYKEDQR-G	EEPRRNFVKP	NETKIYFWKV	QHHMAPTEDE	FDCKAWAYFS
	*** ** *	*** ** *	*** *****	*****	*****

1840	DVDLEKDVHS	GLIGPLLVCH	TNTLNPAHGR	QVTVQEFALF	FTIFDETSK
	DVDLEKDVHS	GLIGPLLICR	ANTLNAAHGR	QVTVQEFALF	FTIFDETSK
	DVDLERDMHS	GLIGPLLICR	ANTLNPAHGR	QVSVQEFALL	FTIFDETSK
	*****	* **	***** *	**** *****	*****

1890	YFTENMERNK	RAPCNIQMED	PTFKENYRFH	AINGYIMDTL	PGLVMAQDQR
	YFTENVERNK	RAPCHLQMED	PTLKENYRFH	AINGYVMDTL	PGLVMAQNQR
	YFTENVKRNK	KTPCNFQMED	PTLKENYRFH	AINGYVMDTL	PGLVMAQDQR
	*****	***	* * * * *	*****	*****

1940	IRWYLLSMGS	NENIHSIHFS	GHVFTVRKKE	EYKMALYNLY	PGVFETVEML
	IRWYLLSMGS	NENIHSIHFS	GHVFSVRKKE	EYKMAVYNLY	PGVFETVEML
	IRWYLLSMGN	NENIQSIHFS	GHVFTVRKKE	EYKMAVYNLY	PGVFETLEMI
	*****	*****	*****	*****	*****

vazba proteinů C

1990	PSKAGIWRVE	<u>CLIGEHLHAG</u>	<u>MSTLFLVYSN</u>
	PSKAGIWRIE	CLIGEHLQAG	MSTTFLVYSK
	PSRAGIWRVE	CLIGEHLQAG	MSTLFLVYSK
	**	*****	** *****

Doména C1

člověk 2020 KCQTPLGMAS GHIRDFQITA SGQYGQWAPK LARLHYSGSI NAWSTKEPFS
 prase ECQAPLGMAS GRIRDFQITA SGQYGQWAPK LARLHYSGSI NAWSTKDPHS
 myš QCQIPLGMAS GSIRDFQITA SGHYGQWAPN LARLHYSGSI NAWSTKEPFS
 ** *

Obr. 1G

2070 WIKVDLLAPM IIHGIKTQGA RQKFSSLYIS QFIIMYSLDG KKWQTYRGNS
 WIKVDLLAPM IIHGIMTQGA RQKFSSLYIS QFIIMYSLDG RNWQSYRGNS
 WIKVDLLAPM IVHGIKTQGA RQKFSSLYIS QFIIMYSLDG KKWLSYQGNS
 *

2120 TGTLMVFFGN VDSSGIKHN I FNPPIIARYI RLHPHYSIR STLRMELMGCDLN
 TGTLMVFFGN VDASGIKHN I FNPPIVARYI RLHPHYSIR STLRMELMGCDLN
 TGTLMVFFGN VDSSGIKHN S FNPPIIARYI RLHPHSSIR STLRMELMGCDLN
 *

Doména C2

inhibitorový epitop

člověk 2173 SCSMPLGMES KAISDAQITA SSYFTNMFAT WSPSKARLHL QGRSNAWRPQ
 prase SCSMPLGMQN KAISDSQITA SSHLSNIFAT WSPSQARLHL QGRTNAWRPR
 myš SCSIPLGMES KVISDTQITA SSYFTNMFAT WSPSQARLHL QGRTNAWRPQ
 *

Obr. 1H

C2
 2223 VNNPKEWLQV DFQKTMKVTG VTTQGVKSLL TSMYVKEFLI SSSQDGHQWT
 VSSAEEWLQV DLQKTVKVTG IITQGVKSLL SSMYVKEFLV SSSQDGRRT
 VNDPKQWLQV DLQKTMKVTG IITQGVKSLF TSMFVKEFLI SSSQDGHHT
 *

vazba fosfolipidu

2273 LFFQNGKVKV FQGNQDSFTP VVNSLDPPLL TRYLRIHPOS WWHQIALRME
 LFLQDGHTKV FQGNQDSSTP VVNALDPPLF TRYLRIHPTS WAQHIALRLE
 QILYNGKVKV FQGNQDSSTP MMNSLDPPLL TRYLRIHPOI WEHQIALRLE
 *

2323 VLGCEAQLY
 VLGCEAQLY
 ILGCEAQQY
 * * * * * * * *