

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034494**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.02.13

(21) Номер заявки
201390617

(22) Дата подачи заявки
2011.10.27

(51) Int. Cl. *A61K 38/37* (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(54) ПЕПТИД ФАКТОРА VIII ДЛЯ ИНДУЦИРОВАНИЯ ИММУННОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ И ИММУНОДИАГНОСТИКИ

(31) 61/407,402; 61/467,894; 61/502,476

(32) 2010.10.27; 2011.03.25; 2011.06.29

(33) US

(43) 2013.10.30

(86) PCT/US2011/058165

(87) WO 2012/058480 2012.05.03

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

(56) WO-A1-03087161
WO-A2-2009095646

(72) Изобретатель:
**Штайнитц Катарина Нора (AT),
Вильгельмина Ван Хелден Паула
Мария (NL), Райперт Биргит Мария,
Шварц Ханс-Петер, Эрлих Хартмут
(AT)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к пептиду фактора VIII (FVIII), способному индуцировать иммунную толерантность к FVIII; слитому белку и фармацевтической композиции, содержащим заявленный пептид FVIII; применению заявленного пептида FVIII в соответствующем способе. Также изобретение относится к способу получения заявленного пептида FVIII и способу идентификации Т-клетки, специфичной к пептиду FVIII.

034494 B1

034494 B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет предварительной патентной заявки США с серийным № 61/407402, поданной 27 октября 2010 г., предварительной патентной заявки США с серийным № 61/467894, поданной 25 марта 2011 г., и предварительной патентной заявки США с серийным № 61/502476, поданной 29 июня 2011 г., описание которых полностью включено в настоящее описание посредством ссылок для всех целей.

Справка о правах на изобретения, полученная в ходе НИР или ОКР, финансируемой из федерального бюджета

Неприменима.

Ссылка на список последовательностей, таблицу или листинг компьютерной программы, прилагаемые на компакт-диске

Неприменима.

Уровень техники

Фактором VIII (FVIII) является белок, находящийся в плазме крови, который действует как кофактор в каскаде реакций, ведущих к свертыванию крови. Гемофилия А вызывается снижением или недостаточностью функционального белка FVIII и является одним из наиболее распространенных нарушений свертываемости крови, которое затрагивает приблизительно 1 из 5000-10000 мужчин. Клинические симптомы при гемофилии являются частыми мышечными и суставными кровотечениями, и травма может даже привести к опасным для жизни ситуациям. В настоящее время эффективные способы лечения гемофилии включают замещение отсутствующего белка фактора VIII с использованием внутривенного введения продуктов FVIII, полученных рекомбинантным путем или из плазмы крови. Такие препараты обычно вводят либо в ответ на кровотечение (терапия по требованию), либо через небольшие регулярные промежутки времени для предотвращения неконтролируемого кровотечения (профилактика). К сожалению, появление нейтрализующих антител против FVIII (ингибиторов FVIII) является основным осложнением при заместительной терапии продуктами FVIII. Примерно у 25% пациентов, получающих лечение, развивается этот иммунитет к белку FVIII, что сильно затрудняет дальнейший контроль кровотечения.

Причина этого иммунного ответа на белок фактора VIII не до конца ясна, однако специфические особенности иммунной системы пациентов могут влиять на их реакцию на лечение. Обычно у иммунной системы развивается толерантность к определенным антигенам, например "собственным" антигенам. Эта особенность является важной, так как в противном случае, если собственный антиген распознается как чужеродный антиген, это приводит к аутоиммунному заболеванию. Пациенты с гемофилией А, в частности, обладают генетическим дефектом в гене фактора VIII, что приводит к тому, что иммунная система не распознает введенный белок FVIII как "собственный" антиген. Таким образом, при введении белка FVIII во время заместительной терапии фактором свертывания иммунная система пациента распознает белок фактора VIII как чужеродный антиген или модифицированный собственный белок и, соответственно, вырабатывает антитела против FVIII.

Ингибиторы фактора VIII, т.е. антитела против FVIII, продуцируются плазмócитами, полученными из В-клеток, специфичных к FVIII. Для пролиферации и дифференцировки в плазмócиты продуцирующие антитела против FVIII, В-клетки нуждаются в помощи активированных CD4⁺ Т-клеток. Например, белок фактора VIII распознается В- и Т-лимфоцитами по-разному. Индукция антител против фактора VIII зависит от Т-хелперов. В-клетки распознают эпитопы цельного белка через специфический В-клеточный рецептор. Т-клетки, с другой стороны, распознают белки в виде переработанных пептидов, находящихся в комплексе с молекулой МНС II класса, представленной на поверхности антиген-представляющей клетки. Каждый клон CD4⁺ Т-клеток распознает только один специфический комплекс пептид-МНС. Для представления пептидов Т-клеткам, МНС класса II молекулы имеют открытую связывающую бороздку, дающую возможность встраивания и представления на поверхности клетки пептидов различной длины. Кроме того, белок МНС II класса содержит четыре связывающих кармана, которые отличаются у различных гаплотипов (Jones et al., Nature Rev. Immunol. 6:271-282 (2006)). Только определенные аминокислоты встраиваются в эти связывающие карманы, а минимальный размер связывающих пептидов составляет девять аминокислот. Примечательно, что различные гаплотипы МНС II класса могут представлять различные пептиды. Таким образом, гаплотип МНС II класса пациента, вероятно, влияет на риск образования антител против фактора VIII. Действительно, некоторые исследования показали, что существует корреляция гаплотипа МНС II класса человека HLA-DRB1*1501 с повышенным риском образования антител против фактора VIII (Pavlova et al., J. Thromb. Haemost. 7:2006-2015 (2009); Oldenburg et al., Thromb. Haemost. 77:238-242 (1997); Hay et al., Thromb. Haemost. 77:234-237 (1997)).

Для решения проблем, связанных с лечением гемофилии путем введения белка фактора VIII, исследованы некоторые подходы. Например, в WO 03/087161 раскрыты модифицированные белки FVIII, в которых иммунные характеристики белка FVIII модифицированы путем снижения или удаления ряда потенциальных эпитопов для Т-клеток, присутствующих в составе белка. Идентифицирован ряд областей, включающих эпитопы для Т-клеток в составе белка фактора VIII, включая, например, FVIII²⁰³⁰⁻²⁰⁴⁴. Согласно настоящему раскрытию удаление таких областей может использоваться для получения функ-

ционального белка фактора VIII, не индуцирующего продукцию антител против фактора VIII. В WO 09/071886 также описаны специфические области белка фактора VIII, которые, согласно прогнозам, приводят к образованию HLA-DR2-связывающих пептидов, участвующих в иммунном ответе пациента, таких как, например, FVIII⁴⁷⁵⁻⁴⁹⁵, FVIII⁵⁴²⁻⁵⁶², FVIII¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ и FVIII²¹⁵⁸⁻²¹⁷⁸. Указанные пептиды были идентифицированы с целью их возможного использования при индукции иммунной толерантности у пациента.

Несмотря на достижения в области определения областей белка FVIII, вовлеченных в иммунный ответ, по-прежнему существует необходимость выявления других областей белка FVIII, которые можно использовать для разработки других терапевтических пептидов и способов которые можно, например, использовать для лечения пациентов с гемофилией А.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение основано на идентификации областей белка фактора VIII, связанных с иммунным ответом против молекул фактора VIII. Конкретнее, пептид фактора VIII, включающий область белка фактора VIII, можно использовать для индукции толерантности к фактору VIII человека у пациентов, например, с гемофилией А. Кроме того, указанный пептид FVIII можно использовать в целях иммунодиагностики для мониторинга пациентов с гемофилией А во время заместительной терапии и во время индукции иммунной толерантности.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает пептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 344.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения вышеуказанного пептида FVIII, включающий стадии: а) обеспечение культуры клеток, содержащей полинуклеотид, кодирующий указанный пептид фактора VIII, и б) экспрессия указанного пептида в культуре клеток.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу идентификации Т-клетки, специфичной к пептиду фактора VIII, включающему: а) объединение множества CD4⁺ Т-клеток с вышеуказанным пептидом в комплексе с мультимером МНС II класса, и б) идентификацию по меньшей мере одного из членов множества CD4⁺ Т-клеток, специфичного к указанному пептиду, образующему комплекс с мультимером МНС II класса.

В одном варианте воплощения вышеприведенных способов мультимер МНС II класса является тетрамером МНС II класса.

В одном варианте воплощения вышеприведенных способов пептид или мультимер МНС II класса дополнительно включают обнаруживаемую группу.

В одном варианте воплощения вышеприведенных способов указанный способ дополнительно включает выделение по меньшей мере одной CD4⁺ Т-клетки, специфической к указанному пептиду.

В одном варианте воплощения вышеприведенных способов CD4⁺ Т-клетки выделяют с использованием проточной цитометрии.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает слитый белок, включающий вышеуказанный пептид фактора VIII и второй пептид.

В одном варианте воплощения вышеприведенных способов указанный второй пептид является репортерным пептидом.

В одном варианте воплощения вышеприведенных способов слитый белок кодируется нуклеиновой кислотой.

В одном варианте воплощения вышеприведенных способов пептид FVIII химически связан со вторым пептидом.

В одном аспекте вышеуказанный пептид FVIII используют для индукции иммунной толерантности к фактору VIII человека для профилактики образования ингибиторов FVIII.

В одном аспекте вышеуказанный пептид FVIII используют для индукции иммунной толерантности к фактору VIII человека для лечения пациентов с сформировавшимися ингибиторами фактора VIII.

В одном аспекте вышеуказанный пептид FVIII используют для идентификации антиген-специфических Т-клеток.

Краткое описание чертежей

Неприменимо.

Подробное описание изобретения

I. Введение.

Настоящее изобретение относится к пептидам фактора VIII (FVIII), которые можно использовать для индукции толерантности к белку FVIII, например, у пациентов с гемофилией А. Кроме того, указанные пептиды можно использовать в целях иммунодиагностики для мониторинга FVIII-специфических Т-клеток пациентов с гемофилией А во время заместительной терапии и во время терапии индукции иммунной толерантности.

Настоящее изобретение частично основано на открытии, заключающемся в том, что несколько областей FVIII, в частности FVIII¹⁰²⁻¹²², FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶ и FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴, вовлечены в иммунный ответ против белка FVIII, развивающийся при заместительной терапии фактором VIII или связанный с приобретенной гемофилией.

Идентифицированные аминокислотные последовательности указанных областей являются

TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO: 740), AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO: 68) и QANRSPLIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344) соответственно. Считается, что настоящее изобретение впервые обеспечивает идентификацию указанных областей белка фактора VIII и их отношение к иммунному ответу на белок фактора VIII.

Пептиды по настоящему изобретению включают пептиды, содержащие по меньшей мере часть областей FVIII¹⁰²⁻¹²², FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶ и FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴, образующих комплексы с молекулой МНС II класса, формируя Т-клеточный эпитоп, который может распознаваться Т-клетками, участвующими в иммунном ответе пациента. В некоторых вариантах воплощения пептиды включают по меньшей мере девять смежных аминокислот, соответствующих девяти смежным аминокислотам в FVIII¹⁰²⁻¹²², FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶ или FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴. Как далее описано ниже, пептиды, представленные здесь, также включают пептиды, длина которых превышает девять аминокислот, а также варианты последовательностей FVIII¹⁰²⁻¹²², FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶, и FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴. Такая идентификация пептидов по настоящему изобретению может иметь значение для усовершенствованных и перспективных терапевтических стратегий, предназначенных для лечения заболеваний, связанных с свертыванием крови, например гемофилии А.

II. Определения.

Термин "белок фактора VIII" или "белок FVIII" относится к любой молекуле FVIII, содержащей, по меньшей мере, фрагмент интактного домена В и обладающей биологической активностью, ассоциированной с нативным белком фактора VIII человека. Молекула фактора VIII может быть полноразмерным фактором VIII. Молекула фактора VIII также может быть консервативно модифицированным вариантом нативного фактора VIII. Белок FVIII можно получить из плазмы человека или продуцировать с помощью способов рекомбинантной инженерии. Дополнительное описание характеристик белка фактора VIII можно, например, найти в абзацах заявки US 2010/0168018, включенной в настоящий документ посредством ссылки.

Термин "пептид фактора VIII" или "пептид FVIII" относится к пептидам, описанным здесь, включающим аминокислотную последовательность, соответствующую области белка фактора VIII, которая, как обнаружено, играет важную роль в иммунном ответе против FVIII. Пептид фактора VIII включает по меньшей мере девять аминокислот, образующих комплекс с белком МНС II класса для представления Т-клеткам, участвующим в иммунном ответе. На любом конце указанных по меньшей мере девяти сердцевинных аминокислот пептида могут присутствовать дополнительные аминокислоты. В некоторых вариантах воплощения пептид фактора VIII может включать последовательность, идентичную определенной области нативного белка фактора VIII человека. В других вариантах воплощения пептид фактора VIII может быть консервативно модифицированным вариантом области белка фактора VIII. Как описано далее, пептид фактора VIII может характеризоваться определенным процентом идентичности, например 85% идентичностью, по отношению к последовательности области нативного белка фактора VIII человека.

Термин "аминокислота" относится к природным и неприродным аминокислотам, в том числе аналогам аминокислот и имитаторам аминокислот, функционирующим аналогично природным аминокислотам. Природные аминокислоты включают аминокислоты, кодируемые генетическим кодом, а также аминокислоты, подвергающиеся последующим изменениям, например, гидроксипролин, γ-карбоксиглутамат и О-фосфосерин. Природные аминокислоты могут включать, например, D- и L-аминокислоты. Аминокислоты, используемые здесь, могут также включать неприродные аминокислоты. Аналоги аминокислот относятся к соединениям, которые имеют основную химическую структуру, аналогичную природной аминокислоте, т.е. любой атом углерода, связанный с атомом водорода, карбоксильную группу, аминогруппу и R-группу, например гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид или метионинметилсульфоний. Такие аналоги содержат модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные каркасы, но сохраняют ту же основную химическую структуру, что и природная аминокислота. Имитаторы аминокислот относятся к химическим соединениям, обладающим структурой, отличающейся от общей химической структуры аминокислоты, но функционирующим аналогично природной аминокислоте. Аминокислоты могут упоминаться здесь либо с помощью общеизвестных трехбуквенных обозначений, либо с помощью однобуквенных обозначений, рекомендованных комиссией по биохимической номенклатуре Международного союза теоретической и прикладной химии Международного биохимического союза (IUPAC-IUB). Аналогичным образом, нуклеотиды могут упоминаться с помощью их общепринятых однобуквенных кодов.

"Консервативно модифицированные варианты" относятся как к аминокислотным, так и к нуклеотидным последовательностям. По отношению к определенным нуклеотидным последовательностям консервативно модифицированные варианты относятся к нуклеиновым кислотам, кодирующим идентичные или практически идентичные аминокислотные последовательности, либо, если нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, к практически идентичным последовательностям. Из-за вырожденности генетического кода большое количество функционально идентичных нуклеиновых кислот кодируют любой заданный пептид. Например, все из кодонов GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом положении, где аланин задан кодоном, указанный кодон может быть заменен на любой из описанных соответствующих кодонов без изменения кодируемого по-

липептида. Такая изменчивость нуклеиновой кислоты является "молчащей изменчивостью", которая является одним из видов консервативной изменчивости. В настоящем документе каждая нуклеотидная последовательность, кодирующая полипептид, также описывает каждую возможную молчащую модификацию указанной нуклеиновой кислоты. Специалист в данной области техники должен понимать, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) можно модифицировать, получая функционально идентичную молекулу. Соответственно, каждая молчащая модификация нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, подразумевается в каждой описанной последовательности по отношению к продукту экспрессии, но не по отношению к фактической последовательности зонда.

По отношению к аминокислотным последовательностям специалист в данной области техники должен понимать, что отдельные замены, делеции или добавления в составе нуклеотидной или пептидной последовательности, заменяющие, добавляющие или удаляющие единичную аминокислоту или небольшой процент аминокислот в кодируемой последовательности, являются "консервативно модифицированным вариантом", при этом модификация приводит к замене аминокислоты химически сходной аминокислотой. Таблицы консервативных замен, представляющие функционально сходные аминокислоты, хорошо известны в данной области техники. Такие консервативно модифицированные варианты дополняют и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели по изобретению.

Каждая из следующих восьми групп содержит аминокислоты, являющиеся консервативными заменами друг для друга: 1) аланин (A), глицин (G); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W); 7) серин (S), треонин (T) и 8) цистеин (C), метионин (M). См., например, Creighton, *Proteins* (1984).

Термины "идентичный" или процент "идентичности" в контексте двух или более нуклеотидных кислот или пептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или содержат определенный процент одинаковых аминокислотных остатков или нуклеотидов (т.е. характеризуются приблизительно 60% идентичностью, предпочтительно 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более высокой идентичностью по заданной области при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или заданной области) согласно измерению с использованием алгоритмов сравнения последовательностей BLAST или BLAST 2.0 с параметрами по умолчанию, описанными ниже, или ручном выравнивании и визуальном осмотре.

