

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092049** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.11.10

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

(22) Дата подачи заявки
2016.11.11

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

(31) **62/255,323**

(32) **2015.11.13**

(33) **US**

(62) **201891138; 2016.11.11**

(71) Заявитель:
**БАКСАЛТА ИНКОРПОРЕЙТЕД
(US); БАКСАЛТА ГМБХ (CH)**

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

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

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

A1

202092049

202092049

A1

**ВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ, КОДИРУЮЩИЕ РЕКОМБИНАНТНЫЕ ВАРИАНТЫ FVIII C
ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ ДЛЯ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ГЕМОФИЛИИ А**
ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/255 323, поданной 13 ноября 2015 года, содержание которой включено в данное описание посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] В данном приложении содержится список последовательностей, который представлен в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в данное описание посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 7 ноября 2016 года имеет имя 008073_5115_WO_Sequence_Listing.txt и имеет размер 183,311 байт.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Коагуляция крови протекает посредством сложного и динамического биологического пути взаимозависимых биохимических реакций, называемого каскадом коагуляции. Фактор коагуляции VIII (FVIII) является ключевым компонентом каскада. Фактор VIII поступает в места кровотечения и образует комплекс Хазы с активированным Фактором IX (FIXa) и Фактором X (FX). Комплекс Хазы активирует FX, который, в свою очередь, активирует превращение протромбина в тромбин, который затем активирует другие компоненты в коагуляционном каскаде для создания стабильного тромба (см. Saenko et al., *Trends Cardiovasc. Med.*, 9:185-192 (1999); Lenting et al., *Blood*, 92:3983-3996 (1998)).

[0004] Гемофилия А представляет собой врожденное X-сцепленное расстройство свертывания крови, характеризующееся дефицитом активности фактора VIII. Уменьшенная активность фактора VIII ингибирует контур положительной обратной связи в каскаде коагуляции. Это приводит к неполной коагуляции, которая проявляется в виде случаев кровотечения с повышенной продолжительностью, обширного кровоподтека, спонтанным оральных и назальных кровотечений, суставной жесткостью и хронической болью и, возможно, внутреннего кровотечения и анемии в тяжелых

случаях (Zhang et al., *Clinic. Rev. Allerg. Immunol.*, 37:114-124 (2009)).

[0005] Обычно при гемофилии А применяется заместительная терапия фактора VIII, которая состоит из введения белка фактора VIII (например, полученного из плазмы или рекомбинантно фактора VIII) человеку с гемофилией А. Фактор VIII вводится профилактически для предотвращения или уменьшения частоты случаев кровотечения, в ответ на эпизод острого кровотечения и/или периоперационно, чтобы кровотечение было управляемым во время операции. Однако существует несколько нежелательных особенностей заместительной терапии фактора VIII.

[0006] Во-первых, заместительная терапия фактора VIII используется для лечения или контроля гемофилии А, но не излечивает лежащий в основе дефицит фактора VIII. Из-за этого люди с гемофилией А требуют заместительной терапии фактора VIII на протяжении всей своей жизни. Непрерывное лечение является дорогостоящим и требует от человека соблюдения строгого режима терапии, поскольку отсутствие приема лишь нескольких профилактических доз может иметь серьезные последствия для лиц с тяжелой формой гемофилии А.

[0007] Во-вторых, поскольку фактор VIII имеет относительно короткий период полувыведения *in vivo*, традиционная профилактическая заместительная терапия фактора VIII требует введения каждый второй или третий день. Это налагает нагрузку на человека в виде соблюдения терапии на протяжении всей его жизни. В то время как препараты третьего поколения «длительного действия» фактора VIII могут снизить частоту введения, профилактическая заместительная терапия фактора FVIII с этими препаратами по-прежнему требует ежемесячного, еженедельного или более частого применения в течение неограниченного срока. Например, профилактическое лечение с помощью ELOSTATE™ [Antihemophilic Factor (Recombinant), Fc Fusion Protein] требует введения каждые три-пять дней (ELOSTATE™ Prescriptioning Information, Biogen Idec Inc., (2015)). Более того, долгосрочные эффекты химически модифицированных биологических препаратов

(например, пегилированных полипептидов) еще не полностью изучены.

[0008] В-третьих, от 15% до 30% всех лиц, получающих заместительную терапию фактора VIII, образуют ингибирующие антитела к фактору VIII, что делает терапию неэффективной. Обходная терапия фактора VIII (например, введение комплексных концентратов протромбинового комплекса из плазмы или полученного рекомбинантно) можно использовать для лечения гемофилии у индивидуумов, у которых образуются ингибирующие антитела. Однако обходная терапия фактора VIII менее эффективна, чем заместительная терапия фактора VIII (Mannucci P.M., J Thromb Haemost., 1 (7): 1349-55 (2003)) и может быть связана с повышенным риском сердечно-сосудистых осложнений (Luu and Ewenstein, Haemophilia, 10 Suppl. 2:10-16 (2004)).

[0009] Соматическая генная терапия имеет большие перспективы в лечении гемофилии А, потому что она устраняет лежащую в основе недостаточную экспрессию фактора VIII (например, из-за миссенс- или нонсенс-мутаций), а не обеспечивает одноразовую дозу активности фактора VIII для индивида. Из-за этой разницы в механизме действия по сравнению с заместительной терапией фактора VIII однократное введение вектора генной терапии фактора VIII может в течение нескольких лет обеспечивать индивидуума фактором VIII, снижая затраты на лечение и устраняя необходимость в продолжении соблюдения терапии пациентом.