Под "терапевтически эффективным количеством или дозой" или "достаточным количеством или дозой" здесь подразумевают дозу, производящую действие, для которого ее вводят. Точная доза зависит от цели лечения и устанавливается специалистом в данной области техники с помощью известных способов (см., например, Augsburger & Hoag, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 3rd Ed. 2008); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (3rd Ed., 2008); Pickar, *Dosage Calculations* (8th Ed., 2007); и Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 21st Ed., 2005, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

III. Пептиды фактора VIII.

Настоящее изобретение относится к пептидам FVIII, соответствующим областям белка FVIII, участвующим в иммунном ответе против FVIII. В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает пептид FVIII, состоящий из непрерывной последовательности из девяти аминокислот, по меньшей мере на 85% идентичной девяти смежным аминокислотам одной из следующих аминокислотных последовательностей: AWPKMHTVNGYVNRSPLGLIG (SEQ ID NO: 68); QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344) или TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO: 740), причем указанный пептид состоит из 9-180 аминокислот.

В конкретном варианте воплощения пептид FVIII обладает последовательностью: $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$, где P является аминокислотной последовательностью, обладающей, по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 68, 344 и 740; R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; а каждый из x и y независимо друг от друга равен нулю или единице. В одном варианте воплощения R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-40 аминокислот, а R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-40 аминокислот.

В одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-80 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-70 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-60 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно

являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-40 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-30 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-20 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-10 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-5 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 в отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из от 1 до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 аминокислот.

В одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-150 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-100 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-25 аминокислот. В других вариантах воплощения пептид FVIII состоит из от 9 до 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 или 180 аминокислот.

Как правило, пептиды FVIII по настоящему изобретению могут включать любую последовательность аминокислот, присутствующих в идентифицированной области FVIII¹⁰²⁻¹²², FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶ или FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴, или модифицированный вариант, который может, например, сохранять функцию, аналогичную или идентичную FVIII¹⁰²⁻¹²², FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶ или FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴. В частности, пептиды FVIII по настоящему изобретению включают аминокислотную последовательность, включающую Т-клеточный эпитоп. Пептиды FVIII включают последовательность по меньшей мере из девяти аминокислот, которые могут варьироваться по процентной идентичности по отношению к аминокислотной последовательности AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO: 68); QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344) или TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO: 740). Например, пептиды FVIII могут содержать девять аминокислот, идентичных или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80 или 85% процентов идентичных любой последовательности из девяти смежных аминокислот в составе FVIII¹⁰²⁻¹²², FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶ или FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴.

В еще одной группе вариантов воплощения пептиды FVIII могут содержать аминокислотные последовательности длиной более девяти аминокислот, причем указанные аминокислотные последовательности включают область, которая может быть идентична или по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности смежных аминокислот в FVIII¹⁰²⁻¹²², FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶ или FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴. Специалист в данной области техники должен иметь в виду, что для идентификации модифицированных вариантов, сохраняющих функцию области FVIII¹⁰²⁻¹²², FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶ или FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ можно использовать известные способы мутагенеза, например замену на аланин.

Кроме того, пептиды FVIII могут включать дополнительные аминокислотные последовательности на каждом конце сердцевинной последовательности пептидов FVIII, обсуждавшихся выше. Указанные дополнительные последовательности обозначены $(R^1)_x$ и $(R^2)_y$. В некоторых вариантах воплощения длина R^1 и R^2 может находиться в диапазоне от 1 до приблизительно 80 аминокислот. В качестве альтернативы длина R^1 и R^2 может находиться в диапазоне от 1 до приблизительно 40 аминокислот. В некоторых вариантах воплощения каждый из индексов x и y независимо равен нулю или единице. В некоторых вариантах воплощения как x , так и y могут быть равны нулю. В других вариантах воплощения x может быть равен единице, а y может быть равен нулю. В других вариантах воплощения x может быть равен нулю, а y может быть равен единице. В еще одном варианте воплощения как x , так и y равны единице. Дополнительные аминокислоты на каждом конце могут быть добавлены по различным причинам, включая повышенную стабильность пептидов, улучшенное связывание с молекулами МНС II класса и/или Т-клетками, а также другие аспекты, которые должен учитывать специалист в данной области техники.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает полипептид, обладающий последовательностью $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$, где P является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот области фактора VIII, определенной в табл. 1, R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; а R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, где x и y независимо друг от друга равны нулю или единице. В качестве альтернативы длина R^1 и R^2 может находиться в диапазоне от 1 до приблизительно 40 аминокислот. В одном варианте воплощения P является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот области фактора VIII, определенной в табл. 1. В еще одном варианте воплощения P является аминокислотной последователь-

ностью, обладающей по меньшей мере 95% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот области фактора VIII, определенной в табл. 1. В некоторых вариантах воплощения как х, так и у могут быть равны нулю. В других вариантах воплощения х может быть равен единице, а у может быть равен нулю. В других вариантах воплощения х может быть равен нулю, а у может быть равен единице. В еще одном варианте воплощения как х, так и у равны единице. В одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-150 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-100 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-25 аминокислот.

Таблица 1

Области фактора VIII, включающие Т-клеточные эпитопы	
Области, включающие Т-клеточные эпитопы	Аминокислотная последовательность
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹	TVVITLKNMASHPVSLHA (SEQ ID NO:10)
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶	AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO:68)
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴	GEVGDTLIIIFKNQASRPYNI (SEQ ID NO:159)
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰	PTKSDPRCLTRYSSFVNMER (SEQ ID NO:250)
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴	QANRSPPLIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO:344)
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵	EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (SEQ ID NO:477)
FVIII ²⁰²⁵⁻²⁰⁴⁵	LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (SEQ ID NO:568)
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰	NPPIIARYIRLHPHYSIRST (SEQ ID NO:659)
FVIII ¹⁰²⁻¹²²	TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO:740)

Как описано выше, пептиды FVIII по настоящему изобретению могут включать любую аминокислотную последовательность, присутствующую в идентифицированной области FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴, или модифицированный вариант, который может, например, сохранять функцию, аналогичную или идентичную FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴. В некоторых вариантах воплощения пептиды могут охватывать весь В-домен белка фактора VIII человека. Настоящее изобретение также может включать другие пептиды фактора VIII, которые включают пептид, обладающий последовательностью по меньшей мере из девяти аминокислот, которые могут варьироваться по процентной идентичности по отношению к любой из следующих аминокислотных последовательностей:

GEVGDTLIIIFKNQASRPYNI (FVIII⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴; SEQ ID NO:159), PTKSDPRCLTRYSSFVNMER (FVIII⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰; SEQ ID NO:250),
 EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (FVIII¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵; SEQ ID NO:477),
 LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (FVIII²⁰²⁵⁻²⁰⁴⁵; SEQ ID NO:568),
 NPPIIARYIRLHPHYSIRST (FVIII²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰; SEQ ID NO:659),
 TVVITLKNMASHPVSLHA (FVIII¹⁰²⁻¹¹⁹; SEQ ID NO:10),
 AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶; SEQ ID NO:68) и
 TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (FVIII¹⁰²⁻¹²²; SEQ ID NO:740).

Например, пептиды FVIII, содержащие девять аминокислот, которые идентичны или по меньшей мере на 50, 60, 70, 80 или 85% идентичны любой последовательности из девяти смежных аминокислот в составе FVIII⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴, FVIII⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰, FVIII¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵, FVIII²⁰²⁵⁻²⁰⁴⁵, FVIII²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰, FVIII¹⁰²⁻¹¹⁹, FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶ или FVIII¹⁰²⁻¹²². В еще одной группе вариантов воплощения пептиды FVIII могут содержать аминокислотные последовательности длиной более девяти аминокислот, причем указанные аминокислотные последовательности могут быть идентичны или по меньшей мере на 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичны любой последовательности из девяти смежных аминокислот в составе FVIII⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴, FVIII⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰, FVIII¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵, FVIII²⁰²⁵⁻²⁰⁴⁵, FVIII²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰, FVIII¹⁰²⁻¹¹⁹, FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶ или FVIII¹⁰²⁻¹²². Специалист в данной области техники должен иметь в виду, что для идентификации модифицированных вариантов, которые сохраняют функцию областей FVIII⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴, FVIII⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰, FVIII¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵, FVIII²⁰²⁵⁻²⁰⁴⁵,

FVIII²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰, FVIII¹⁰²⁻¹¹⁹, FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶ или FVIII¹⁰²⁻¹²², можно использовать известные способы мутагенеза, например замену на аланин. Пептиды FVIII, раскрытые здесь, можно получить, используя способы, описанные выше по отношению к пептидам FVIII, связанным с FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴.

А. Пептиды фактора VIII¹⁰²⁻¹¹⁹.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение относится к полипептиду, обладающему последовательностью $(R^1)_x-P-(R^2)_y$, где Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII¹⁰²⁻¹¹⁹, обладающего последовательностью TVVITLKNMASHPVSLHA (SEQ ID NO: 10), R¹ является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, а R² является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, причем каждый из индексов x и y независимо равен нулю или единице.

В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII¹⁰²⁻¹¹⁹, обладающего последовательностью: TVVITLKNMASHPVSLHA (SEQ ID NO: 10). В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-55 (SEQ ID NO: 10). В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 1-55. В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 1-55. В некоторых вариантах воплощения как x, так и y могут быть равны нулю. В других вариантах воплощения x может быть равен единице, а y может быть равен нулю. В других вариантах воплощения x может быть равен нулю, а y может быть равен единице. В еще одном варианте воплощения как x, так и y могут быть равны единице.

В одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-80 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-70 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-60 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-40 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-30 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-20 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-10 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из от 1 до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 аминокислот.

В некоторых вариантах воплощения R¹ является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-40 аминокислот, а R² является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-40 аминокислот. В одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-150 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-100 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-25 аминокислот. В других вариантах воплощения пептид FVIII состоит из от 9 до 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 или 180 аминокислот.

Типичные пептиды FVIII¹⁰²⁻¹¹⁹

Пептид	Последовательность	SEQ ID NO:
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -1	TVVITLKNM	1
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -2	TVVITLKNMA	2
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -3	TVVITLKNMAS	3
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -4	TVVITLKNMASH	4
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -5	TVVITLKNMASHP	5
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -6	TVVITLKNMASHPV	6
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -7	TVVITLKNMASHPVS	7
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -8	TVVITLKNMASHPVSL	8
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -9	TVVITLKNMASHPVSLH	9
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -10	TVVITLKNMASHPVSLHA	10
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -11	VVITLKNMA	11
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -12	VVITLKNMAS	12
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -13	VVITLKNMASH	13
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -14	VVITLKNMASHP	14
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -15	VVITLKNMASHPV	15
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -16	VVITLKNMASHPVS	16
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -17	VVITLKNMASHPVSL	17
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -18	VVITLKNMASHPVSLH	18
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -19	VVITLKNMASHPVSLHA	19
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -20	VITLKNMAS	20
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -21	VITLKNMASH	21
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -22	VITLKNMASHP	22
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -23	VITLKNMASHPV	23
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -24	VITLKNMASHPVS	24
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -25	VITLKNMASHPVSL	25
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -26	VITLKNMASHPVSLH	26
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -27	VITLKNMASHPVSLHA	27
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -28	ITLKNMASH	28
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -29	ITLKNMASHP	29
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -30	ITLKNMASHPV	30
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -31	ITLKNMASHPVS	31
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -32	ITLKNMASHPVSL	32
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -33	ITLKNMASHPVSLH	33
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -34	ITLKNMASHPVSLHA	34
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -35	TLKNMASHP	35
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -36	TLKNMASHPV	36
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -37	TLKNMASHPVS	37
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -38	TLKNMASHPVSL	38
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -39	TLKNMASHPVSLH	39
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -40	TLKNMASHPVSLHA	40
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -41	LKNMASHPV	41
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -42	LKNMASHPVS	42
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -43	LKNMASHPVSL	43
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -44	LKNMASHPVSLH	44
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -45	LKNMASHPVSLHA	45
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -46	KNMASHPVS	46
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -47	KNMASHPVSL	47
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -48	KNMASHPVSLH	48
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -49	KNMASHPVSLHA	49
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -50	NMASHPVSL	50
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -51	NMASHPVSLH	51
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -52	NMASHPVSLHA	52
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -53	MASHPVSLH	53
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -54	MASHPVSLHA	54
FVIII ¹⁰²⁻¹¹⁹ -55	ASHPVSLHA	55

В. Пептиды фактора VIII²⁴⁶⁻²⁶⁶.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение относится к полипептиду, обладающему последовательностью $(R^1)_x-P-(R^2)_y$, где P является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII²⁴⁶⁻²⁶⁶, обладающего последовательностью AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO: 68), R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, а R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, причем каждый из индексов x и y независимо равен нулю или единице.

В одном варианте воплощения P является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII²⁴⁶⁻²⁶⁶, обладающего последовательностью AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO: 68). В одном варианте воплощения P является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 95% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII²⁴⁶⁻²⁶⁶, обладающего последовательностью AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO: 68). В одном варианте воплощения P является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 56-146. В одном варианте воплощения P является аминокислотной последовательностью, обладающей, по меньшей мере, 90% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 56-146. В одном варианте воплощения P является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 95% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 56-146. В одном варианте воплощения P является аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NOs: 56-146. В некоторых вариантах воплощения как x, так и y могут быть равны нулю. В других вариантах воплощения x может быть равен единице, а y может быть равен нулю. В других вариантах воплощения x может быть равен нулю, а y может быть равен единице. В еще одном варианте воплощения как x, так и y могут быть равны единице.

В одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-80 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-70 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-60 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-40 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-30 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-20 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-10 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-5 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из от 1 до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 аминокислот.

В одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-150 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-100 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-25 аминокислот. В других вариантах воплощения пептид FVIII состоит из от 9 до 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 или 180 аминокислот.

Типичные пептиды FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶

Пептид	Последовательность	SEQ ID NO:
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -1	AWPKMHTVN	56
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -2	AWPKMHTVNG	57
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -3	AWPKMHTVNGY	58
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -4	AWPKMHTVNGYV	59
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -5	AWPKMHTVNGYVN	60
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -6	AWPKMHTVNGYVNR	61
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -7	AWPKMHTVNGYVNRS	62
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -8	AWPKMHTVNGYVNRS L	63
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -9	AWPKMHTVNGYVNRS L P	64
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -10	AWPKMHTVNGYVNRS L P G	65
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -11	AWPKMHTVNGYVNRS L P G L	66
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -12	AWPKMHTVNGYVNRS L P G L I	67
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -13	AWPKMHTVNGYVNRS L P G L I G	68
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -14	WPKMHTVNG	69
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -15	WPKMHTVNGY	70
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -16	WPKMHTVNGYV	71
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -17	WPKMHTVNGYVN	72
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -18	WPKMHTVNGYVNR	73
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -19	WPKMHTVNGYVNRS	74
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -20	WPKMHTVNGYVNRS L	75
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -21	WPKMHTVNGYVNRS L P	76
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -22	WPKMHTVNGYVNRS L P G	77
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -23	WPKMHTVNGYVNRS L P G L	78
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -24	WPKMHTVNGYVNRS L P G L I	79
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -25	WPKMHTVNGYVNRS L P G L I G	80
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -26	PKMHTVNGY	81
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -27	PKMHTVNGYV	82
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -28	PKMHTVNGYVN	83
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -29	PKMHTVNGYVNR	84
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -30	PKMHTVNGYVNRS	85
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -31	PKMHTVNGYVNRS L	86
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -32	PKMHTVNGYVNRS L P	87
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -33	PKMHTVNGYVNRS L P G	88
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -34	PKMHTVNGYVNRS L P G L	89
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -35	PKMHTVNGYVNRS L P G L I	90
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -36	PKMHTVNGYVNRS L P G L I G	91
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -37	KMHTVNGYV	92
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -38	KMHTVNGYVN	93
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -39	KMHTVNGYVNR	94
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -40	KMHTVNGYVNRS	95
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -41	KMHTVNGYVNRS L	96
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -42	KMHTVNGYVNRS L P	97
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -43	KMHTVNGYVNRS L P G	98
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -44	KMHTVNGYVNRS L P G L	99
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -45	KMHTVNGYVNRS L P G L I	100
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -46	KMHTVNGYVNRS L P G L I G	101
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -47	MHTVNGYVN	102
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -48	MHTVNGYVNR	103
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -49	MHTVNGYVNRS	104
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -50	MHTVNGYVNRS L	105
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -51	MHTVNGYVNRS L P	106
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -52	MHTVNGYVNRS L P G	107

FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -53	MHTVNGYVNRSLPGL	108
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -54	MHTVNGYVNRSLPGLI	109
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -55	MHTVNGYVNRSLPGLIG	110
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -56	HTVNGYVNR	111
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -57	HTVNGYVNRS	112
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -58	HTVNGYVNRS	113
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -59	HTVNGYVNRS	114
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -60	HTVNGYVNRS	115
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -61	HTVNGYVNRS	116
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -62	HTVNGYVNRS	117
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -63	HTVNGYVNRS	118
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -64	TVNGYVNRS	119
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -65	TVNGYVNRS	120
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -66	TVNGYVNRS	121
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -67	TVNGYVNRS	122
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -68	TVNGYVNRS	123
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -69	TVNGYVNRS	124
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -70	TVNGYVNRS	125
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -71	VNGYVNRS	126
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -72	VNGYVNRS	127
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -73	VNGYVNRS	128
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -74	VNGYVNRS	129
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -75	VNGYVNRS	130
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -76	VNGYVNRS	131
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -77	NGYVNRS	132
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -78	NGYVNRS	133
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -79	NGYVNRS	134
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -80	NGYVNRS	135
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -81	NGYVNRS	136
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -82	GYVNRS	137
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -83	GYVNRS	138
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -84	GYVNRS	139
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -85	GYVNRS	140
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -86	YVNRS	141
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -87	YVNRS	142
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -88	YVNRS	143
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -89	VNRS	144
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -90	VNRS	145
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶ -91	NRSLPGLIG	146

С. Пептиды фактора VIII⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение относится к полипептиду, обладающему последовательностью $(R^1)_x-P-(R^2)_y$, где Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере, из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴, обладающего последовательностью GEVGDТLLIFKNQASRPYNI (SEQ ID NO: 159), R¹ является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, а R² является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, причем каждый из индексов х и у независимо равен нулю или единице.