[0010] Генная терапия фактора коагуляции IX (FIX) была эффективно использована для лечения людей с гемофилией В, связанного с ней состояния свертывания крови, характеризующегося сниженной активностью фактора IX (Manno C.S., et al., Nat Med., 12(3):342-47 (2006)). Однако генная терапия фактора VIII имеет несколько уникальных проблем. Например, полноразмерный полипептид фактора VIII дикого типа (2351 аминокислота, номер доступа UniProt P00451) в пять раз больше, чем полноразмерный полипептид фактора IX дикого типа (461 аминокислота, номер доступа UniProt P00740). По существу, кодирующая последовательность фактора VIII дикого типа представляет собой

7053 пары оснований, которые слишком велики для вставки в векторы генной терапии AAV. Кроме того, наблюдаемая экспрессия рекомбинантных вариантов с удаленным В-доменом фактора VIII (BDD-FVIII) была низкой. Таким образом, несколько групп пытались изменить использование кодонов конструкций BDD-FVIII с ограниченным успехом.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0011] Соответственно, существует потребность в вариантах фактора VIII, кодирующие последовательности которых более эффективно упаковываются и переносятся с помощью векторов генной терапии. Существует также потребность в синтетических нуклеиновых кислотах с измененными кодонами, которые экспрессируют фактор VIII более эффективно. Такие варианты фактора VIII и нуклеиновые кислоты с измененными кодонами, позволяют улучшить лечение дефицитов фактора VIII (например, гемофилии А). Вышеупомянутые недостатки и другие проблемы, связанные с лечением дефицитов фактора VIII (например, гемофилии А), снижаются или устраняются описанными вариантами фактора VIII с измененными кодонами.

[0012] В соответствии с некоторыми вариантами реализации данное изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим варианты фактора VIII, которые имеют высокую идентичность последовательности с описанными последовательностями с измененными кодонами тяжелой цепи фактора VIII (например, CS01-HC-NA, CS04-HC-NA или CS23-HC-NA) и легкой цепи (CS01-LC-NA, CS04-LC-NA или CS23-LC-NA). В некоторых вариантах реализации изобретения эти нуклеиновые кислоты дополнительно содержат последовательность, кодирующую линкерную последовательность, которая заменяет нативный В-домен фактора VIII (например, линкерные последовательности, содержащие фуриновый сайт расщепления) между последовательностями, кодирующими тяжелые и легкие цепи фактора VIII.

[0013] В одном аспекте данное изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фактора VIII. Полипептид фактора VIII содержит легкую цепь, тяжелую цепь и полипептидный линкер,

соединяющий С-конец тяжелой цепи с N-концом легкой цепи. Тяжелая цепь полипептида фактора VIII кодируется первой нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS04-HC-NA (SEQ ID NO: 3). Легкая цепь полипептида фактора FVIII кодируется второй нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS04-LC-NA (SEQ ID NO: 4). Полипептидный линкер содержит фуриновый сайт расщепления.

[0014] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полипептидный линкер кодируется третьей нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью BDLO04 (SEQ ID NO: 6).

[0015] В одном аспекте данное изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фактора VIII. Полипептид фактора VIII содержит легкую цепь, тяжелую цепь и полипептидный линкер, соединяющий С-конец тяжелой цепи с N-концом легкой цепи. Тяжелая цепь полипептида фактора VIII кодируется первой нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS01-HC-NA (SEQ ID NO: 24). Легкая цепь полипептида фактора FVIII кодируется второй нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS01-LC-NA (SEQ ID NO: 25). Полипептидный линкер содержит фуриновый сайт расщепления.

[0016] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полипептидный линкер кодируется третьей нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью BDLO01 (SEQ ID NO: 5).

[0017] В одном аспекте данное изобретение относится к полинуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фактора VIII. Полипептид фактора VIII содержит легкую цепь, тяжелую цепь и полипептидный линкер, соединяющий С-конец тяжелой цепи с N-концом легкой цепи. Тяжелая цепь полипептида фактора VIII кодируется первой нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS23-HC-NA (SEQ ID NO: 22). Легкая цепь

полипептида фактора FVIII кодируется второй нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS23-LC-NA (SEQ ID NO: 23). Полипептидный линкер содержит фуриновый сайт расщепления.

[0018] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полипептидный линкер кодируется третьей нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью BDLO23 (SEQ ID NO: 7).

[0019] В одном варианте реализации описанных выше полинуклеотидов первая нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь полипептида фактора VIII, имеет по меньшей мере 96% идентичности с соответствующей последовательностью тяжелой цепи (например, CS04-HC-NA (SEQ ID NO: 3), CS01-HC-NA (SEQ ID NO: 24) или CS23-HC-NA (SEQ ID NO: 22)), а вторая нуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь полипептида фактора FVIII, имеет по меньшей мере 96% идентичности с соответствующей последовательностью легкой цепи (например, CS04-LC-NA (SEQ ID NO: 4), CS01-LC-NA (SEQ ID NO: 25) или CS23-LC-NA (SEQ ID NO: 23)).

[0020] В одном варианте реализации описанных выше полинуклеотидов первая нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь полипептида фактора VIII, имеет по меньшей мере 97% идентичности с соответствующей последовательностью тяжелой цепи (например, CS04-HC-NA (SEQ ID NO: 3), CS01-HC-NA (SEQ ID NO: 24) или CS23-HC-NA (SEQ ID NO: 22)), а вторая нуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь полипептида фактора FVIII, имеет по меньшей мере 97% идентичности с соответствующей последовательностью легкой цепи (например, CS04-LC-NA (SEQ ID NO: 4), CS01-LC-NA (SEQ ID NO: 25) или CS23-LC-NA (SEQ ID NO: 23)).

[0021] В одном варианте реализации описанных выше полинуклеотидов первая нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь полипептида фактора VIII, имеет по меньшей мере 98% идентичности с соответствующей последовательностью тяжелой цепи (например, CS04-HC-NA (SEQ ID NO: 3), CS01-HC-NA (SEQ ID NO: 24) или CS23-HC-NA (SEQ ID NO: 22)), а вторая нуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь полипептида фактора FVIII, имеет по меньшей мере 98% идентичности с соответствующей последовательностью легкой цепи (например, CS04-LC-NA (SEQ ID NO: 4), CS01-LC-NA (SEQ ID NO: 25) или CS23-LC-NA (SEQ ID NO: 23)).

22)), а вторая нуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь полипептида фактора FVIII, имеет по меньшей мере 98% идентичности с соответствующей последовательностью легкой цепи (например, CS04-LC-NA (SEQ ID NO: 4), CS01-LC-NA (SEQ ID NO: 25) или CS23-LC-NA (SEQ ID NO: 23)).

[0022] В одном варианте реализации описанных выше полинуклеотидов первая нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь полипептида фактора VIII, имеет по меньшей мере 99% идентичности с соответствующей последовательностью тяжелой цепи (например, CS04-HC-NA (SEQ ID NO: 3), CS01-HC-NA (SEQ ID NO: 24) или CS23-HC-NA (SEQ ID NO: 22)), а вторая нуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь полипептида фактора FVIII, имеет по меньшей мере 99% идентичности с соответствующей последовательностью легкой цепи (например, CS04-LC-NA (SEQ ID NO: 4), CS01-LC-NA (SEQ ID NO: 25) или CS23-LC-NA (SEQ ID NO: 23)).

[0023] В одном варианте реализации описанных выше полинуклеотидов первая нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь полипептида фактора VIII, имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с соответствующей последовательностью тяжелой цепи (например, CS04-HC-NA (SEQ ID NO: 3), CS01-HC-NA (SEQ ID NO: 24) или CS23-HC-NA (SEQ ID NO: 22)), а вторая нуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь полипептида фактора FVIII, имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с соответствующей последовательностью легкой цепи (например, CS04-LC-NA (SEQ ID NO: 4), CS01-LC-NA (SEQ ID NO: 25) или CS23-LC-NA (SEQ ID NO: 23)).

[0024] В одном варианте реализации описанных выше полинуклеотидов первая нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь полипептида фактора VIII, имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с соответствующей последовательностью тяжелой цепи (например, CS04-HC-NA (SEQ ID NO: 3), CS01-HC-NA (SEQ ID NO: 24) или CS23-HC-NA (SEQ ID NO: 22)), а вторая нуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь полипептида фактора FVIII, имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с соответствующей последовательностью легкой

цепи (например, CS04-LC-NA (SEQ ID NO: 4), CS01-LC-NA (SEQ ID NO: 25) или CS23-LC-NA (SEQ ID NO: 23)).

[0025] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, первая нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь полипептида фактора VIII, представляет собой последовательность CS04-HC-NA (SEQ ID NO: 3), а вторая нуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь полипептида фактора FVIII представляет собой последовательность CS04-LC-NA (SEQ ID NO: 4).

[0026] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, первая нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь полипептида фактора VIII, представляет собой последовательность CS01-HC-NA (SEQ ID NO: 24), а вторая нуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь полипептида фактора FVIII представляет собой последовательность CS01-LC-NA (SEQ ID NO: 25).

[0027] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, первая нуклеотидная последовательность, кодирующая тяжелую цепь полипептида фактора VIII, представляет собой последовательность CS23-HC-NA (SEQ ID NO: 22), а вторая нуклеотидная последовательность, кодирующая легкую цепь полипептида фактора FVIII представляет собой последовательность CS23-LC-NA (SEQ ID NO: 23).

[0028] В одном аспекте описание предлагает полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS04-FL-NA, причем полинуклеотид кодирует полипептид фактора VIII.

[0029] В одном аспекте описание предлагает полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS01-FL-NA, причем полинуклеотид кодирует полипептид фактора VIII.

[0030] В одном аспекте описание предлагает полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS23-FL-NA, причем полинуклеотид кодирует полипептид фактора VIII.

[0031] В одном варианте реализации полинуклеотидов,

описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 96% идентичности с соответствующей полноразмерной полинуклеотидной последовательностью (например, CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1), CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13) или CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20)).

[0032] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с соответствующей полноразмерной полинуклеотидной последовательностью (например, CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1), CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13) или CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20)).

[0033] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с соответствующей полноразмерной полинуклеотидной последовательностью (например, CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1), CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13) или CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20)).

[0034] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с соответствующей полноразмерной полинуклеотидной последовательностью (например, CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1), CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13) или CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20)).