В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴, обладающего последовательностью GEVGDТLLIFKNQASRPYNI (SEQ ID NO: 159). В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 95% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴, обладающего последовательностью: GEVGDТLLIFKNQASRPYNI (SEQ ID NO: 159). В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 147-237. В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 147-237. В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 95% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 147-237. В некоторых вариантах воплощения как х, так и у могут быть равны нулю. В других вариантах воплощения х может быть равен единице, а у может быть равен нулю. В других вариантах воплощения х может быть

равен нулю, а u может быть равен единице. В еще одном варианте воплощения как x , так и u могут быть равны единице.

В некоторых вариантах воплощения R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-40 аминокислот, а R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-40 аминокислот. В одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-150 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-100 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-25 аминокислот. В других вариантах воплощения пептид FVIII состоит из от 9 до 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 или 180 аминокислот.

Таблица 4

Типичные пептиды FVIII⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴

Пептид	Последовательность	SEQ ID NO:
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -1	GEVGD ^{TLLI}	147
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -2	GEVGD ^{TLLII}	148
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -3	GEVGD ^{TLLIIF}	149
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -4	GEVGD ^{TLLIIFK}	150
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -5	GEVGD ^{TLLIIFKN}	151
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -6	GEVGD ^{TLLIIFKNQ}	152

FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -7	GEVGDTLIIIFKNQA	153
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -8	GEVGDTLIIIFKNQAS	154
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -9	GEVGDTLIIIFKNQASR	155
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -10	GEVGDTLIIIFKNQASRP	156
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -11	GEVGDTLIIIFKNQASRPY	157
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -12	GEVGDTLIIIFKNQASRPYN	158
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -13	GEVGDTLIIIFKNQASRPYNI	159
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -14	EVGDTLII	160
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -15	EVGDTLIIIF	161
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -16	EVGDTLIIIFK	162
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -17	EVGDTLIIIFKN	163
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -18	EVGDTLIIIFKNQ	164
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -19	EVGDTLIIIFKNQA	165
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -20	EVGDTLIIIFKNQAS	166
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -21	EVGDTLIIIFKNQASR	167
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -22	EVGDTLIIIFKNQASRP	168
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -23	EVGDTLIIIFKNQASRPY	169
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -24	EVGDTLIIIFKNQASRPYN	170
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -25	EVGDTLIIIFKNQASRPYNI	171
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -26	VGDTLIIIF	172
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -27	VGDTLIIIFK	173
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -28	VGDTLIIIFKN	174
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -29	VGDTLIIIFKNQ	175
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -30	VGDTLIIIFKNQA	176
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -31	VGDTLIIIFKNQAS	177
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -32	VGDTLIIIFKNQASR	178
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -33	VGDTLIIIFKNQASRP	179
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -34	VGDTLIIIFKNQASRPY	180
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -35	VGDTLIIIFKNQASRPYN	181
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -36	VGDTLIIIFKNQASRPYNI	182
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -37	GDTLIIIFK	183
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -38	GDTLIIIFKN	184
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -39	GDTLIIIFKNQ	185
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -40	GDTLIIIFKNQA	186

FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -41	GDTLIIIFKNQAS	187
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -42	GDTLIIIFKNQASR	188
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -43	GDTLIIIFKNQASRP	189
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -44	GDTLIIIFKNQASRPY	190
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -45	GDTLIIIFKNQASRPYN	191
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -46	GDTLIIIFKNQASRPYNI	192
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -47	DTLLIIIFKN	193
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -48	DTLLIIIFKNQ	194
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -49	DTLLIIIFKNQA	195
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -50	DTLLIIIFKNQAS	196
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -51	DTLLIIIFKNQASR	197
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -52	DTLLIIIFKNQASRP	198
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -53	DTLLIIIFKNQASRPY	199
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -54	DTLLIIIFKNQASRPYN	200
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -55	DTLLIIIFKNQASRPYNI	201
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -56	TLLIIIFKNQ	202
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -57	TLLIIIFKNQA	203
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -58	TLLIIIFKNQAS	204
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -59	TLLIIIFKNQASR	205
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -60	TLLIIIFKNQASRP	206
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -61	TLLIIIFKNQASRPY	207
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -62	TLLIIIFKNQASRPYN	208
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -63	TLLIIIFKNQASRPYNI	209
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -64	LLIIIFKNQA	210
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -65	LLIIIFKNQAS	211
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -66	LLIIIFKNQASR	212
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -67	LLIIIFKNQASRP	213
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -68	LLIIIFKNQASRPY	214
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -69	LLIIIFKNQASRPYN	215
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -70	LLIIIFKNQASRPYNI	216
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -71	LIIIFKNQAS	217
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -72	LIIIFKNQASR	218
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -73	LIIIFKNQASRP	219
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -74	LIIIFKNQASRPY	220

FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -75	LIIFKNQASRPYN	221
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -76	LIIFKNQASRPYNI	222
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -77	IIFKNQASR	223
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -78	IIFKNQASRP	224
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -79	IIFKNQASRPY	225
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -80	IIFKNQASRPYN	226
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -81	IIFKNQASRPYNI	227
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -82	IFKNQASRP	228
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -83	IFKNQASRPY	229
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -84	IFKNQASRPYN	230
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -85	IFKNQASRPYNI	231
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -86	FKNQASRPY	232
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -87	FKNQASRPYN	233
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -88	FKNQASRPYNI	234
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -89	KNQASRPYN	235
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -90	KNQASRPYNI	236
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴ -91	NQASRPYNI	237

D. Пептиды фактора VIII⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение относится к полипептиду, обладающему последовательностью $(R^1)_x-P-(R^2)_y$, где Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰, обладающего последовательностью PTKSDPRCLTRYSSSVNMER (SEQ ID NO: 250), R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, а R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, причем каждый из индексов x и y независимо равен нулю или единице.

В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰, обладающего последовательностью: PTKSDPRCLTRYSSSVNMER (SEQ ID NO: 250). В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 95% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰, обладающего последовательностью: PTKSDPRCLTRYSSSVNMER (SEQ ID NO: 250). В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 238-328. В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 238-328. В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 95% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 238-328. В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 238-328. В некоторых вариантах воплощения как x, так и y могут быть равны нулю. В других вариантах воплощения x может быть равен единице, а y может быть равен нулю. В других вариантах воплощения x может быть равен нулю, а y может быть равен единице. В еще одном варианте воплощения как x, так и y могут быть равны единице.

В одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-80 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-70 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-60 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-40 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-30 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-20 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-10 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-5 аминокислот.

кислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 в отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из от 1 до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 аминокислот.

В одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-150 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-100 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-25 аминокислот. В других вариантах воплощения пептид FVIII состоит из от 9 до 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 или 180 аминокислот.

Таблица 5

Типичные пептиды FVIII⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰

Пептид	Последовательность	SEQ ID NO:
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -1	PTKSDPRCL	238
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -2	PTKSDPRCLT	239
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -3	PTKSDPRCLTR	240
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -4	PTKSDPRCLTRY	241
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -5	PTKSDPRCLTRY	242
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -6	PTKSDPRCLTRYSS	243
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -7	PTKSDPRCLTRYSS	244
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -8	PTKSDPRCLTRYSSSF	245
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -9	PTKSDPRCLTRYSSSFV	246
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -10	PTKSDPRCLTRYSSSFVN	247
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -11	PTKSDPRCLTRYSSSFVNM	248
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -12	PTKSDPRCLTRYSSSFVNME	249
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -13	PTKSDPRCLTRYSSSFVNMER	250
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -14	TKSDPRCLT	251
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -15	TKSDPRCLTR	252
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -16	TKSDPRCLTRY	253
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -17	TKSDPRCLTRY	254
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -18	TKSDPRCLTRYSS	255
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -19	TKSDPRCLTRYSS	256
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -20	TKSDPRCLTRYSSSF	257
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -21	TKSDPRCLTRYSSSFV	258
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -22	TKSDPRCLTRYSSSFVN	259
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -23	TKSDPRCLTRYSSSFVNM	260
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -24	TKSDPRCLTRYSSSFVNME	261
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -25	TKSDPRCLTRYSSSFVNMER	262
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -26	KSDPRCLTR	263
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -27	KSDPRCLTRY	264
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -28	KSDPRCLTRY	265
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -29	KSDPRCLTRYSS	266
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -30	KSDPRCLTRYSS	267
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -31	KSDPRCLTRYSSSF	268
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -32	KSDPRCLTRYSSSFV	269
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -33	KSDPRCLTRYSSSFVN	270
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -34	KSDPRCLTRYSSSFVNM	271
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -35	KSDPRCLTRYSSSFVNME	272
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -36	KSDPRCLTRYSSSFVNMER	273
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -37	SDPRCLTRY	274

FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -38	SDPRCLTRY	275
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -39	SDPRCLTRY	276
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -40	SDPRCLTRY	277
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -41	SDPRCLTRY	278
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -42	SDPRCLTRY	279
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -43	SDPRCLTRY	280
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -44	SDPRCLTRY	281
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -45	SDPRCLTRY	282
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -46	SDPRCLTRY	283
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -47	DPCLTRY	284
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -48	DPCLTRY	285
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -49	DPCLTRY	286
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -50	DPCLTRY	287
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -51	DPCLTRY	288
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -52	DPCLTRY	289
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -53	DPCLTRY	290
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -54	DPCLTRY	291
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -55	DPCLTRY	292
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -56	PRCLTRY	293
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -57	PRCLTRY	294
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -58	PRCLTRY	295
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -59	PRCLTRY	296
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -60	PRCLTRY	297
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -61	PRCLTRY	298
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -62	PRCLTRY	299
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -63	PRCLTRY	300
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -64	RCLTRY	301
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -65	RCLTRY	302
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -66	RCLTRY	303
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -67	RCLTRY	304
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -68	RCLTRY	305
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -69	RCLTRY	306
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -70	RCLTRY	307
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -71	CLTRY	308

FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -72	CLTRYSSFV	309
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -73	CLTRYSSFVN	310
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -74	CLTRYSSFVNM	311
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -75	CLTRYSSFVNME	312
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -76	CLTRYSSFVNMER	313
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -77	LTRYSSFV	314
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -78	LTRYSSFVN	315
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -79	LTRYSSFVNM	316
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -80	LTRYSSFVNME	317
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -81	LTRYSSFVNMER	318
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -82	TRYSSFVN	319
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -83	TRYSSFVNM	320
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -84	TRYSSFVNME	321
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -85	TRYSSFVNMER	322
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -86	RYSSFVNM	323
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -87	RYSSFVNME	324
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -88	RYSSFVNMER	325
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -89	YSSFVNME	326
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -90	YSSFVNMER	327
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰ -91	YSSFVNMER	328

Е. Пептиды фактора VIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение относится к полипептиду, обладающему последовательностью $(R^1)_x-P-(R^2)_y$, где Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴, обладающего последовательностью QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344), R¹ является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, а R² является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, причем каждый из индексов x и y независимо равен нулю или единице.

В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴, обладающего последовательностью QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344). В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 95% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴, обладающего последовательностью QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344). В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 329-464. В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 329-464. В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 95% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 329-464. В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 329-464. В некоторых вариантах воплощения как x, так и y могут быть равны нулю. В других вариантах воплощения x может быть равен единице, а y может быть равен нулю. В других вариантах воплощения x может быть равен нулю, а y может быть равен единице. В еще одном варианте воплощения как x, так и y могут быть равны единице.

В одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-80 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-70 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-60 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-40 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-30 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-20 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-10 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по от-

дельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-5 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² в отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из от 1 до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 аминокислот.

В одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-150 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-100 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-25 аминокислот. В других вариантах воплощения пептид FVIII состоит из от 9 до 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 или 180 аминокислот.

Таблица 6

Типичные пептиды FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴

Пептид	Последовательность	SEQ ID NO:
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -1	QANRSPLPI	329
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -2	QANRSPLPIA	330
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -3	QANRSPLPIAK	331
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -4	QANRSPLPIAKV	332
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -5	QANRSPLPIAKVS	333
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -6	QANRSPLPIAKVSS	334
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -7	QANRSPLPIAKVSSF	335
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -8	QANRSPLPIAKVSSFP	336
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -9	QANRSPLPIAKVSSFPS	337
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -10	QANRSPLPIAKVSSFPSI	338
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -11	QANRSPLPIAKVSSFPSIR	339
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -12	QANRSPLPIAKVSSFPSIRP	340
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -13	QANRSPLPIAKVSSFPSIRPI	341
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -14	QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIY	342
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -15	QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYL	343
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -16	QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT	344
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -17	ANRSPLPIA	345
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -18	ANRSPLPIAK	346
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -19	ANRSPLPIAKV	347
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -20	ANRSPLPIAKVS	348
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -21	ANRSPLPIAKVSS	349
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -22	ANRSPLPIAKVSSF	350
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -23	ANRSPLPIAKVSSFP	351
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -24	ANRSPLPIAKVSSFPS	352
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -25	ANRSPLPIAKVSSFPSI	353
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -26	ANRSPLPIAKVSSFPSIR	354
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -27	ANRSPLPIAKVSSFPSIRP	355
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -28	ANRSPLPIAKVSSFPSIRPI	356
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -29	ANRSPLPIAKVSSFPSIRPIY	357
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -30	ANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYL	358
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -31	ANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT	359
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -32	NRSPLPIAK	360
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -33	NRSPLPIAKV	361
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -34	NRSPLPIAKVS	362

FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -35	NRSPLPIAKVSS	363
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -36	NRSPLPIAKVSSF	364
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -37	NRSPLPIAKVSSFP	365
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -38	NRSPLPIAKVSSFPS	366
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -39	NRSPLPIAKVSSFPSI	367
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -40	NRSPLPIAKVSSFPSIR	368
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -41	NRSPLPIAKVSSFPSIRP	369
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -42	NRSPLPIAKVSSFPSIRPI	370
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -43	NRSPLPIAKVSSFPSIRPIY	371
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -44	NRSPLPIAKVSSFPSIRPIYL	372
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -45	NRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT	373
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -46	RSPLPIAKV	374
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -47	RSPLPIAKVS	375
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -48	RSPLPIAKVSS	376
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -49	RSPLPIAKVSSF	377
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -50	RSPLPIAKVSSFP	378
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -51	RSPLPIAKVSSFPS	379
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -52	RSPLPIAKVSSFPSI	380
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -53	RSPLPIAKVSSFPSIR	381
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -54	RSPLPIAKVSSFPSIRP	382
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -55	RSPLPIAKVSSFPSIRPI	383
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -56	RSPLPIAKVSSFPSIRPIY	384
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -57	RSPLPIAKVSSFPSIRPIYL	385
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -58	RSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT	386
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -59	SPLPIAKVS	387
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -60	SPLPIAKVSS	388
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -61	SPLPIAKVSSF	389
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -62	SPLPIAKVSSFP	390
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -63	SPLPIAKVSSFPS	391
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -64	SPLPIAKVSSFPSI	392
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -65	SPLPIAKVSSFPSIR	393
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -66	SPLPIAKVSSFPSIRP	394
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -67	SPLPIAKVSSFPSIRPI	395
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -68	SPLPIAKVSSFPSIRPIY	396

FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -69	SPLPIAKVSSFPSIRPIYL	397
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -70	SPLPIAKVSSFPSIRPIYLT	398
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -71	PLPIAKVSS	399
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -72	PLPIAKVSSF	400
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -73	PLPIAKVSSFP	401
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -74	PLPIAKVSSFPS	402
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -75	PLPIAKVSSFPSI	403
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -76	PLPIAKVSSFPSIR	404
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -77	PLPIAKVSSFPSIRP	405
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -78	PLPIAKVSSFPSIRPI	406
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -79	PLPIAKVSSFPSIRPIY	407
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -80	PLPIAKVSSFPSIRPIYL	408
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -81	PLPIAKVSSFPSIRPIYLT	409
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -82	LPIAKVSSF	410
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -83	LPIAKVSSFP	411
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -84	LPIAKVSSFPS	412
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -85	LPIAKVSSFPSI	413
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -86	LPIAKVSSFPSIR	414
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -87	LPIAKVSSFPSIRP	415
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -88	LPIAKVSSFPSIRPI	416
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -89	LPIAKVSSFPSIRPIY	417
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -90	LPIAKVSSFPSIRPIYL	418
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -91	LPIAKVSSFPSIRPIYLT	419
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -92	PIAKVSSFP	420
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -93	PIAKVSSFPS	421
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -94	PIAKVSSFPSI	422
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -95	PIAKVSSFPSIR	423
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -96	PIAKVSSFPSIRP	424
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -97	PIAKVSSFPSIRPI	425
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -98	PIAKVSSFPSIRPIY	426
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -99	PIAKVSSFPSIRPIYL	427
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -100	PIAKVSSFPSIRPIYLT	428
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -101	IAKVSSFPS	429
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -102	IAKVSSFPSI	430

FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -103	IAKVSSFPSIR	431
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -104	IAKVSSFPSIRP	432
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -105	IAKVSSFPSIRPI	433
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -106	IAKVSSFPSIRPIY	434
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -107	IAKVSSFPSIRPIYL	435
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -108	IAKVSSFPSIRPIYLT	436
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -109	AKVSSFPSI	437
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -110	AKVSSFPSIR	438
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -111	AKVSSFPSIRP	439
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -112	AKVSSFPSIRPI	440
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -113	AKVSSFPSIRPIY	441
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -114	AKVSSFPSIRPIYL	442
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -115	AKVSSFPSIRPIYLT	443
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -116	KVSSFPSIR	444
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -117	KVSSFPSIRP	445
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -118	KVSSFPSIRPI	446
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -119	KVSSFPSIRPIY	447
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -120	KVSSFPSIRPIYL	448
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -121	KVSSFPSIRPIYLT	449
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -122	VSSFPSIRP	450
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -123	VSSFPSIRPI	451
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -124	VSSFPSIRPIY	452
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -125	VSSFPSIRPIYL	453
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -126	VSSFPSIRPIYLT	454
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -127	SSFPSIRPI	455
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -128	SSFPSIRPIY	456
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -129	SSFPSIRPIYL	457
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -130	SSFPSIRPIYLT	458
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -131	SFPSIRPIY	459
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -132	SFPSIRPIYL	460
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -133	SFPSIRPIYLT	461
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -134	FPSIRPIYL	462
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -135	FPSIRPIYLT	463
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ -136	PSIRPIYLT	464

Ф. Пептиды фактора VIII¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение относится к полипептиду, обладающему последовательностью $(R^1)_x-P-(R^2)_y$, где Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵, обладающего последовательностью EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (SEQ ID NO: 477), R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, а R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, причем каждый из индексов х и у независимо равен нулю или единице. В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵, обладающего последовательностью EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (SEQ ID NO: 477).

В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 95% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵, обладающего последовательностью EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (SEQ ID NO: 477). В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 465-555. В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 465-555. В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 95% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 465-555. В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 465-555. В некото-

рых вариантах воплощения как x , так и y могут быть равны нулю. В других вариантах воплощения x может быть равен единице, а y может быть равен нулю. В других вариантах воплощения x может быть равен нулю, а y может быть равен единице. В еще одном варианте воплощения как x , так и y могут быть равны единице.

В одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-80 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-70 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-60 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-40 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-30 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-20 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-10 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-5 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из от 1 до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 аминокислот.

В одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-150 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-100 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-25 аминокислот. В других вариантах воплощения пептид FVIII состоит из от 9 до 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 или 180 аминокислот.

Таблица 7

Типичные пептиды FVIII¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵

Пептид	Последовательность	SEQ ID NO:
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -1	EVEDNIMVT	465
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -2	EVEDNIMVTF	466
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -3	EVEDNIMVTFR	467
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -4	EVEDNIMVTFRN	468
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -5	EVEDNIMVTFRNQ	469
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -6	EVEDNIMVTFRNQA	470
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -7	EVEDNIMVTFRNQAS	471
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -8	EVEDNIMVTFRNQASR	472
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -9	EVEDNIMVTFRNQASRP	473
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -10	EVEDNIMVTFRNQASRPY	474
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -11	EVEDNIMVTFRNQASRPYS	475
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -12	EVEDNIMVTFRNQASRPYSF	476
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -13	EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY	477
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -14	VEDNIMVTF	478
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -15	VEDNIMVTFR	479
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -16	VEDNIMVTFRN	480
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -17	VEDNIMVTFRNQ	481
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -18	VEDNIMVTFRNQA	482
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -19	VEDNIMVTFRNQAS	483
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -20	VEDNIMVTFRNQASR	484
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -21	VEDNIMVTFRNQASRP	485

FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -22	VEDNIMVTFRNQASRPY	486
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -23	VEDNIMVTFRNQASRPYS	487
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -24	VEDNIMVTFRNQASRPYSF	488
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -25	VEDNIMVTFRNQASRPYSFY	489
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -26	EDNIMVTFR	490
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -27	EDNIMVTFRN	491
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -28	EDNIMVTFRNQ	492
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -29	EDNIMVTFRNQA	493
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -30	EDNIMVTFRNQAS	494
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -31	EDNIMVTFRNQASR	495
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -32	EDNIMVTFRNQASRP	496
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -33	EDNIMVTFRNQASRPY	497
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -34	EDNIMVTFRNQASRPYS	498
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -35	EDNIMVTFRNQASRPYSF	499
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -36	EDNIMVTFRNQASRPYSFY	500
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -37	DNIMVTFRN	501
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -38	DNIMVTFRNQ	502
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -39	DNIMVTFRNQA	503
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -40	DNIMVTFRNQAS	504
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -41	DNIMVTFRNQASR	505
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -42	DNIMVTFRNQASRP	506
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -43	DNIMVTFRNQASRPY	507
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -44	DNIMVTFRNQASRPYS	508
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -45	DNIMVTFRNQASRPYSF	509
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -46	DNIMVTFRNQASRPYSFY	510
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -47	NIMVTFRNQ	511
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -48	NIMVTFRNQA	512
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -49	NIMVTFRNQAS	513
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -50	NIMVTFRNQASR	514
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -51	NIMVTFRNQASRP	515
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -52	NIMVTFRNQASRPY	516
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -53	NIMVTFRNQASRPYS	517
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -54	NIMVTFRNQASRPYSF	518
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -55	NIMVTFRNQASRPYSFY	519

FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -56	IMVTFRNQA	520
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -57	IMVTFRNQAS	521
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -58	IMVTFRNQASR	522
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -59	IMVTFRNQASRP	523
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -60	IMVTFRNQASRPY	524
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -61	IMVTFRNQASRPYS	525
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -62	IMVTFRNQASRPYSF	526
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -63	IMVTFRNQASRPYSFY	527
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -64	MVTFNRQAS	528
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -65	MVTFNRQASR	529
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -66	MVTFNRQASRP	530
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -67	MVTFNRQASRPY	531
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -68	MVTFNRQASRPYS	532
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -69	MVTFNRQASRPYSF	533
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -70	MVTFNRQASRPYSFY	534
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -71	VTFNRQASR	535
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -72	VTFNRQASRP	536
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -73	VTFNRQASRPY	537
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -74	VTFNRQASRPYS	538
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -75	VTFNRQASRPYSF	539
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -76	VTFNRQASRPYSFY	540
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -77	TFRNQASRP	541
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -78	TFRNQASRPY	542
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -79	TFRNQASRPYS	543
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -80	TFRNQASRPYSF	544
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -81	TFRNQASRPYSFY	545
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -82	FRNQASRPY	546
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -83	FRNQASRPYS	547
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -84	FRNQASRPYSF	548
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -85	FRNQASRPYSFY	549
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -86	RNQASRPYS	550
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -87	RNQASRPYSF	551
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -88	RNQASRPYSFY	552
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -89	NQASRPYSF	553
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -90	NQASRPYSFY	554
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ -91	QASRPYSFY	555

G. Пептиды фактора VIII²⁰²⁵⁻²⁰⁴⁵.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение относится к полипептиду, обладающему последовательностью $(R^1)_x-P-(R^2)_y$, где P является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII²⁰²⁵⁻²⁰⁴⁵, обладающего последовательностью LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (SEQ ID NO: 568), R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, а R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, причем каждый из индексов x и y независимо равен нулю или единице.

В одном варианте воплощения P является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII²⁰²⁵⁻²⁰⁴⁵, обладающего последовательностью LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (SEQ ID NO: 568). В одном варианте воплощения P является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 95% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII²⁰²⁵⁻²⁰⁴⁵, обладающего последовательностью LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (SEQ ID NO: 568). В одном варианте воплощения P является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 556-646. В одном варианте воплощения P является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 556-646. В одном варианте воплощения P является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 95% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 556-646. В одном варианте воплощения P является аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 556-646. В некоторых вариантах воплощения как x, так и y могут быть равны нулю. В других вариантах воплощения x может быть равен единице, а y может быть равен нулю. В других вариантах воплощения x может быть равен нулю, а y может быть равен единице. В еще одном варианте воплощения

как x, так и y могут быть равны единице.

В одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-80 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-70 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-60 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-40 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-30 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-20 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-10 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-5 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 в отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из от 1 до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 аминокислот.

В одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-150 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-100 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-25 аминокислот. В других вариантах воплощения пептид FVIII состоит из от 9 до 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 или 180 аминокислот.

Таблица 8

Типичные пептиды FVIII²⁰²⁵⁻²⁰⁴⁵

Пептид	Последовательность	SEQ ID NO:
FVIIII2025-2045-1	LHAGMSTLFL	556
FVIIII2025-2045-2	LHAGMSTLFL	557
FVIIII2025-2045-3	LHAGMSTLFLV	558
FVIIII2025-2045-4	LHAGMSTLFLVY	559
FVIIII2025-2045-5	LHAGMSTLFLVYS	560
FVIIII2025-2045-6	LHAGMSTLFLVYSN	561
FVIIII2025-2045-7	LHAGMSTLFLVYSNK	562
FVIIII2025-2045-8	LHAGMSTLFLVYSNKC	563
FVIIII2025-2045-9	LHAGMSTLFLVYSNKCQ	564
FVIIII2025-2045-10	LHAGMSTLFLVYSNKCQT	565
FVIIII2025-2045-11	LHAGMSTLFLVYSNKCQTP	566
FVIIII2025-2045-12	LHAGMSTLFLVYSNKCQTPL	567
FVIIII2025-2045-13	LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG	568
FVIIII2025-2045-14	HAGMSTLFL	569
FVIIII2025-2045-15	HAGMSTLFLV	570
FVIIII2025-2045-16	HAGMSTLFLVY	571
FVIIII2025-2045-17	HAGMSTLFLVYS	572
FVIIII2025-2045-18	HAGMSTLFLVYSN	573

FVIIII2025-2045-19	HAGMSTLFLVYSNK	574
FVIIII2025-2045-20	HAGMSTLFLVYSNKC	575
FVIIII2025-2045-21	HAGMSTLFLVYSNKCQ	576
FVIIII2025-2045-22	HAGMSTLFLVYSNKCQT	577
FVIIII2025-2045-23	HAGMSTLFLVYSNKCQTP	578
FVIIII2025-2045-24	HAGMSTLFLVYSNKCQTPL	579
FVIIII2025-2045-25	HAGMSTLFLVYSNKCQTPLG	580
FVIIII2025-2045-26	AGMSTLFLV	581
FVIIII2025-2045-27	AGMSTLFLVY	582
FVIIII2025-2045-28	AGMSTLFLVYS	583
FVIIII2025-2045-29	AGMSTLFLVYSN	584
FVIIII2025-2045-30	AGMSTLFLVYSNK	585
FVIIII2025-2045-31	AGMSTLFLVYSNKC	586
FVIIII2025-2045-32	AGMSTLFLVYSNKCQ	587
FVIIII2025-2045-33	AGMSTLFLVYSNKCQT	588
FVIIII2025-2045-34	AGMSTLFLVYSNKCQTP	589
FVIIII2025-2045-35	AGMSTLFLVYSNKCQTPL	590
FVIIII2025-2045-36	AGMSTLFLVYSNKCQTPLG	591
FVIIII2025-2045-37	GMSTLFLVY	592
FVIIII2025-2045-38	GMSTLFLVYS	593
FVIIII2025-2045-39	GMSTLFLVYSN	594
FVIIII2025-2045-40	GMSTLFLVYSNK	595
FVIIII2025-2045-41	GMSTLFLVYSNKC	596
FVIIII2025-2045-42	GMSTLFLVYSNKCQ	597
FVIIII2025-2045-43	GMSTLFLVYSNKCQT	598
FVIIII2025-2045-44	GMSTLFLVYSNKCQTP	599
FVIIII2025-2045-45	GMSTLFLVYSNKCQTPL	600
FVIIII2025-2045-46	GMSTLFLVYSNKCQTPLG	601
FVIIII2025-2045-47	MSTLFLVYS	602
FVIIII2025-2045-48	MSTLFLVYSN	603
FVIIII2025-2045-49	MSTLFLVYSNK	604
FVIIII2025-2045-50	MSTLFLVYSNKC	605
FVIIII2025-2045-51	MSTLFLVYSNKCQ	606
FVIIII2025-2045-52	MSTLFLVYSNKCQT	607

FVIII2025-2045-53	MSTLFLVYSNKCQTP	608
FVIII2025-2045-54	MSTLFLVYSNKCQTPL	609
FVIII2025-2045-55	MSTLFLVYSNKCQTPLG	610
FVIII2025-2045-56	STLFLVYSN	611
FVIII2025-2045-57	STLFLVYSNK	612
FVIII2025-2045-58	STLFLVYSNKC	613
FVIII2025-2045-59	STLFLVYSNKCQ	614
FVIII2025-2045-60	STLFLVYSNKCQT	615
FVIII2025-2045-61	STLFLVYSNKCQTP	616
FVIII2025-2045-62	STLFLVYSNKCQTPL	617
FVIII2025-2045-63	STLFLVYSNKCQTPLG	618
FVIII2025-2045-64	TLFLVYSNK	619
FVIII2025-2045-65	TLFLVYSNKC	620
FVIII2025-2045-66	TLFLVYSNKCQ	621
FVIII2025-2045-67	TLFLVYSNKCQT	622
FVIII2025-2045-68	TLFLVYSNKCQTP	623
FVIII2025-2045-69	TLFLVYSNKCQTPL	624
FVIII2025-2045-70	TLFLVYSNKCQTPLG	625
FVIII2025-2045-71	LFLVYSNKC	626
FVIII2025-2045-72	LFLVYSNKCQ	627
FVIII2025-2045-73	LFLVYSNKCQT	628
FVIII2025-2045-74	LFLVYSNKCQTP	629
FVIII2025-2045-75	LFLVYSNKCQTPL	630
FVIII2025-2045-76	LFLVYSNKCQTPLG	631
FVIII2025-2045-77	FLVYSNKCQ	632
FVIII2025-2045-78	FLVYSNKCQT	633
FVIII2025-2045-79	FLVYSNKCQTP	634
FVIII2025-2045-80	FLVYSNKCQTPL	635
FVIII2025-2045-81	FLVYSNKCQTPLG	636
FVIII2025-2045-82	LVYSNKCQT	637
FVIII2025-2045-83	LVYSNKCQTP	638
FVIII2025-2045-84	LVYSNKCQTPL	639
FVIII2025-2045-85	LVYSNKCQTPLG	640
FVIII2025-2045-86	VYSNKCQTP	641
FVIII2025-2045-87	VYSNKCQTPL	642
FVIII2025-2045-88	VYSNKCQTPLG	643
FVIII2025-2045-89	YSNKCQTPL	644
FVIII2025-2045-90	YSNKCQTPLG	645
FVIII2025-2045-91	SNKCQTPLG	646

Н. Пептиды фактора VIII²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение относится к полипептиду, обладающему последовательностью $(R^1)_x-P-(R^2)_y$, где Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰, обладающего последовательностью NPPIARYIRLHPHTHSIRST (SEQ ID NO: 659), R¹ является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, а R² является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, причем каждый из индексов x и y независимо равен нулю или единице.

В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰, обладающего последовательностью NPPIARYIRLHPHTHSIRST (SEQ ID NO: 659). В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 95% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰, обладающего последовательностью: NPPIARYIRLHPHTHSIRST (SEQ ID NO: 659). В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 647-737. В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 647-737. В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 95% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 647-737. В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 647-

737. В некоторых вариантах воплощения как x , так и y могут быть равны нулю. В других вариантах воплощения x может быть равен единице, а y может быть равен нулю. В других вариантах воплощения x может быть равен нулю, а y может быть равен единице. В еще одном варианте воплощения как x , так и y могут быть равны единице.

В одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-80 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-70 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-60 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-40 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-30 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-20 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-10 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-5 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из от 1 до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 аминокислот.

В одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-150 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-100 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-25 аминокислот. В других вариантах воплощения пептид FVIII состоит из от 9 до 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 или 180 аминокислот.