[0035] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с соответствующей полноразмерной полинуклеотидной последовательностью (например, CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1), CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13) или CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20)).

[0036] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с соответствующей полноразмерной полинуклеотидной последовательностью (например, CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1), CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13) или CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20)).

[0037] В одном варианте реализации описанных выше

полинуклеотидов нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1).

[0038] В одном варианте реализации описанных выше полинуклеотидов нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13).

[0039] В одном варианте реализации описанных выше полинуклеотидов нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20).

[0040] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полинуклеотид кодирует полипептид фактора VIII, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2).

[0041] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полинуклеотид кодирует полипептид фактора VIII, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 96% идентичности с последовательностью CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2).

[0042] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полинуклеотид кодирует полипептид фактора VIII, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 97% идентичности с последовательностью CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2).

[0043] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полинуклеотид кодирует полипептид фактора VIII, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичности с последовательностью CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2).

[0044] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полинуклеотид кодирует полипептид фактора VIII, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2).

[0045] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полинуклеотид кодирует полипептид фактора VIII, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей

мере 99.5% идентичности с последовательностью CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2).

[0046] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полинуклеотид кодирует полипептид фактора VIII, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99.9% идентичности с последовательностью CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2).

[0047] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полинуклеотид кодирует полипептид фактора VIII, содержащий аминокислотную последовательность CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2).

[0048] В одном аспекте данное описание предлагает полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, имеющий по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS04-SC1-NA (SEQ ID NO: 9), причем полинуклеотид кодирует одноцепочечный полипептид фактора VIII.

[0049] В одном аспекте данное описание предлагает полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, имеющий по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS04-SC2-NA (SEQ ID NO: 11), причем полинуклеотид кодирует одноцепочечный полипептид фактора VIII.

[0050] В одном аспекте данное описание предлагает полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, имеющий по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS01-SC1-NA (SEQ ID NO: 26), причем полинуклеотид кодирует одноцепочечный полипептид фактора VIII.

[0051] В одном аспекте данное описание предлагает полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, имеющий по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS01-SC2-NA (SEQ ID NO: 27), причем полинуклеотид кодирует одноцепочечный полипептид фактора VIII.

[0052] В одном аспекте данное описание предлагает полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, имеющий по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS23-SC1-NA (SEQ ID NO: 28), причем полинуклеотид кодирует одноцепочечный полипептид фактора VIII.

[0053] В одном аспекте данное описание предлагает полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, имеющий по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью CS23-SC2-NA (SEQ ID NO: 29), причем полинуклеотид кодирует одноцепочечный полипептид фактора VIII.

[0054] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 96% идентичности с соответствующей полноразмерной полинуклеотидной последовательностью (например, CS04-SC1-NA (SEQ ID NO: 9), CS04-SC2-NA (SEQ ID NO: 11), CS01-SC1-NA (SEQ ID NO: 26), CS01-SC2-NA (SEQ ID NO: 27), CS23-SC1-NA (SEQ ID NO: 28) или CS23-SC2-NA (SEQ ID NO: 29)).

[0055] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с соответствующей полноразмерной полинуклеотидной последовательностью (например, CS04-SC1-NA (SEQ ID NO: 9), CS04-SC2-NA (SEQ ID NO: 11), CS01-SC1-NA (SEQ ID NO: 26), CS01-SC2-NA (SEQ ID NO: 27), CS23-SC1-NA (SEQ ID NO: 28) или CS23-SC2-NA (SEQ ID NO: 29)).

[0056] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с соответствующей полноразмерной полинуклеотидной последовательностью (например, CS04-SC1-NA (SEQ ID NO: 9), CS04-SC2-NA (SEQ ID NO: 11), CS01-SC1-NA (SEQ ID NO: 26), CS01-SC2-NA (SEQ ID NO: 27), CS23-SC1-NA (SEQ ID NO: 28) или CS23-SC2-NA (SEQ ID NO: 29)).

[0057] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с соответствующей полноразмерной полинуклеотидной последовательностью (например, CS04-SC1-NA (SEQ ID NO: 9), CS04-SC2-NA (SEQ ID NO: 11), CS01-SC1-NA (SEQ ID NO: 26), CS01-SC2-NA (SEQ ID NO: 27), CS23-SC1-NA (SEQ ID NO: 28) или CS23-SC2-NA (SEQ ID NO: 29)).

[0058] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с соответствующей полноразмерной

полинуклеотидной последовательностью (например, CS04-SC1-NA (SEQ ID NO: 9), CS04-SC2-NA (SEQ ID NO: 11), CS01-SC1-NA (SEQ ID NO: 26), CS01-SC2-NA (SEQ ID NO: 27), CS23-SC1-NA (SEQ ID NO: 28) или CS23-SC2-NA (SEQ ID NO: 29)).

[0059] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с соответствующей полноразмерной полинуклеотидной последовательностью (например, CS04-SC1-NA (SEQ ID NO: 9), CS04-SC2-NA (SEQ ID NO: 11), CS01-SC1-NA (SEQ ID NO: 26), CS01-SC2-NA (SEQ ID NO: 27), CS23-SC1-NA (SEQ ID NO: 28) или CS23-SC2-NA (SEQ ID NO: 29)).

[0060] В одном варианте реализации описанных выше полинуклеотидов нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность CS04-SC1-NA (SEQ ID NO: 9).

[0061] В одном варианте реализации описанных выше полинуклеотидов нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность CS04-SC2-NA (SEQ ID NO: 11).

[0062] В одном варианте реализации описанных выше полинуклеотидов нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность CS01-SC1-NA (SEQ ID NO: 26).

[0063] В одном варианте реализации описанных выше полинуклеотидов нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность CS01-SC2-NA (SEQ ID NO: 27).

[0064] В одном варианте реализации описанных выше полинуклеотидов нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность CS23-SC1-NA (SEQ ID NO: 28).

[0065] В одном варианте реализации описанных выше полинуклеотидов нуклеотидная последовательность представляет собой последовательность CS23-SC2-NA (SEQ ID NO: 29).

[0066] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 95% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из CS01-FL-NA, CS01-HC-NA, CS01-LC-NA, CS04-FL-NA, CS04-HC-NA, CS04-LC-NA, CS23-FL-NA, CS23-HC-NA, CS23-LC-NA, CS01-SC1-NA, CS04-SC1-NA, CS23-SC1-NA, CS01-SC2-NA, CS04-SC2-NA и CS23-SC2-NA.

[0067] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 96% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из CS01-FL-NA, CS01-HC-NA, CS01-LC-NA, CS04-FL-NA, CS04-HC-NA, CS04-LC-NA, CS23-FL-NA, CS23-HC-NA, CS23-LC-NA, CS01-SC1-NA, CS04-SC1-NA, CS23-SC1-NA, CS01-SC2-NA, CS04-SC2-NA и CS23-SC2-NA.

[0068] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из CS01-FL-NA, CS01-HC-NA, CS01-LC-NA, CS04-FL-NA, CS04-HC-NA, CS04-LC-NA, CS23-FL-NA, CS23-HC-NA, CS23-LC-NA, CS01-SC1-NA, CS04-SC1-NA, CS23-SC1-NA, CS01-SC2-NA, CS04-SC2-NA и CS23-SC2-NA.

[0069] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из CS01-FL-NA, CS01-HC-NA, CS01-LC-NA, CS04-FL-NA, CS04-HC-NA, CS04-LC-NA, CS23-FL-NA, CS23-HC-NA, CS23-LC-NA, CS01-SC1-NA, CS04-SC1-NA, CS23-SC1-NA, CS01-SC2-NA, CS04-SC2-NA и CS23-SC2-NA.

[0070] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из CS01-FL-NA, CS01-HC-NA, CS01-LC-NA, CS04-FL-NA, CS04-HC-NA, CS04-LC-NA, CS23-FL-NA, CS23-HC-NA, CS23-LC-NA, CS01-SC1-NA, CS04-SC1-NA, CS23-SC1-NA, CS01-SC2-NA, CS04-SC2-NA и CS23-SC2-NA.

[0071] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из CS01-FL-NA, CS01-HC-NA, CS01-LC-NA, CS04-FL-NA, CS04-HC-NA, CS04-LC-NA, CS23-FL-NA, CS23-HC-NA, CS23-LC-NA, CS01-SC1-NA, CS04-SC1-NA, CS23-SC1-NA, CS01-SC2-NA, CS04-SC2-NA и CS23-SC2-NA.

[0072] В одном варианте реализации полинуклеотидов,

описанных выше, нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из CS01-FL-NA, CS01-HC-NA, CS01-LC-NA, CS04-FL-NA, CS04-HC-NA, CS04-LC-NA, CS23-FL-NA, CS23-HC-NA, CS23-LC-NA, CS01-SC1-NA, CS04-SC1-NA, CS23-SC1-NA, CS01-SC2-NA, CS04-SC2-NA и CS23-SC2-NA.

[0073] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, нуклеотидная последовательность выбрана из группы, состоящей из CS01-FL-NA, CS01-HC-NA, CS01-LC-NA, CS04-FL-NA, CS04-HC-NA, CS04-LC-NA, CS23-FL-NA, CS23-HC-NA, CS23-LC-NA, CS01-SC1-NA, CS04-SC1-NA, CS23-SC1-NA, CS01-SC2-NA, CS04-SC2-NA и CS23-SC2-NA.

[0074] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, кодируемый полипептид фактора VIII содержит гликозилируемый полипептид, расположенный между двумя последовательными аминокислотами.

[0075] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полинуклеотид также содержит промоторный элемент, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим полипептид фактора VIII.

[0076] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полинуклеотид также содержит энхансерный элемент, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим полипептид фактора VIII.

[0077] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полинуклеотид также содержит элемент полиаденилирования, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим полипептид фактора VIII.

[0078] В одном варианте реализации полинуклеотидов, описанных выше, полинуклеотид также содержит интрон, оперативно связанный с нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид фактора VIII.

[0079] В одном варианте реализации описанных выше полинуклеотидов интрон расположен между промоторным элементом и сайтом инициации трансляции (например, первым кодирующим ATG) нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид фактора

VIII.

[0080] В другом аспекте описание предлагает вектор генной терапии млекопитающих, содержащий полинуклеотид, как описано выше.

[0081] В одном варианте реализации вектора генной терапии млекопитающих, описанного выше, вектор генной терапии млекопитающих представляет собой вектор аденоассоциированного вируса (AAV).

[0082] В одном варианте реализации вектора генной терапии млекопитающих, описанного выше, вектор AAV представляет собой вектор AAV-8.