Таблица 9

Типичные пептиды FVIII²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰

Пептид	Последовательность	SEQ ID NO:
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -1	NPPIIARYI	647
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -2	NPPIIARYIR	648
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -3	NPPIIARYIRL	649
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -4	NPPIIARYIRLH	650
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -5	NPPIIARYIRLHP	651
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -6	NPPIIARYIRLHPT	652
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -7	NPPIIARYIRLHPTH	653
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -8	NPPIIARYIRLHPHTHY	654
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -9	NPPIIARYIRLHPHTHYS	655
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -10	NPPIIARYIRLHPHTHYSI	656
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -11	NPPIIARYIRLHPHTHYSIR	657
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -12	NPPIIARYIRLHPHTHYSIRS	658
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -13	NPPIIARYIRLHPHTHYSIRST	659
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -14	PPIIARYIR	660
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -15	PPIIARYIRL	661

FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -16	PPIARYIRLH	662
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -17	PPIARYIRLHP	663
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -18	PPIARYIRLHPT	664
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -19	PPIARYIRLHPH	665
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -20	PPIARYIRLHPHY	666
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -21	PPIARYIRLHPHYS	667
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -22	PPIARYIRLHPHYSI	668
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -23	PPIARYIRLHPHYSIR	669
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -24	PPIARYIRLHPHYSIRS	670
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -25	PPIARYIRLHPHYSIRST	671
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -26	PIIARYIRL	672
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -27	PIIARYIRLH	673
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -28	PIIARYIRLHP	674
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -29	PIIARYIRLHPT	675
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -30	PIIARYIRLHPH	676
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -31	PIIARYIRLHPHY	677
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -32	PIIARYIRLHPHYS	678
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -33	PIIARYIRLHPHYSI	679
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -34	PIIARYIRLHPHYSIR	680
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -35	PIIARYIRLHPHYSIRS	681
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -36	PIIARYIRLHPHYSIRST	682
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -37	IIARYIRLH	683
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -38	IIARYIRLHP	684
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -39	IIARYIRLHPT	685
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -40	IIARYIRLHPH	686
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -41	IIARYIRLHPHY	687
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -42	IIARYIRLHPHYS	688
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -43	IIARYIRLHPHYSI	689
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -44	IIARYIRLHPHYSIR	690
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -45	IIARYIRLHPHYSIRS	691
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -46	IIARYIRLHPHYSIRST	692
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -47	IARYIRLHP	693
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -48	IARYIRLHPT	694
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -49	IARYIRLHPH	695

FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -50	IARYIRLHPHTY	696
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -51	IARYIRLHPHTYS	697
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -52	IARYIRLHPHTYSI	698
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -53	IARYIRLHPHTYSIR	699
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -54	IARYIRLHPHTYSIRS	700
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -55	IARYIRLHPHTYSIRST	701
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -56	ARYIRLHPT	702
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -57	ARYIRLHPHTH	703
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -58	ARYIRLHPHTY	704
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -59	ARYIRLHPHTYS	705
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -60	ARYIRLHPHTYSI	706
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -61	ARYIRLHPHTYSIR	707
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -62	ARYIRLHPHTYSIRS	708
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -63	ARYIRLHPHTYSIRST	709
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -64	RYIRLHPHTH	710
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -65	RYIRLHPHTY	711
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -66	RYIRLHPHTYS	712
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -67	RYIRLHPHTYSI	713
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -68	RYIRLHPHTYSIR	714
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -69	RYIRLHPHTYSIRS	715
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -70	RYIRLHPHTYSIRST	716
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -71	YIRLHPHTY	717
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -72	YIRLHPHTYS	718
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -73	YIRLHPHTYSI	719
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -74	YIRLHPHTYSIR	720
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -75	YIRLHPHTYSIRS	721
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -76	YIRLHPHTYSIRST	722
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -77	IRLHPHTYS	723
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -78	IRLHPHTYSI	724
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -79	IRLHPHTYSIR	725
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -80	IRLHPHTYSIRS	726
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -81	IRLHPHTYSIRST	727
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -82	RLHPHTYSI	728
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -83	RLHPHTYSIR	729
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -84	RLHPHTYSIRS	730
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -85	RLHPHTYSIRST	731
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -86	LHPHTYSIR	732
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -87	LHPHTYSIRS	733
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -88	LHPHTYSIRST	734
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -89	HPTHYSIRS	735
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -90	HPTHYSIRST	736
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰ -91	PTHYSIRST	737

I. Пептиды фактора VIII¹⁰²⁻¹²².

В одном варианте воплощения настоящее изобретение относится к полипептиду, обладающему последовательностью $(R^1)_x$ -P-(R^2)_y, где P является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII¹⁰²⁻¹²², обладающего последовательностью TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO: 740), R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, а R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, причем каждый из индексов x и y независимо равен нулю или единице.

В одном варианте воплощения P является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокис-

лот пептида фактора VIII¹⁰²⁻¹²², обладающего последовательностью TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO: 740). В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 95% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII¹⁰²⁻¹²², обладающего последовательностью TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO: 740).

В контексте настоящего изобретения пептиды FVIII¹⁰²⁻¹²² также включают пептиды FVIII¹⁰²⁻¹¹⁹. Соответственно, в одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-55 и 738-773. В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 90% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-55 и 738-773. В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 95% идентичностью последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1-55 и 738-773. В одном варианте воплощения Р является аминокислотной последовательностью, состоящей из SEQ ID NO: 1-55 и 738-773. В некоторых вариантах воплощения как х, так и у могут быть равны нулю. В других вариантах воплощения х может быть равен нулю, а у может быть равен единице. В еще одном варианте воплощения как х, так и у могут быть равны единице.

В одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-80 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-70 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-60 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-40 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-30 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-20 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-10 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-5 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из от 1 до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 аминокислот.

В одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-150 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-100 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-25 аминокислот. В других вариантах воплощения пептид FVIII состоит из от 9 до 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 или 180 аминокислот.

Таблица 10

Типичные пептиды FVIII¹⁰²⁻¹²²

Пептид	Последовательность	SEQ ID NO:
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -738	TVVITLKNMASHPVSLHAV	738
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -739	TVVITLKNMASHPVSLHAVG	739
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -740	TVVITLKNMASHPVSLHAVGV	740
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -741	VVITLKNMASHPVSLHAV	741
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -742	VVITLKNMASHPVSLHAVG	742
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -743	VVITLKNMASHPVSLHAVGV	743
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -744	VITLKNMASHPVSLHAV	744
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -745	VITLKNMASHPVSLHAVG	745
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -746	VITLKNMASHPVSLHAVGV	746
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -747	ITLKNMASHPVSLHAV	747

FVIII ¹⁰²⁻¹²² -748	ITLKNMASHPVSLHAVG	748
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -749	ITLKNMASHPVSLHAVGV	749
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -750	TLKNMASHPVSLHAV	750
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -751	TLKNMASHPVSLHAVG	751
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -752	TLKNMASHPVSLHAVGV	752
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -753	LKNMASHPVSLHAV	753
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -754	LKNMASHPVSLHAVG	754
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -755	LKNMASHPVSLHAVGV	755
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -756	KNMASHPVSLHAV	756
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -757	KNMASHPVSLHAVG	757
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -758	KNMASHPVSLHAVGV	758
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -759	NMASHPVSLHAV	759
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -760	NMASHPVSLHAVG	760
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -761	NMASHPVSLHAVGV	761
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -762	MASHPVSLHAV	762
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -763	MASHPVSLHAVG	763
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -764	MASHPVSLHAVGV	764
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -765	ASHPVSLHAV	765
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -766	ASHPVSLHAVG	766
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -767	ASHPVSLHAVGV	767
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -768	SHPVSLHAV	768
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -769	SHPVSLHAVG	769
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -770	SHPVSLHAVGV	770
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -771	HPVSLHAVG	771
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -772	HPVSLHAVGV	772
FVIII ¹⁰²⁻¹²² -773	PVSLHAVGV	773

IV. Способы получения пептидов FVIII.

В еще одном аспекте настоящее изобретение дополнительно относится к способам получения пептидов FVIII. В некоторых вариантах воплощения пептиды FVIII по настоящему изобретению можно получить с помощью способа твердофазного синтеза (например, Fmoc или t-Boc) или синтеза в жидкой фазе, широко известных в данной области техники. См., например, Chan & White, Eds., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (Oxford University Press, 2000); Benoiton, Chemistry of Peptide Synthesis (CRC Press, 2005); Howl, Peptide Synthesis and Applications (Humana Press, 2010).

В одном варианте воплощения настоящее изобретение включает способ получения пептида FVIII, включающий: а) синтез пептида с использованием способа твердофазного синтеза или синтеза в жидкой фазе, причем пептид FVIII обладает последовательностью: $(R^1)_x-P-(R^2)_y$, где Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 68, 344 и 740; R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; а каждый из x и y независимо друг от друга равен нулю или единице. В одном варианте воплощения R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-40 аминокислот, а R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-40 аминокислот. В некоторых вариантах воплощения пептиды могут охватывать весь В-домен белка фактора VIII человека.

В одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-80 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-70 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-60 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-40 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-40 аминокислот.

довательностями, состоящими из 1-10 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-5 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 в отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из от 1 до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 аминокислот.

В одном варианте воплощения способов получения пептидов FVIII указанный пептид FVIII состоит из 9-150 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-100 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-25 аминокислот. В других вариантах воплощения пептид FVIII состоит из от 9 до 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 или 180 аминокислот.

Пептиды FVIII по настоящему изобретению можно получить путем экспрессии в подходящем прокариотическом или эукариотическом хозяине. Примеры эукариотических клеток включают, без ограничения, клетки млекопитающих, например CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Nep и HepG2; клетки насекомых, например клетки SF9, клетки SF21, клетки S2 и клетки High Five; и клетки дрожжей, например клетки *Saccharomyces* или *Schizosaccharomyces*. В одном варианте воплощения пептиды FVIII можно экспрессировать в бактериальных клетках, дрожжевых клетках, клетках насекомых, клетках птиц, клетках млекопитающих и т.п. В некоторых вариантах воплощения пептиды можно экспрессировать в линии клеток человека, линии клеток хомячка или линии клеток мыши. В одном конкретном варианте воплощения линия клеток является линией клеток CHO, BHK или HEK.

Для экспрессии пептидов FVIII можно использовать разнообразные векторы, которые можно выбрать из эукариотических и прокариотических экспрессирующих векторов. Векторы включают нуклеотидную последовательность, необходимую для экспрессии по меньшей мере одного из пептидов FVIII, раскрытых здесь. Примеры векторов для прокариотической экспрессии включают плазмиды, например pRSET, pET, pBAD и т.д., причем промоторы, используемые в прокариотических экспрессирующих векторах, включают lac, trc, trp, recA, araBAD и т.д. Примеры векторов для эукариотической экспрессии включают: (1) для экспрессии в дрожжах - такие векторы, как pAO, pPIC, pYES, pMET, использующие такие промоторы, как AOX1, GAP, GAL1, AUG1 и т.д.; (2) для экспрессии в клетках насекомых - такие векторы, как pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC и т.д., использующие такие промоторы, как PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh и т.д., и (3) для экспрессии в клетках млекопитающих - такие векторы, как pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, pBPV и т.д., и векторы, полученные из вирусных систем, например вируса осповакцины, аденоассоциированных вирусов, вирусов герпеса, ретровирусов и т.д., использующие такие промоторы, как CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV и β -актина.

В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения нуклеотидные последовательности для продукции пептидов FVIII дополнительно включают другие последовательности, подходящие для контролируемой экспрессии белка, например последовательности промоторов, энхансеры, ТАТА-боксы, сайты инициации транскрипции, полилинкеры, сайты рестрикции, последовательности поли-А, последовательности процессинга белка, маркеры селекции и т.п., в целом известные специалисту в данной области техники.

Культуральные среды, используемые для клеток, продуцирующих пептиды FVIII, могут быть основаны на подходящей минимальной среде, хорошо известной в данной области техники, например DMEM, среда Хэма F12, среда 199, McCoy или RPMI. Минимальная среда может включать ряд компонентов, в том числе аминокислоты, витамины, органические и неорганические соли и источники углеводов. Каждый ингредиент может присутствовать в количестве, поддерживающем культивирование клетки, причем такие количества в целом известны специалистам в данной области техники. Среда может включать вспомогательные вещества, например буферные вещества, например, бикарбонат натрия, антиоксиданты, стабилизаторы для противодействия механическим нагрузкам или ингибиторы протеаз. Если необходимо, можно добавлять неионное поверхностно-активное вещество, например сополимеры и/или смеси полиэтиленгликолей и полипропиленгликолей.

В некоторых вариантах воплощения культуральная среда не содержит экзогенно добавленного белка. "Не содержащий белка" и родственные термины относятся к белку из экзогенного источника или к белку, не принадлежащему клеткам культуры, которые естественным образом выделяют белки в ходе роста. В еще одном варианте воплощения культуральная среда не содержит полипептидов. В еще одном варианте воплощения культуральная среда не содержит сыворотки. В еще одном варианте воплощения культуральная среда не содержит белка животного происхождения. В еще одном варианте воплощения культуральная среда не содержит компонентов животного происхождения. В еще одном варианте воплощения культуральная среда содержит белок, например белок животного происхождения из сыворот-

ки, например эмбриональной телячьей сыворотки. В еще одном варианте воплощения культура содержит экзогенно добавленные рекомбинантные белки. В еще одном варианте воплощения указанные белки получены из сертифицированного животного, не содержащего патогенов.

Способы получения сред заданного химического состава, не содержащих белка животного происхождения, известны в данной области техники, например в заявках US 2008/0009040 и US 2007/0212770, обе из которых включены в настоящий документ для всех целей. В одном варианте воплощения культуральная среда, используемая в способах, описанных здесь, является средой, не содержащей белка животного происхождения, или средой, не содержащую олигопептидов. В некоторых вариантах воплощения культуральная среда может иметь заданный химический состав. Термин "заданный химический состав", как используется здесь, означает, что среда не содержит никаких неопределенных добавок, таких как, например, экстракты компонентов животного происхождения, органы, железы, растения или дрожжи. Соответственно, каждый компонент среды заданного химического состава является точно определенным.

В некоторых вариантах воплощения способы по настоящему изобретению могут включать использование системы для культивирования клеток, работающей, например, в периодическом режиме, непрерывном режиме, периодическом режиме с добавлением субстрата или в непрерывном режиме. Периодическая культура может быть культурой в крупном масштабе, для которой клеточный инокулят культивируют до максимальной плотности в резервуаре или ферментере, и собирают и обрабатывают в периодическом режиме. Периодическая культура с добавлением субстрата может быть периодической культурой снабжаемой свежими питательными компонентами (например, лимитирующими рост субстратами) или добавками (например, предшественниками продуктов). Непрерывная культура может быть суспензионной культурой, непрерывно снабжаемой питательными компонентами за счет притока свежей среды, причем объем культуры, как правило, является постоянным. Аналогичным образом, непрерывная ферментация может относиться к процессу, при котором клетки или микроорганизмы поддерживаются в культуре в экспоненциальной фазе роста путем непрерывного добавления свежей среды, точно сбалансированного путем удаления суспензии клеток из биореактора. Кроме того, реакторную систему с механическим перемешиванием можно использовать для суспензионных, проточных, хемотростических культур и/или культур с микроносителем. Как правило, реакторная система с механическим перемешиванием может функционировать как любой обычный реактор с мешалкой любого типа, например, мешалкой Раштона, мешалкой типа "подводное крыло", мешалкой с наклонными лопастями или мешалкой типа гребного винта.

В некоторых вариантах воплощения способы культивирования клеток по изобретению могут включать использование микроносителя. В некоторых вариантах воплощения культивирование клеток по вариантам воплощения можно выполнить в крупных биореакторах в условиях, подходящих для обеспечения поверхностных площадей культивирования в большом объеме с целью достижения высокой плотности клеток и экспрессии белка. Одним из средств для обеспечения таких условий роста является использование микроносителей для культивирования клеток в биореакторах с механическим перемешиванием. Концепция роста клеток на микроносителях была впервые описана в статье van Wezel (van Wezel, A.L., Nature 216:64-5 (1967)) и дает возможность присоединения клеток к поверхности мелких твердых частиц, суспендированных в питательной среде. Указанные способы обеспечивают высокие отношения поверхности к объему и, следовательно, дают возможность эффективного использования питательных веществ. Кроме того, при экспрессии секретируемых белков в линиях эукариотических клеток увеличение отношения площади поверхности к объему обеспечивает более высокие уровни секреции и, следовательно, более высокий выход белка в супернатант культуры. Наконец, указанные способы позволяют легко масштабировать эукариотические экспрессирующие культуры.

Клетки, экспрессирующие пептиды FVIII, можно связать со сферическим или пористым микроносителем в ходе роста культуры клеток. Микроноситель может быть микроносителем, выбранным из группы микроносителей на основе декстрана, коллагена, пластика, желатина и целлюлозы и др. Кроме того, можно выращивать клетки до биомассы на сферических микроносителях и пересевать клетки при достижении окончательного количества биомассы в ферментере и до начала продукции экспрессируемого белка на пористом микроносителе, или наоборот. Подходящие сферические микроносители могут включать микроносители с гладкой поверхностью, например Cytodex™ I, Cytodex™ 2 и Cytodex™ 3 (GE Healthcare) и макропористые микроносители, например Cytopore™ 1, Cytopore™ 2, Cytoline™ 1 и Cytoline™ 2 (GE Healthcare).