[0083] В другом аспекте описание предлагает способ лечения гемофилии А, включающий введение пациенту, нуждающемуся в этом, вектора генной терапии млекопитающих, как описано выше.

[0084] В другом аспекте описание предлагает вектор генной терапии млекопитающих, как описано выше для лечения гемофилии А.

[0085] В другом аспекте описание предлагает использование вектора генной терапии млекопитающих, как описано выше, для изготовления лекарственного средства для лечения гемофилии А.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0086] На Фигуре 1 изображены схематические иллюстрации белковых конструкций фактора VIII человека дикого типа и ReFacto-типа.

[0087] На Фигурах 2А и 2В изображена нуклеотидная последовательность CS04 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 1), кодирующая вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации («CS04-FL-NA» для полноразмерной кодирующей последовательности).

[0088] На Фигуре 3 изображена аминокислотная последовательность фактора VIII (SEQ ID NO: 2), кодируемая нуклеотидной последовательностью CS04 с измененными кодонами, в соответствии с некоторыми вариантами реализации («CS04-FL-AA» для полноразмерной аминокислотной последовательности).

[0089] На Фигуре 4 изображена часть нуклеотидной последовательности CS04 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 3), кодирующая тяжелую цепь варианта фактора VIII в соответствии с

некоторыми вариантами реализации («CS04-HC-NA»).

[0090] На Фигуре 5 изображена часть нуклеотидной последовательности CS04 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 4), кодирующая легкую цепь варианта фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации («CS04-LC-NA»).

[0091] На Фигуре 6 изображены примерные кодирующие последовательности (SEQ ID NOS: 5-7) для линкеров, замещающих В-домен в соответствии с некоторыми вариантами реализации. BDLO01 (SEQ ID NO: 5), BDLO04 (SEQ ID NO: 6) и BDLO23 (SEQ ID NO: 7) являются соответствующими частями CS01, CS04 и CS23 нуклеотидных последовательностей с измененными кодонами, которые кодируют линкер, замещающий В-домен, соответственно.

[0092] На Фигурах 7A, 7B и 7C изображена векторная последовательность AAV (SEQ ID NO: 8), содержащая нуклеотидную последовательность CS04 с измененными кодонами, в соответствии с некоторыми вариантами реализации («CS04-AV-NA»).

[0093] На Фигурах 8A и 8B изображена нуклеотидная последовательность CS04 Δ с измененными кодонами (760-1667) (SPI; CS04 Δ (741-1648), SPE) (SEQ ID NO: 9), кодирующая одноцепочечный вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации («CS04-SC1-NA»).

[0094] На Фигуре 9 изображена аминокислотная последовательность варианта фактора VIII (SEQ ID NO: 10), кодируемая CS01 Δ (760-1667) (SPI; CS01 Δ (741-1648), SPE), CS04 Δ (760-1667) (SPI, CS04 Δ (741-1648), SPE) и CS23 Δ (760-1667) (SPI; CS23 Δ (741-1648), SPE) нуклеотидными последовательностями с измененными кодонами в соответствии с некоторыми вариантами реализации ("CS01-SC1-AA «CS04-SC1-AA» и «CS23-SC1-AA» соответственно).

[0095] На Фигурах 10A и 10B изображена нуклеотидная последовательность CS04 Δ с измененными кодонами (772-1667) (SPI; CS04 Δ (753-1648), SPE) (SEQ ID NO: 11), кодирующая одноцепочечный вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации («CS04-SC2-NA»).

[0096] На Фигуре 11 изображена аминокислотная

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

[0097] На Фигурах 12A и 12B изображена нуклеотидная последовательность CS01 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 13), кодирующая вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации («CS01-FL-NA»).

[0098] На Фигурах 13A и 13B изображена нуклеотидная последовательность CS08 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 14), кодирующая вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации («CS08-FL-NA»).

[0099] На Фигурах 14A и 14B изображена нуклеотидная последовательность CS10 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 15), кодирующая вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации («CS10-FL-NA»).

[00100] На Фигурах 15A и 15B изображена нуклеотидная последовательность CS11 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 16), кодирующая вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации («CS11-FL-NA»).

[00101] На Фигурах 16A и 16B изображена кодирующая последовательность ReFacto дикого типа CS40 (SEQ ID NO: 17) в соответствии с некоторыми вариантами реализации («CS40-FL-NA»).

[00102] На Фигурах 17A и 17B изображена нуклеотидная последовательность CH25 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 18), кодирующая вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации («CH25-FL-NA»).

[00103] На Фигуре 18 изображена аминокислотная последовательность фактора VIII дикого типа человека (SEQ ID NO: 19) в соответствии с некоторыми вариантами реализации («FVIII-FL-AA»).

[00104] На Фигуре 19 изображена схема клонирования

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

[00105] На Фигуре 20 изображена целостность препаратов генома AAV-вектора, анализируемая с помощью электрофореза в агарозном геле. Дорожка 1, маркер ДНК; дорожка 2, vCS40; дорожка 3, vCS01; дорожка 4, vCS04. AAV-векторы все имеют одинаковые размеры генома, мигрирующие примерно на 5 кб (стрелка, правая сторона). Шкала с левой стороны указывает размер фрагментов ДНК в килобазах (кб).

[00106] На Фигуре 21 изображен белковый анализ векторных препаратов AAV с помощью PAGE и окрашивания серебром. Дорожка 1, маркер белка (M); дорожка 2, vCS40; дорожка 3, vCS01; и дорожка 4, vCS04. Все конструкции имеют одинаковые капсиды AAV8, состоящие из VP1, VP2 и VP3 (стрелки справа). Шкала на левой стороне указывает размер маркера белка в килодальтонах (кДа).

[00107] На Фигурах 22A и 22B изображена нуклеотидная последовательность CS23 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 20), кодирующая вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации («CS23-FL-NA»).

[00108] На Фигуре 23 изображена аминокислотная последовательность фактора VIII (SEQ ID NO: 21), кодируемая нуклеотидной последовательностью CS23 с измененными кодонами, в соответствии с некоторыми вариантами реализации («CS23-FL-AA»).

[00109] На Фигуре 24 изображена часть нуклеотидной последовательности CS23 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 22), кодирующая тяжелую цепь варианта фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации («CS23-HC-NA»).

[00110] На Фигуре 25 изображена часть нуклеотидной последовательности CS23 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 23), кодирующая легкую цепь варианта фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации («CS23-LC-NA»).

[00111] На Фигуре 26 изображена часть нуклеотидной последовательности CS01 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 24), кодирующая тяжелую цепь варианта фактора VIII в соответствии с

некоторыми вариантами реализации («CS01-HC-NA»).

[00112] На Фигуре 27 изображена часть нуклеотидной последовательности CS01 с измененными кодонами (SEQ ID NO: 25), кодирующая легкую цепь варианта фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации («CS01-LC-NA»).

[00113] На Фигурах 28A и 28B изображена нуклеотидная последовательность CS01Δ (760-1667) (SPI; CS01Δ (741-1648), SPE) с измененными кодонами (SEQ ID NO: 26), кодирующая одноцепочечный вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми варианты реализации («CS01-SC1-NA»).

[00114] На Фигурах 29A и 29B изображена нуклеотидная последовательность CS01Δ (772-1667) (SPI; CS01Δ (753-1648), SPE) с измененными кодонами (SEQ ID NO: 27), кодирующая одноцепочечный вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми варианты реализации («CS01-SC2-NA»).

[00115] На Фигурах 30A и 30B изображена нуклеотидная последовательность CS23Δ(760-1667) (SPI; CS23Δ(741-1648), SPE) с измененными кодонами (SEQ ID NO: 28), кодирующая одноцепочечный вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми варианты реализации («CS23-SC1-NA»).

[00116] На Фигурах 31A и 31B изображена нуклеотидная последовательность CS23Δ с измененными кодонами (772-1667) (SPI; CS23Δ (753-1648), SPE) (SEQ ID NO: 29), кодирующая одноцепочечный вариант фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации («CS23-SC2-NA»).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Введение

[00117] Генная терапия на основе AAV имеет большие перспективы для лечения гемофилий. Для гемофилии В первые клинические данные обнадеживают тем, что уровни FIX около 10% могут поддерживаться, по крайней мере, у некоторых пациентов более 1 года. Однако для гемофилии А достижение терапевтических уровней экспрессии 5-10% с помощью векторов AAV остается сложным по различным причинам. Во-первых, кодирующая последовательность фактора VIII слишком велика для обычных векторов на основе AAV.

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

[00118] Более того, эти проблемы не могут быть решены путем простого введения более высоких доз конструкции генной терапии. Согласно современным знаниям, доза вектора генной терапии на основе AAV должна быть увеличена выше 2×10^{12} vg/кг массы тела (векторных геномов/кг). Это связано с тем, что при таких высоких дозах активируется Т-клеточный иммунный ответ, который разрушает трансфектированные клетки и, как следствие, транскрипционная экспрессия уменьшается или даже пропадает. Поэтому необходимы стратегии улучшения экспрессии FVIII, чтобы сделать генную терапию FVIII жизнеспособным вариантом терапии для пациентов с гемофилией А.

[00119] Данное описание относится к обнаружению вариантов кодирующих последовательностей фактора VIII с измененными кодонами, которые решают эти и другие проблемы, связанные с генной терапией фактора VIII. Например, описанные в данном документе полинуклеотиды обеспечивают заметно улучшенную экспрессию в клетках млекопитающих и демонстрируют улучшенную упаковку вириона из-за стабилизированных взаимодействий упаковки. В некоторых вариантах реализации эти преимущества реализованы с использованием кодирующих последовательностей для тяжелых и легких цепей фактора VIII с высокой идентичностью последовательностей с конструкциями с измененными кодонами CS01, CS04 и CS23 (например, с высокой идентичностью последовательности в сравнении с одной из CS01-НС, CS04-НС и CS23-НС тяжелой цепи и высокой идентичностью последовательности в сравнении с одной из последовательностей CS01-LC, CS04-LC и CS23-LC, кодирующих легкую цепь).

[00120] В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы фактора VIII, кодируемые описанными в данном документе полинуклеотидами, были укорочены путем усечения, удаления или замены В-домена дикого типа. Как таковые, полинуклеотиды лучше подходят для экспрессии фактора VIII с помощью обычных векторов генной терапии, которые неэффективно экспрессируют более крупные полипептиды, такие как фактор VIII дикого типа.