Специалист в данной области должен иметь в виду, что пептиды FVIII, полученные с помощью синтетических и/или рекомбинантных способов, описанных выше, могут включать природные и/или природные аминокислоты, в том числе аналоги аминокислот и/или имитаторы аминокислот.

V. Композиции пептидов фактора VIII для индукции иммунной толерантности.

В еще одном аспекте пептиды FVIII, раскрытые здесь, могут быть включены в фармацевтическую композицию. В одном варианте воплощения настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей пептид фактора VIII²⁴⁶⁻²⁶⁶, пептид фактора VIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ или пептид фактора

VIII¹⁰²⁻¹²², как описано здесь.

В одном варианте воплощения фармацевтическая композиция включает пептид фактора VIII²⁴⁶⁻²⁶⁶, как описано здесь. В еще одном варианте воплощения фармацевтическая композиция дополнительно включает пептид FVIII⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴, пептид FVIII⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰, пептид FVIII¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵, пептид FVIII²⁰²⁵⁻²⁰⁴⁵, пептид FVIII²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰, пептид FVIII¹⁰²⁻¹¹⁹, пептид FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴, пептид FVIII¹⁰²⁻¹²² или второй пептид FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶, как описано здесь.

В еще одном варианте воплощения фармацевтическая композиция включает пептид фактора VIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴, как описано здесь. В еще одном варианте воплощения фармацевтическая композиция дополнительно включает пептид FVIII⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴, пептид FVIII⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰, пептид FVIII¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵, пептид FVIII²⁰²⁵⁻²⁰⁴⁵, пептид FVIII²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰, пептид FVIII¹⁰²⁻¹¹⁹, пептид FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶, пептид FVIII¹⁰²⁻¹²² или второй пептид FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴, как описано здесь.

В еще одном варианте воплощения фармацевтическая композиция включает пептид фактора VIII¹⁰²⁻¹²², как описано здесь. В еще одном варианте воплощения фармацевтическая композиция дополнительно включает пептид FVIII⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴, пептид FVIII⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰, пептид FVIII¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵, пептид FVIII²⁰²⁵⁻²⁰⁴⁵, пептид FVIII²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰, пептид FVIII¹⁰²⁻¹¹⁹, пептид FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶, пептид FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ или второй пептид FVIII¹⁰²⁻¹²², как описано здесь.

В конкретном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, включающую пептид, обладающий последовательностью: $(R^1)_x-P-(R^2)_y$, где Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 68, 344 и 740; R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; а каждый из x и y независимо друг от друга равен нулю или единице. В одном варианте воплощения R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-40 аминокислот, а R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-40 аминокислот.

В одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-80 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-70 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-60 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-40 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-30 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-20 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-10 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-5 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из от 1 до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 аминокислот.

В одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-150 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-100 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-25 аминокислот. В других вариантах воплощения пептид FVIII состоит из от 9 до 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 или 180 аминокислот.

В конкретном варианте воплощения фармацевтическая композиция дополнительно включает второй полипептид, обладающий последовательностью $(R^1)_x-P-(R^2)_y$, где Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 10, 68, 159, 250, 344, 477, 568, 659 и 740; R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; а каждый из x и y независимо друг от друга равен нулю или единице. В одном варианте воплощения R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-40 аминокислот, а R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-40 аминокислот.

В одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными

последовательностями, состоящими из 1-80 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-70 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-60 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-40 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-30 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-20 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-10 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-5 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из от 1 до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 аминокислот.

В одном варианте воплощения второй пептид FVIII состоит из 9-150 аминокислот. В еще одном варианте воплощения второй пептид FVIII состоит из 9-100 аминокислот. В еще одном варианте воплощения второй пептид FVIII состоит из 9-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения второй пептид FVIII состоит из 9-25 аминокислот. В других вариантах воплощения второй пептид FVIII состоит из от 9 до 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 или 180 аминокислот.

А. Введение.

Для введения композиций в организм человека или подопытного животного в одном аспекте композиции могут включать один или более фармацевтически приемлемых носителей. Фразы "фармацевтически" или "фармакологически" приемлемый относятся к молекулярным структурам и композициям, которые являются стабильными, ингибируют разрушение белков или пептидов, например агрегацию и продукты расщепления, и, кроме того, не вызывают аллергических или других побочных реакций при введении посредством путей, хорошо известных в данной области техники, как описано ниже. "Фармацевтически приемлемые носители" включают любые клинически пригодные растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и задерживающие всасывание агенты и т.п.

Фармацевтические композиции можно вводить перорально, местно, трансдермально, парентерально, путем ингаляции, вагинально, ректально или путем внутривенной инъекции. Термин "парентеральный", как используется здесь, включает подкожные инъекции, внутривенную, внутримышечную, интракостальную инъекцию или способы вливания. Наряду с этим, рассматриваются введение путем внутривенной, внутрикожной, внутримышечной, интрамаммарной, внутрибрюшинной, интратекальной, ретробульбарной, внутрилегочной инъекции и/или хирургической имплантации в определенной области. Как правило, композиции практически не содержат пирогенов, а также других примесей, которые могут быть вредными для реципиента.

Дозировки и частота введения зависят от различных факторов, обычно учитываемых специалистами в данной области техники, включая, например, тяжесть гемофилии пациента и/или более эффективная индукция иммунной толерантности большими или меньшими дозами. Типичные суточные дозы могут варьироваться приблизительно от 0,01 до 100 мг/кг. Дозы в диапазоне 0,07-700 мг пептида фактора VIII в неделю могут быть эффективными и хорошо переноситься, хотя еще более высокие еженедельные дозы могут являться подходящими и/или хорошо переносимыми. Основным определяющим фактором при определении соответствующей дозы является количество конкретного пептида фактора VIII, необходимое для достижения терапевтического эффекта в конкретном контексте. Для достижения более длительной иммунной толерантности могут потребоваться повторные введения. Однократное или многократные введения композиций можно осуществлять, используя уровни дозы и схему, выбираемые лечащим врачом.

В одном аспекте композиции согласно изобретению можно вводить посредством боллуса. В качестве другого примера пептид FVIII можно вводить путем однократной дозы. Специалисты в данной области техники легко могут оптимизировать эффективные дозировки и схемы введения согласно надлежащей медицинской практике и клиническому состоянию конкретного пациента. Частота дозировки зависит от пути введения. Оптимальную фармацевтическую композицию определяет специалист в данной области техники в зависимости от пути введения и желательной дозы. См., например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Remington the Science and Practice of Pharmacy), 21st Ed. (2005, Lippincott Williams &

Wilkins), раскрытие которого включено в настоящий документ посредством ссылки. Такие композиции влияют на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость выведения введенных агентов *in vivo*. В зависимости от способа введения, подходящую дозу рассчитывают в соответствии с массой тела, площадью поверхности тела или размером органа. Соответствующие дозировки можно установить посредством использования установленных анализов для определения уровней дозы в крови в сочетании с соответствующими данными доза-ответ. Конечную схему дозирования определяет лечащий врач с учетом различных факторов, которые изменяют действие лекарств, например удельной активности препарата, тяжести повреждения и чувствительности пациента, возраста, состояния, массы тела, пола и диеты пациента, тяжести любой инфекции, времени введения и других клинических факторов.

В некоторых вариантах воплощения композиции, включающие пептид FVIII, раскрытый здесь, лиофилизируют перед введением. Лيوфилизацию выполняют, используя способы, распространенные в данной области техники; ее следует оптимизировать с учетом особенностей разрабатываемой композиции, как описано, например, в статьях Tang et al., *Pharm Res.* 21:191-200, (2004) и Chang et al., *Pharm Res.* 13:243-9 (1996). Способы получения фармацевтических композиций могут включать один или более из следующих стадий: добавление стабилизатора к смеси перед лиофилизацией, добавление к смеси перед лиофилизацией по меньшей мере одного агента, выбранного из наполнителя, агента, регулирующего осмотическое давление, и поверхностно-активного вещества. Лيوфилизированный препарат в одном аспекте состоит по меньшей мере из одного или более из следующего: буфера, наполнителя и стабилизатора. В указанном аспекте эффективность поверхностно-активного вещества оценивают и выбирают в случаях, когда агрегация во время стадии лиофилизации или во время восстановления становится проблемой. Для поддержания состава в стабильном диапазоне pH в ходе лиофилизации включают соответствующий буферный агент.

Стандартной практикой для восстановления лиофилизированного материала является добавление объема чистой воды или стерильной воды для инъекций (WFI) (обычно эквивалентного объему, удаленному во время лиофилизации), хотя при производстве лекарственных средств для парентерального введения иногда используют разбавленные растворы антибактериальных агентов. Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает способы получения восстановленных композиций пептида FVIII, включающие стадию добавления разбавителя к лиофилизированным композициям пептида FVIII.

В некоторых вариантах воплощения лиофилизированный материал можно восстановить в виде водного раствора. Для этого можно использовать различные водные носители, например, стерильную воду для инъекций, воду с консервантами для многодозового использования или воду, содержащую соответствующие количества поверхностно-активных веществ (например, водную суспензию, содержащую активное соединение в смеси со вспомогательными веществами, подходящими для изготовления водных суспензий). В различных аспектах такие вспомогательные вещества являются суспендирующими агентами, например, без ограничения, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовую камедь и гуммиарабик; диспергирующие или смачивающие агенты являются природным фосфатидом, например, без ограничения, лецитином, или продукты конденсации алкиленоксида с жирными кислотами, например, без ограничения, полиоксиэтиленстеарат, или продукты конденсации этиленоксида с длинноцепочечными алифатическими спиртами, например, без ограничения, гептадекаэтиленоксицетанол, или продукты конденсации этиленоксида с неполными эфирами многоатомных спиртов, полученными из жирных кислот и гексита, например, полиоксиэтиленсорбитмоноолеат, или продукты конденсации этиленоксида с неполными эфирами многоатомных спиртов, полученными из жирных кислот и ангидридов гексита, например, без ограничения, полиэтиленсорбитанмоноолеат. В различных аспектах указанные водные суспензии также содержат один или более консервантов, например, без ограничения, этил- или н-пропил-п-гидроксibenзоат.

VI. Способы лечения.

Настоящее изобретение также относится к способам лечения пациента, страдающего заболеванием, связанным с белком FVIII, например гемофилией A или приобретенной гемофилией. Такие способы могут включать введение по меньшей мере одного из пептидов FVIII, описанных здесь. В частности, фармацевтические композиции, содержащие по меньшей мере один из пептидов FVIII, можно вводить для индукции иммунной толерантности к белку FVIII у пациента.

В некоторых вариантах воплощения способы индукции иммунной толерантности к FVIII могут включать предотвращение возникновения ингибиторов FVIII после введения FVIII. Термин "предотвращение" означает недопущение возникновения значительного обнаруживаемого иммунного ответа на FVIII. Например, организм пациента до введения белка FVIII может не содержать обнаруживаемого количества антител против фактора VIII. Тем не менее, после введения белка фактора VIII в терапевтических целях уровень обнаруживаемых антител против FVIII может возрасти, если не ввести пептид FVIII с целью индукции иммунной толерантности. Введение пептидов FVIII, раскрытых здесь, может индуцировать иммунную толерантность, тем самым внося вклад в лечение пациента, страдающего гемофилией.

В других вариантах воплощения способы индукции иммунной толерантности к белку фактора VIII

могут включать лечение пациентов, у которых уже присутствуют ингибиторы фактора VIII. В указанных вариантах воплощения введение пептида FVIII может уменьшить или устранить присутствие антител против FVIII. Термин "уменьшить" означает частичное снижение иммунного ответа на белок FVIII. В некоторых вариантах воплощения снижение иммунного ответа может включать 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90%-ное снижение иммунного ответа по сравнению с уровнем иммунного ответа у пациента до введения пептида FVIII. Например, процентное снижение можно анализировать путем измерения количества антител против FVIII, присутствующих в крови до и после введения пептида FVIII, используя стандартные способы определения количества присутствующих антител FVIII. В других вариантах воплощения снижение иммунного ответа может включать измерение сниженных уровней CD4⁺ Т-клеток, специфичных к FVIII, или В-клеток, специфичных к FVIII, секретирующих антитела FVIII, или сочетание всех трех показателей: Т-клеток, В-клеток и антител против FVIII. Иммунные клетки, например Т-клетки и В-клетки, специфичные к FVIII, можно выделить, используя способы, известные в данной области техники.

В одном аспекте настоящее изобретение включает способ индукции иммунной толерантности к FVIII у субъекта, включающий стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей пептид FVIII, как описано здесь. В конкретном варианте воплощения пептидом FVIII является пептид фактора VIII²⁴⁶⁻²⁶⁶, пептид фактора VIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ или пептид фактора VIII¹⁰²⁻¹²², как описано здесь.

В одном варианте воплощения указанный способ включает стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей пептид фактора VIII²⁴⁶⁻²⁶⁶, как описано здесь. В еще одном варианте воплощения фармацевтическая композиция дополнительно включает пептид FVIII⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴, пептид FVIII⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰, пептид FVIII¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵, пептид FVIII²⁰²⁵⁻²⁰⁴⁵, пептид FVIII²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰, пептид FVIII¹⁰²⁻¹¹⁹, пептид FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴, пептид FVIII¹⁰²⁻¹²² или второй пептид FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶, как описано здесь.

В еще одном варианте воплощения указанный способ включает стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей пептид фактора VIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴, как описано здесь. В еще одном варианте воплощения фармацевтическая композиция дополнительно включает пептид FVIII⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴, пептид FVIII⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰, пептид FVIII¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵, пептид FVIII²⁰²⁵⁻²⁰⁴⁵, пептид FVIII²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰, пептид FVIII¹⁰²⁻¹¹⁹, пептид FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶, пептид FVIII¹⁰²⁻¹²² или второй пептид FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴, как описано здесь.

В еще одном варианте воплощения указанный способ включает стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей пептид фактора VIII¹⁰²⁻¹²², как описано здесь. В еще одном варианте воплощения фармацевтическая композиция дополнительно включает пептид FVIII⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴, пептид FVIII⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰, пептид FVIII¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵, пептид FVIII²⁰²⁵⁻²⁰⁴⁵, пептид FVIII²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰, пептид FVIII¹⁰²⁻¹¹⁹, пептид FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶, пептид FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ или второй пептид FVIII¹⁰²⁻¹²², как описано здесь.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ индукции иммунной толерантности к белку FVIII, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей пептид, обладающий последовательностью: (R¹)_x-P-(R²)_y, где Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 68, 344 и 740; R¹ является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; R² является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; а каждый из x и y независимо друг от друга равен нулю или единице; тем самым индуцируя иммунную толерантность к белку FVIII у субъекта. В некоторых вариантах воплощения R¹ является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-40 аминокислот, а R² является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-40 аминокислот.

В одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-80 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-70 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-60 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-40 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-30 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-20 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-10 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-5 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R¹ и R² по отдельности или совместно являются аминокис-

лотными последовательностями, состоящими из от 1 до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 аминокислот.

В одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-150 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-100 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-25 аминокислот. В других вариантах воплощения пептид FVIII состоит из от 9 до 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 или 180 аминокислот.

Способы индукции иммунной толерантности могут дополнительно включать комбинированную терапию, при которой для индукции иммунной толерантности можно вводить несколько пептидов. В одном варианте воплощения способ индукции иммунной толерантности дополнительно включает введение терапевтически эффективного количества, по меньшей мере, второго пептида, обладающего последовательностью $(R^1)_x-P-(R^2)_y$, где Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот последовательности, выбранной из SEQ ID NOs: 10, 68, 159, 250, 344, 477, 568, 659 и 740; R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; а каждый из x и y независимо друг от друга равен нулю или единице; тем самым индуцируя иммунную толерантность к белку FVIII у субъекта. В некоторых вариантах воплощения R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-40 аминокислот, а R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-40 аминокислот. В конкретном варианте воплощения второй пептид состоит из 9-80 аминокислот. В еще одном конкретном варианте воплощения любые дополнительные аминокислоты в составе второго пептида являются природными аминокислотами. В еще одном конкретном варианте воплощения второй пептид состоит из 9-40 аминокислот в длину. В конкретном варианте воплощения второй пептид состоит из 9-80 аминокислот в длину, и любые дополнительные аминокислоты в составе второго пептида являются природными аминокислотами.

В одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-80 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-70 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-60 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-40 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-30 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-20 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-10 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-5 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из от 1 до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 аминокислот.

В одном варианте воплощения второй пептид FVIII состоит из 9-150 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-100 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения пептид FVIII состоит из 9-25 аминокислот. В других вариантах воплощения пептид FVIII состоит из от 9 до 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175 или 180 аминокислот.

В конкретном варианте воплощения способа индукции иммунной толерантности, при котором вводимая фармацевтическая композиция содержит пептид, где Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 68, 344 или 740, указанная композиция дополнительно содержит второй полипептид, обладающий последовательностью $(R^1)_x-P-(R^2)_y$, где Р явля-

ется аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 10, 68, 159, 250, 344, 477, 568, 659 и 740; R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; а каждый из x и y независимо друг от друга равен нулю или единице.

В одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-80 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-70 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-60 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-40 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-30 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-20 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-10 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-5 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 в отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из от 1 до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 аминокислот.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение пептида FVIII, как описано здесь, для производства лекарственного средства для лечения иммунного ответа против заместительной терапии фактором VIII. В конкретном варианте воплощения пептидом FVIII является пептид FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴. В родственном аспекте настоящее изобретение обеспечивает применение пептида FVIII, как описано здесь, для производства лекарственного средства для предотвращения иммунного ответа против заместительной терапии фактором VIII. В конкретном варианте воплощения пептидом FVIII является пептид FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает пептид FVIII для использования в качестве лекарственного средства. В конкретном варианте воплощения изобретение относится к полипептиду, обладающему последовательностью $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$, где P является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴, обладающего последовательностью QANRSPLPI-AKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344), R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, а R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, причем каждый из индексов x и y независимо равен нулю или единице, для использования в качестве лекарственного средства.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает пептид FVIII для лечения иммунного ответа против заместительной терапии FVIII. В конкретном варианте воплощения изобретение относится к полипептиду, обладающему последовательностью $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$, где P является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴, обладающего последовательностью QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344), R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, а R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, причем каждый из индексов x и y независимо равен нулю или единице, для лечения иммунного ответа против заместительной терапии FVIII.

В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает пептид FVIII для предотвращения иммунного ответа против заместительной терапии FVIII. В конкретном варианте воплощения изобретение относится к полипептиду, обладающему последовательностью $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$, где P является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот пептида фактора VIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴, обладающего последовательностью: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344), R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, а R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот, причем каждый из индексов x и y независимо равен нулю или единице, для предотвращения иммунного ответа против заместительной терапии FVIII.

VII. Иммунодиагностика.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к способу мониторинга заместительной терапии FVIII или терапии индукции иммунной толерантности к FVIII у субъекта, нуждающегося в этом, путем определения наличия или уровня ингибиторных антител FVIII или CD4+ Т-клеток, специфичных к FVIII,

в биологическом образце, полученном у субъекта.

В одном варианте воплощения указанный способ включает способ мониторинга заместительной терапии FVIII у субъекта, нуждающегося в этом, включающий контакт биологического образца субъекта с пептидом FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶, пептидом FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ или пептидом FVIII¹⁰²⁻¹²², как описано здесь, и обнаружение комплекса, образованного пептидом FVIII и ингибиторным антителом FVIII, присутствующим в образце. В одном варианте воплощения указанный способ включает определение уровня ингибиторного антитела FVIII в образце. В еще одном варианте воплощения способ включает определение уровня ингибиторного антитела FVIII по меньшей мере в двух образцах, взятых у субъекта в разное время, и сравнение уровней ингибиторного антитела FVIII в указанных двух образцах, причем увеличение уровня антитела с течением времени указывает на формирование иммунного ответа против FVIII, введенного субъекту в ходе заместительной терапии FVIII.

В еще одном варианте воплощения указанный способ включает способ мониторинга терапии индукции иммунной толерантности к FVIII у субъекта, нуждающегося в этом, включающий контакт биологического образца субъекта с пептидом FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶, пептидом FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ или пептидом FVIII¹⁰²⁻¹²², как описано здесь, и обнаружение комплекса, образованного пептидом FVIII и ингибиторным антителом FVIII, присутствующим в образце. В одном варианте воплощения указанный способ включает определение уровня ингибиторного антитела FVIII в образце. В еще одном варианте воплощения способ включает определение уровня ингибиторного антитела FVIII по меньшей мере в двух образцах, взятых у субъекта в разное время, и сравнение уровней ингибиторного антитела FVIII в указанных двух образцах, причем снижение уровня антитела с течением времени указывает на формирование иммунной толерантности к белку FVIII у субъекта.

В одном варианте воплощения указанный способ включает способ мониторинга заместительной терапии FVIII у субъекта, нуждающегося в этом, включающий контакт биологического образца субъекта с пептидом FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶, пептидом FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ или пептидом FVIII¹⁰²⁻¹²², как описано здесь; и обнаружение комплекса, образованного пептидом FVIII и CD4+ Т-клеткой, специфичной к FVIII, присутствующей в образце. В одном варианте воплощения указанный способ включает определение уровня CD4+ Т-клеток, специфичных к FVIII, в образце. В еще одном варианте воплощения способ включает определение уровня CD4+ Т-клеток, специфичных к FVIII, по меньшей мере в двух образцах, взятых у субъекта в разное время, и сравнение уровней CD4+ Т-клеток, специфичных к FVIII, в указанных двух образцах, причем увеличение уровня антитела с течением времени указывает на формирование иммунного ответа против FVIII, введенного субъекту в ходе заместительной терапии FVIII. В конкретном варианте воплощения указанный пептид FVIII образует комплекс с мультимером МНС II класса.

В еще одном варианте воплощения указанный способ включает способ мониторинга терапии индукции иммунной толерантности к FVIII у субъекта, нуждающегося в этом, включающий контакт биологического образца субъекта с пептидом FVIII²⁴⁶⁻²⁶⁶, пептидом FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ или пептидом FVIII¹⁰²⁻¹²², как описано здесь; и обнаружение комплекса, образованного пептидом FVIII и CD4+ Т-клеткой, специфичной к FVIII, присутствующей в образце. В одном варианте воплощения указанный способ включает определение уровня CD4+ Т-клеток, специфичных к FVIII, в образце. В еще одном варианте воплощения способ включает определение уровня CD4+ Т-клеток, специфичных к FVIII, по меньшей мере в двух образцах, взятых у субъекта в разное время, и сравнение уровней CD4+ Т-клеток, специфичных к FVIII, в указанных двух образцах, причем снижение уровня антитела с течением времени указывает на формирование иммунной толерантности к белку FVIII у субъекта. В конкретном варианте воплощения указанный пептид FVIII образует комплекс с мультимером МНС II класса.

Как должно быть понятно специалистам в данной области техники, иммунный мониторинг можно использовать, например, для облегчения лечения пациентов с гемофилией. Например, иммунный мониторинг можно использовать для определения того, предотвращает ли или снижает ли введение пептидов и/или композиций по настоящему изобретению иммунный ответ на продукт FVIII. С помощью иммунного мониторинга можно оптимизировать дозируемые количества и/или интервалы дозирования. В некоторых вариантах воплощения вводимые дозировки могут быть специально разработаны на основе результатов иммунного мониторинга предотвращения или снижения антител против FVIII. Кроме того, можно определить интервалы дозирования, а также дозируемые количества для конкретного пациента или группы пациентов.

А. Способы идентификации Т-клеток, специфичных к FVIII.

В еще одном аспекте настоящее изобретение включает способы идентификации антиген-специфичных Т-клеток, в частности Т-клеток, специфичных к белку FVIII и пептидам FVIII, описанных здесь. Такие способы можно, например, использовать для иммунодиагностики, например, иммунного мониторинга пациента. В одном варианте воплощения настоящее изобретение включает в себя способ идентификации Т-клеток, специфичных к пептиду FVIII, включающий а) объединение множества CD4⁺ Т-клеток с пептидом FVIII, образовавшим комплекс с мультимером МНС II класса, причем пептид FVIII обладает последовательностью (R¹)_x-P-(R²)_y, где Р является аминокислотной последовательностью, обладающей по меньшей мере 85% идентичностью последовательности по меньшей мере из девяти смежных аминокислот последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 68, 344 и 740; R¹ является аминокислотной

последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; а каждый из x и y независимо друг от друга равен нулю или единице; и б) идентификацию по меньшей мере одного из членов множества $CD4^+$ Т-клеток, специфичного к пептиду, находящемуся в комплексе с мультимером МНС II класса. В некоторых вариантах воплощения R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-40 аминокислот, а R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-40 аминокислот.

В некоторых вариантах воплощения пептиды FVIII, раскрытые здесь, можно использовать для получения реагентов, подходящих для прямого окрашивания FVIII-специфичных Т-клеток. Так, например, мультимеры МНС II класса, представляющие пептиды FVIII по настоящему изобретению, могут включать различные формы, например тетрамер МНС II класса. Указанные молекулы МНС II класса могут быть дополнительно модифицированы для включения диагностического агента. В качестве альтернативы пептиды FVIII, образующие комплекс с мультимерами МНС II класса, могут включать диагностический агент. Диагностические агенты (т.е. обнаруживаемая группа), применяемые в настоящем изобретении, могут включать агенты, используемые в данной области техники для иммунного мониторинга. Например, FVIII-специфические Т-клетки можно идентифицировать и/или выделить, основываясь на обнаружении диагностического агента, связанного с пептидом FVIII, описанным здесь, представленным тетрамером МНС II класса. Подходящие диагностические агенты могут включать флуоресцентный агент, хемилюминесцентный агент, радиоактивный агент, контрастное вещество и т.п. Подходящие флуоресцентные агенты включают агенты, обычно используемые в проточной цитометрии, и могут включать флуоресцеинизотиоцианат, R-фикоэритрин, техасский красный, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7 и их производные, но не ограничиваются ими.

В некоторых вариантах воплощения пептид FVIII можно использовать для повторного стимулирования *in vitro* $CD4^+$ Т-клеток, специфичных к FVIII. В указанных вариантах воплощения повторную стимуляцию Т-клеток можно отслеживать путем обнаружения пролиферации, секреции цитокинов или хемокинов или стимуляции или подавления некоторых маркеров активации, известных специалистам в данной области техники.

В некоторых вариантах воплощения обнаружение диагностического агента можно использовать для идентификации и/или выделения Т-клеток, специфичных к пептидам FVIII, раскрытых здесь. Например, вышеуказанные реагенты (например, пептид, тетрамер МНС II класса и диагностический агент) можно использовать для отслеживания FVIII-специфических Т-клеток *in vitro* или *ex vivo*. В некоторых вариантах воплощения Т-клетки можно дополнительно выделить и охарактеризовать, используя различные способы, известные в данной области техники, такие как проточная цитометрия, например флуоресцентную сортировку клеток (FACS) и/или ПЦР, например ПЦР с использованием ДНК отдельной клетки.

Для выполнения анализов иммунного мониторинга Т-клетки, связывающие комплекс "пептид FVIII - мультимер МНС II класса", включают $CD4^+$ Т-клетки и могут быть выделены из организма пациента с помощью различных способов, общеизвестных в данной области техники. Например, Т-клетки можно выделить и очистить из крови пациента, органов или других тканей. Выделение и идентификация FVIII-специфичных Т-клеток может использоваться при различных вариантах применения в иммунодиагностике. В некоторых вариантах воплощения пептиды FVIII или связанные с ними реагенты можно использовать для иммунного мониторинга FVIII-специфичных Т-клеток при клинической разработке нового продукта FVIII. В других вариантах воплощения пептиды FVIII можно использовать для иммунного мониторинга FVIII-специфичных Т-клеток при терапии индукции иммунной толерантности. В других вариантах воплощения пептиды FVIII можно использовать для иммунного мониторинга FVIII-специфичных Т-клеток во время лечения FVIII.

VIII. Наборы по изобретению.

Настоящее изобретение также обеспечивает наборы для облегчения и/или стандартизованного использования композиций, представленных в настоящем изобретении, а также облегчения реализации способов по настоящему изобретению. Материалы и реагенты для осуществления указанных различных способов можно представить в виде наборов для облегчения реализации указанных способов. Как используется здесь, термин "набор" используется по отношению к комбинации изделий, облегчающих процесс, анализ или манипуляцию.

Наборы могут содержать химические реагенты (например, пептиды FVIII или полинуклеотиды, кодирующие пептиды FVIII), а также другие компоненты. Кроме того, наборы по настоящему изобретению могут также включать, например, не ограничиваясь ими, аппарат и реагенты для отбора и/или очистки образцов, аппарат и реагенты для сбора и/или очистки продукта, реагенты для трансформации бактериальных клеток, реагенты для трансфекции эукариотических клеток, предварительно трансформированные или трансфицированные клетки-хозяева, пробирки для образцов, держатели, лотки, стойки, планшеты, чашки, инструкции для пользователя набора, растворы, буферы или другие химические реагенты, образцы, предназначенные для стандартизации, нормирования, и/или контрольные образцы. Наборы по настоящему изобретению также могут быть упакованы для надлежащего хранения и безопасной доставки, например, в коробку с крышкой.

В некоторых вариантах воплощения, например, наборы по настоящему изобретению могут обеспе-

чивать пептид FVIII по изобретению, полинуклеотидный вектор (например, плазмиду), кодирующий пептид FVIII по изобретению, клетки бактериальных штаммов, подходящие для клонирования вектора, и реагенты для очистки экспрессированных слитых белков. В качестве альтернативы набор по настоящему изобретению может обеспечивать реагенты, необходимые для осуществления мутагенеза пептида FVIII для получения консервативно модифицированного варианта пептида FVIII.

Набор может содержать одну или более композиций по изобретению, например, один или множество пептидов FVIII или один или множество полинуклеотидов, кодирующих пептиды FVIII. В качестве альтернативы набор может содержать реагенты (например, пептид, тетрамер МНС II класса и диагностический агент) для осуществления иммунного мониторинга у пациента.

Набор по изобретению также может содержать одну или множество молекул рекомбинантных нуклеиновых кислот, кодирующих пептиды FVIII, которые могут быть одинаковыми или различными, и может дополнительно включать, например, функционально связанный второй полинуклеотид, содержащий или кодирующий сайт, распознаваемый эндонуклеазой рестрикции, или сайт, распознаваемый рекомбиназой, или любой полипептид, представляющий интерес. Кроме того, набор может содержать инструкции по применению компонентов набора, в частности, композиций по изобретению, которые содержатся в наборе.

IX. Конкретные варианты воплощения.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает пептид FVIII, состоящий из непрерывной последовательности из девяти аминокислот, по меньшей мере на 85% идентичной девяти смежным аминокислотам следующей аминокислотной последовательности: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344), причем указанный пептид обладает формулой $(R^1)_x$ -пептид- $(R^2)_y$, где R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; а каждый из индексов x и y независимо друг от друга равен нулю или единице.

В одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-80 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-70 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-60 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-50 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-40 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-30 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-20 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-10 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 по отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из 1-5 аминокислот. В еще одном варианте воплощения R^1 и R^2 в отдельности или совместно являются аминокислотными последовательностями, состоящими из от 1 до 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 или 80 аминокислот.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных пептидов как x , так и y равны нулю.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных пептидов x равен единице, а y равен нулю.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных пептидов x равен нулю, а y равен единице.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных пептидов как x , так и y равны единице.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных пептидов указанная непрерывная последовательность из девяти аминокислот идентична девяти смежным аминокислотам в составе аминокислотной последовательности QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344).

В одном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, включающую пептид FVIII, состоящий из непрерывной последовательности из девяти смежных аминокислот, по меньшей мере на 85% идентичной девяти смежным аминокислотам следующей аминокислотной последовательности: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344), причем указанный пептид обладает формулой $(R^1)_x$ -пептид- $(R^2)_y$, где R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; а каждый из индексов x и y независимо друг от друга равен нулю или единице.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных композиций как x , так и y равны нулю.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных композиций x равен единице, а y равен нулю.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных композиций x равен нулю, а y равен единице.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных композиций как x , так и y равны единице.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных композиций указанная композиция дополни-

тельно содержит по меньшей мере один пептид, состоящий из непрерывной последовательности из девяти аминокислот, которая по меньшей мере на 85% идентична девяти смежным аминокислотам в составе аминокислотной последовательности, независимо выбранной из группы, состоящей из

GEVGD TLLIIFKNQASRPYNI (SEQ ID NO:159), PTKSDPRCLTRYSSFVNMER
(SEQ ID NO:250), EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (SEQ ID NO:477),
LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (SEQ ID NO:568), NPPIIARYIRLHPHTHYSIRST
(SEQ ID NO:659), TVVITLKNMASHPVS LHA (SEQ ID NO:10),
AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO:68) и TVVITLKNMASHPVS LHAVGV
(SEQ ID NO:740),

причем максимальная длина по меньшей мере одного пептида составляет 80 аминокислот, а любые дополнительные аминокислоты в составе по меньшей мере одного пептида являются природными аминокислотами.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ индукции иммунной толерантности к FVIII у субъекта, включающий стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, включающей пептид FVIII, состоящий из непрерывной последовательности из девяти аминокислот, по меньшей мере на 85% идентичной девяти смежным аминокислотам в составе следующей аминокислотной последовательности: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344), причем указанный пептид обладает формулой $(R^1)_x$ -пептид- $(R^2)_y$, где R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; а каждый из индексов x и y независимо друг от друга равен нулю или единице; тем самым индуцируя иммунную толерантность к белку FVIII у субъекта.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов фармацевтическая композиция дополнительно содержит по меньшей мере один пептид, состоящий из непрерывной последовательности из девяти аминокислот, которая по меньшей мере на 85% идентична девяти смежным аминокислотам в составе аминокислотной последовательности, независимо выбранной из группы, состоящей из

GEVGD TLLIIFKNQASRPYNI (SEQ ID NO:159), PTKSDPRCLTRYSSFVNMER
(SEQ ID NO:250), EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (SEQ ID NO:477),
LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (SEQ ID NO:568), NPPIIARYIRLHPHTHYSIRST
(SEQ ID NO:659), TVVITLKNMASHPVS LHA (SEQ ID NO:10),
AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO:68) и TVVITLKNMASHPVS LHAVGV
(SEQ ID NO:740),

причем максимальная длина по меньшей мере одного пептида составляет 80 аминокислот, а любые дополнительные аминокислоты в составе по меньшей мере одного пептида являются природными аминокислотами.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов введение фармацевтической композиции предотвращает образование антител против фактора VIII у субъекта.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов введение фармацевтической композиции снижает количество антител против фактора VIII, присутствующих у субъекта.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов как x, так и y равны нулю.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов x равен единице, а y равен нулю.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов x равен нулю, а y равен единице.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов как x, так и y равны единице.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ получения пептида FVIII, включающий стадии: а) обеспечение культуры клеток, включающих вектор, кодирующий пептид FVIII, состоящий из непрерывной последовательности из девяти аминокислот, по меньшей мере на 85% идентичной девяти смежным аминокислотам в составе следующей аминокислотной последовательности: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344), причем указанный пептид обладает формулой $(R^1)_x$ -пептид- $(R^2)_y$, где R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; а каждый из индексов x и y независимо друг от друга равен нулю или единице; и б) экспрессию указанного пептида в культуре клеток.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов как x, так и y равны нулю.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов x равен единице, а y равен нулю.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов x равен нулю, а y равен единице.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов как x, так и y равны единице.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ получения пептида FVIII, включающий стадии: а) синтеза пептида с помощью способов твердофазного синтеза или синтеза в жидкой фазе, причем указанный пептид состоит из непрерывной последовательности из девяти аминокислот;

кислот, по меньшей мере на 85% идентичной девяти смежным аминокислотам в составе следующей аминокислотной последовательности: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344), и обладает формулой $(R^1)_x$ -пептид- $(R^2)_y$, где R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; а каждый из индексов x и y независимо друг от друга равен нулю или единице.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов как x , так и y равны нулю.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов x равен единице, а y равен нулю.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов x равен нулю, а y равен единице.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов как x , так и y равны единице.

В одном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ идентификации Т-клеток, специфичных к пептидам FVIII, включающий стадии: а) объединение множества CD4⁺ Т-клеток с пептидом FVIII, находящимся в комплексе с мультимером МНС II класса, причем пептид FVIII состоит из непрерывной последовательности из девяти аминокислот, по меньшей мере на 85% идентичной девяти смежным аминокислотам в составе следующей аминокислотной последовательности QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344), и обладает формулой $(R^1)_x$ -пептид- $(R^2)_y$, где R^1 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; R^2 является аминокислотной последовательностью, состоящей из 1-80 аминокислот; а каждый из индексов x и y независимо друг от друга равен нулю или единице; и б) идентификация по меньшей мере одного из членов множества CD4⁺ Т-клеток, специфичного к пептиду, находящемуся в комплексе с мультимером МНС II класса.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов мультимер МНС II класса является тетрамером МНС II класса.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов пептид или мультимер МНС II класса дополнительно включают диагностический агент.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов диагностический агент идентифицирует по меньшей мере один член множества CD4⁺ Т-клеток, специфичный к указанному пептиду.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов указанный способ дополнительно включает выделение по меньшей мере одного члена множества CD4⁺ Т-клеток, специфичного к указанному пептиду, на основании обнаружения диагностического агента.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов указанный по меньшей мере один член множества CD4⁺ Т-клеток выделяют с помощью проточной цитометрии.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов как x , так и y равны нулю.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов x равен единице, а y равен нулю.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов x равен нулю, а y равен единице.

В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов как x , так и y равны единице.

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано следующими примерами, но не ограничивается ими.

Х. Примеры.

Пример 1.

С целью лучшей имитации молекулы МНС II класса человека для идентификации пептидов FVIII разработали модель гемофилии А мыши, содержащей химерную молекулу МНС II класса, несущую специфический сайт связывания HLA-DRB1*1501 человека. Выполнили возвратное скрещивание указанной мыши с мышью, характеризующейся полным нокаутом всех генов МНС II класса мыши (Reipert et al., J. Thromb. Haemost. 7 Suppl. 1:92-97 (2009)). В этой новой модели трансгенной мыши все ответы CD4⁺ Т-клеток были опосредованы молекулой МНС II класса человека. Указанную модель мыши использовали для идентификации пептидов FVIII, представленных HLA-DRB1*1501, вызывавшим иммунный ответ против FVIII у указанных мышей.

Материалы и способы.

FVIII: рекомбинантный FVIII (rFVIII) человека получали как нерасфасованный продукт, не содержащий альбумин (Baxter Neuchatel), и продукт FVIII для клинического применения, содержащий сахарозу (Advate, Baxter, Вестлейк-Виллидж, штат Калифорния, США).

Модель гемофилии мыши HLA-DRB15 E17: мыши HLA-DRB1*1501^{+/-}E17^{-/-} соответствовали описанию в статье Reipert et al., J. Thromb. Haemost. 7 Suppl. 1:92-97 (2009). Все мыши являлись самцами в возрасте от 8 до 12 недель на момент начала эксперимента.

Иммунизация рекомбинантным FVIII человека: Мыши HLA-DRB1*1501^{+/-}E17^{-/-} получали от 4 до 8 внутривенных или подкожных доз по 0,2 мкг или 1 мкг rFVIII человека с недельными интервалами. rFVIII разбавляли в исходном буфере препарата или физиологическом растворе с фосфатным буфером по Дульбекко, содержащем кальций и магний (DPBS; Sigma Aldrich, Сент-Луис, штат Миссури, США).

Получение клеток: селезенки получали через 3-7 суток после последней иммунизации rFVIII. Клетки селезенки измельчали и пропускали через сито для клеток с ячейками 70 мкм (Becton Dickinson, Франклин-Лейке, штат Нью-Джерси, США). Одиночные клетки собирали в культуральную среду RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen, Life Technologies, Карлсбад, штат Калифорния, США) с добавлением 10% предварительно отобранной эмбриональной телячьей сыворотки (FCS; Hyclone, Логан, штат Юта, США), 2

мМ L-глутамин, 100 ед/мл пенициллина/стрептомицина (и то, и другое от Gibco) и 5×10^{-5} М меркапто-этанола (Sigma-Aldrich). Эритроциты лизировали, используя гипотонический буфер (pH 7,2), состоявший из 0,15М хлорида аммония, 10 мМ бикарбоната калия (и то, и другое от Merck, Дармштадт, Германия) и 0,1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (Sigma-Aldrich). Клетки промывали и подсчитывали, используя счетчик Coulter Counter Z1.

Получение Т-клеточных гибридом для идентификации пептидов FVIII.

Повторная стимуляция клеток селезенки rFVIII человека *in vitro*. Клетки селезенки повторно стимулировали в присутствии 20 мкг/мл FVIII человека в культуральной среде в концентрации $1,5 \times 10^6$ клеток/мл в течение 3 или 10 суток. Культуральную среду для 10-суточных культур обновляли через 6 суток.

Слияние Т-клеток мыши с клетками BW. Повторно стимулированные *in vitro* культуры клеток селезенки и клетки BW (α - β -) дважды промывали бессывороточной культуральной средой, а затем объединяли в соотношении от 1:3 до 1:10 (Т-клетки:клетки BW). Линия клеток BW происходила от AKR/J Т-клеточной лимфомы мыши. Поверхность указанных клеток не содержала Т-клеточных рецепторов (α - β -), и поэтому любой Т-клеточный рецептор после слияния с клетками селезенки мыши происходил от партнера по слиянию. После третьей стадии промывки супернатант удаляли. Условий слияния достигали путем добавления 1 мл полиэтиленгликоля (ПЭГ, 50% HybiMax, Sigma-Aldrich) в течение 45 с. Еще через 45 с инкубирования последовательно добавляли 50 мл бессывороточной среды для предотвращения токсического действия ПЭГ. Клетки центрифугировали при 1300 об/мин в течение 5 мин без принудительного торможения, образуя очень плотный осадок. Супернатант отбрасывали и очень медленно добавляли новые 50 мл бессывороточной среды, не нарушая осадка. Пробирку медленно переворачивали до ресуспендирования клеток и центрифугировали, как описано ранее. Указанную операцию выполняли дважды для удаления остаточного ПЭГ. На последней стадии промывки использовали культуральную среду. Затем клетки разбавляли и культивировали в 96-луночных планшетах. Через 48 ч культуральную среду заменяли на селективную среду (добавка НАТ к среде, Sigma Aldrich) и отбирали растущие клоны. Культивирование на селективной среде продолжали в течение 2 недель, после чего среду вновь заменяли на обычную культуральную среду.

Специфичность FVIII-специфических Т-клеточных гибридом к пептидам. Т-клеточные гибридомы тестировали на их антигенную специфичность. Для этой цели 1×10^5 клеток культивировали совместно с антигенпрезентирующими клетками. Авторы изобретения использовали либо 5×10^4 клеток Mga (экспрессирующих HLA-DRB1*1501), либо 1×10^5 целых клеток селезенки, полученных из наивных HLA-DRB1*1501-E17 мышей. Клетки инкубировали с 10 мкг/мл rFVIII человека или 1 мкг/мл пулов пептид/пептид в течение 24 ч при 37°C, 5% CO₂. Супернатанты собирали и измеряли высвобождение IL-2 в культуральный супернатант, используя твердофазный ИФА IL-2 (BioLegend, Сан-Диего, штат Калифорния, США) или IL-2 Bio-Plex (Bio-Rad Laboratories, Херкулиз, штат Калифорния, США) в соответствии с протоколом изготовителя. Высвобождение IL-2 ≥ 20 мкг/мл в присутствии, но не в отсутствие FVIII (или пептидов), считали положительным или в качестве альтернативы 10-кратное увеличение высвобождения IL-2 в присутствии FVIII по сравнению с отсутствием FVIII считали положительным.

Субклонирование Т-клеточных гибридом. Все клоны субклонировали для гарантии того, что каждый клон представлял собой только один тип Т-клеточной гибридомы. Клоны гибридом разбавляли до предельного разведения 0,3 клетки/лунку и совместно культивировали с 200 питающих клеток/лунку. Питающие клетки получили путем обработки клеток-партнеров по слиянию (клеток BW) митомицином С. 2×10^8 клеток BW обрабатывали 0,1 мг митомицина С из *Streptomyces caespitosus* (Sigma Aldrich) в течение 10 мин при комнатной температуре и 25 мин при 37°C, 5% CO₂ в инкубаторе. Отбирали пять растущих субклонов на клон и проверяли их специфичность к FVIII.

Пулы пептидов FVIII, использованные для определения специфичности Т-клеточных гибридом. Пулы пептидов FVIII получали, используя способ SPOT-синтеза, как описано в статье Ay et al. (Biopolymers 88:64-75 (2007)). Вкратце, 15-мерные пептиды синтезировали на двух идентичных целлюлозных мембранах. Мембраны разрезали на вертикальные и горизонтальные полосы. Пептиды высвобождали с полос мембран и использовали в качестве пулов пептидов в тестах специфичности, как описано выше. Пептиды растворяли в ДМСО (Hybrimax, Sigma Aldrich) и дополнительно разбавляли PBS.

Результаты.

Был получен 181 FVIII-специфический клон гибридом. Указанные клоны подвергли скринингу, используя пептидную библиотеку, охватывающую весь FVIII человека. Использовали 15-мерные пептиды, смещенные на три аминокислоты. Используя этот подход, идентифицировали шесть различных областей FVIII, содержащих пептиды, связывающиеся с HLA-DRB1*1501. Авторы изобретения обнаружили два пептидных домена в домене A1, два пептида в домене A2, один в домене B, два в домене A3, и один пептидный домен в домене C1 FVIII человека. Пептид FVIII¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴ не был описан ранее (табл. 11). Пептиды FVIII⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴, FVIII⁵⁴⁵⁻⁵⁵⁹, FVIII¹⁷⁸⁸⁻¹⁸⁰² и FVIII²¹⁶¹⁻²¹⁷⁵ уже были идентифицированы в заявке WO 09/071886, где использовали компьютерные программы для прогнозирования, а затем технологию Т-клеточных гибридом. Пептид FVIII²⁰³⁰⁻²⁰⁴⁴ был раскрыт в WO 03/087161. Пептид FVIII²¹⁶¹⁻²¹⁸⁰ уже был опубликован в

статье Jacquemin et al., Blood 101 (4):1351-8 (2003).

Таблица 11

Области фактора VIII, включающие Т-клеточные эпитопы		
Области, включающие Т- клеточные эпитопы	Аминокислотная последовательность	Раскрытия
FVIII ¹⁰²⁻¹²²	TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO:740)	FVIII ¹⁰⁷⁻¹²¹ раскрыт в WO 2003/087161 FVIII ¹⁰⁰⁻¹¹⁸ раскрыт в WO 2009/095646
FVIII ²⁴⁶⁻²⁶⁶	AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO:68)	FVIII ²⁵³⁻²⁶⁸ раскрыт в WO 2009/095646
FVIII ⁴⁷⁴⁻⁴⁹⁴	GEVGDTLIIIFKNQASRPYNI (SEQ ID NO:159)	FVIII ⁴⁷⁵⁻⁴⁹⁵ раскрыт в WO 2009/071886 FVIII ⁴⁷⁷⁻⁴⁹⁵ раскрыт в WO 2009/095646
FVIII ⁵⁴⁰⁻⁵⁶⁰	PTKSDPRCLTRYSSFVNMER (SEQ ID NO:250)	FVIII ⁵⁴²⁻⁵⁶² раскрыт в WO 2009/071886 FVIII ⁵⁴⁵⁻⁵⁶⁹ раскрыт в WO 2009/095646
FVIII ¹⁴⁰¹⁻¹⁴²⁴	QANRSLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO:344)	Пептид по настоящему изобретению
FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵	EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (SEQ ID NO:477)	FVIII ¹⁷⁸⁵⁻¹⁸⁰⁵ раскрыт в WO 2009/071886 FVIII ¹⁷⁸⁷⁻¹⁸⁰⁵ раскрыт в WO 2009/095646
FVIII ²⁰²⁵⁻²⁰⁴⁵	LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG	FVIII ²⁰³⁰⁻²⁰⁴⁴
	(SEQ ID NO:568)	раскрыт в WO 2003/087161
FVIII ²¹⁶⁰⁻²¹⁸⁰	NPPIIARYIRLHPHYSIRST (SEQ ID NO:659)	FVIII ²¹⁵⁸⁻²¹⁷⁸ раскрыт в WO 2009/071886 и FVIII ²¹⁶¹⁻²¹⁸⁰ Jacquemin et al., supra. FVIII ²¹⁶⁴⁻²¹⁸³ раскрыт в WO 2003/087161 FVIII ²¹⁶⁴⁻²¹⁸⁸ раскрыт в WO 2009/095646

Понятно, что примеры и варианты воплощения, описанные здесь, предназначены только для иллюстративных целей, и в их свете специалисты в данной области техники могут предложить различные модификации или изменения, которые должны быть включены в рамки настоящей заявки и прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, патенты и патентные заявки, цитируемые здесь, полностью

включены в настоящий документ посредством ссылок для любых целей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид фактора VIII (FVIII), способный индуцировать иммунную толерантность к FVIII, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 344.
2. Фармацевтическая композиция для индуцирования иммунной толерантности к FVIII, включающая пептид FVIII по п.1.
3. Композиция по п.2, дополнительно включающая второй пептид FVIII с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 10, 68, 159, 250, 344, 477, 568, 659 и 740.
4. Применение пептида FVIII по п.1 в способе индуцирования иммунной толерантности к FVIII у субъекта, нуждающегося в этом.
5. Применение по п.4, где указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества пептида FVIII по п.1.
6. Применение по п.5, где указанный способ дополнительно включает введение субъекту терапевтически эффективного количества второго пептида FVIII с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 10, 68, 159, 250, 344, 477, 568, 659 и 740.
7. Способ идентификации Т-клетки, специфичной к пептиду FVIII, включающий:
 - а) объединение множества $CD4^+$ Т-клеток с пептидом FVIII по п.1, находящимся в комплексе с мультимером МНС II класса; и
 - б) идентификацию по меньшей мере одной из множества $CD4^+$ Т-клеток, специфичной к указанному пептиду, находящемуся в комплексе с мультимером МНС II класса.
8. Способ по п.7, где мультимер МНС II класса представляет собой тетрамер МНС II класса.
9. Способ по п.7 или 8, где указанный пептид или мультимер МНС II класса дополнительно включают детектируемую группу.
10. Способ по любому из пп.7-9, дополнительно включающий выделение по меньшей мере одной из множества $CD4^+$ Т-клеток, специфичной к указанному пептиду.
11. Способ по п.10, где указанное выделение осуществляют с использованием проточной цитометрии.
12. Слитый белок, способный индуцировать иммунную толерантность к FVIII, включающий пептид FVIII по п.1 и второй репортерный пептид.
13. Способ получения пептида FVIII по п.1, включающий стадии:
 - а) обеспечение культуры клеток, включающих полинуклеотид, кодирующий пептид FVIII по п.1; и
 - б) экспрессия указанного полинуклеотида в указанной культуре клеток.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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