[00121] Преимущественно в данном документе показано, что кодирующие последовательности CS01, CS04 и CS23 с измененными кодонами, кодирующие фактор VIII, обеспечивают превосходную экспрессию конструкции фактора VIII с удаленным В-доменом *in vivo*. Например, в Примере 2 и в Таблице 4 показано, что внутривенное введение векторов генной терапии на основе AAV, имеющих CS01 (SEQ ID NO: 13), CS04 (SEQ ID NO: 1) и CS23 (SEQ ID NO: 20) обеспечивают 18-кратное, 74-кратное и 30-кратное увеличение экспрессии фактора VIII по сравнению с соответствующей конструкцией CS40, закодированной полинуклеотидной последовательностью дикого типа (SEQ ID NO: 17), в нокаутных мышцах по фактору VIII (**Таблица 4**).

[00122] Кроме того, в данном документе также показано, что переменные кодирующие последовательности CS01 и CS04 фактора VIII с измененными кодонами, обеспечивают превосходную упаковку вирионов и производство вирусов. Например, в Примере 1 показано, что векторные конструкции AAV, содержащие конструкции CS01 и CS04, обеспечивают в 5-7 раз больший вирусный выход по сравнению с соответствующей конструкцией CS40, кодируемой полинуклеотидной последовательностью дикого типа, при выделении из того же количества клеточного осадка.

Определения

[00123] Как используется в данном документе, следующие термины имеют значения, приписываемые им, если не указано иное.

[00124] Используемые в данном документе термины «Фактор VIII» и «FVIII» используются взаимозаменяемо и относятся к любому белку с активностью фактора VIII (например, активному FVIII, часто называемому FVIIIa) или предшественнику (например, про-белку или пре-про-белку) белка с активностью Фактора VIII, в

частности кофакторной активностью Фактора IXa. В типовом варианте реализации полипептид фактора VIII относится к полипептиду, который имеет последовательности с высокой идентичностью последовательности (например, по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% и более) тяжелых и легких цепей полипептида фактора VIII дикого типа. В некоторых вариантах реализации В-домен полипептида фактора VIII удаляют, усекают или заменяют линкерным полипептидом, чтобы уменьшить размер полинуклеотида, кодирующего полипептид фактора VIII. В типовом варианте реализации изобретения аминокислоты 20-1457 CS04-FL-AA составляют полипептид фактора VIII.

[00125] Неограничивающие примеры полипептидов фактора VIII дикого типа включают в себя пре-про-Фактор VIII человека (например, согласно номерам доступа GenBank AAA52485, CAA25619, AAA58466, AAA52484, AAA52420, AAV85964, BAF82636, BAG36452, CAI41660, CAI41666, CAI41672, CAI43241, CAO03404, EAW72645, AAN22513, AAN64380, AAN98389, AAI11968, AAI11970 или AAB61261), соответствующий про-Фактор VIII и их природные варианты; свиной пре-про-Фактор VIII (например, согласно номерам доступа UniProt F1RZ36 или K7GSZ5), соответствующий про-Фактора VIII и их природные варианты; пре-про-Фактор VIII мыши (например, согласно номерам доступа GenBank AAA37385, CAM15581, CAM26492 или EDL29229), соответствующий про-Фактор VIII и их природные варианты; пре-про-Фактор VIII крысы (например, согласно номеру доступа GenBank AAQ21580), соответствующий про-Фактор VIII и их природные варианты; пре-про-Фактор VIII крысы; и другие гомологи Фактора VIII млекопитающих (например, обезьяны, примата, хомяка, морской свинки и т. д.).

[00126] Используемый в данном документе термин полипептид фактора VIII включает естественные варианты и искусственные конструкции с кофакторной активностью Фактора IX. Как используется в данном описании, термин фактор VIII охватывает любые природные варианты, альтернативные последовательности, изоформы или мутантные белки, которые сохраняют базальную кофакторную активность фактора IX (например, по меньшей мере 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, или более соответствующей активности дикого

типа). Примеры вариаций аминокислот фактора VIII (относительно FVIII-FL-AA (SEQ ID NO: 19)), обнаруженные в популяции человека, включают, но не ограничиваются ими, S19R, R22T, Y24C, Y25C, L26P/R, E30V, W33G, Y35C/H, G41C, R48C/K, K67E/N, L69P, E72K, D75E/V/Y, P83R, G89D/V, G92A/V, A97P, E98K, V99D, D101G/H/V, V104D, K108T, M110V, A111T/V, H113R/Y, L117F/R, G121S, E129V, G130R, E132D, Y133C, D135G/Y, T137A/I, S138R, E141K, D145H, V147D, Y155H, V159A, N163K, G164D/V, P165S, C172W, S176P, S179P, V181E/M, K185T, D186G/N/Y, S189L, L191F, G193R, L195P, C198G, S202N/R, F214V, L217H, A219D/T, V220G, D222V, E223K, G224W, T252I, V253F, N254I, G255V, L261P, P262L, G263S, G266F, C267Y, W274C, H275L, G278R, G280D, E284K, V285G, E291G/K, T294I, F295L, V297A, N299I, R301C/H/L, A303E/P, I307S, S308L, F312S, T314A/I, A315V, G323E, L326P, L327P/V, C329F, I331V, M339T, E340K, V345A/L, C348R/S/Y, Y365C, R391C/H/P, S392L/P, A394S, W401G, I405F/S, E409G, W412G/R, K427I, L431F/S, R437P/W, I438F, G439D/S/V, Y442C, K444R, Y450D/N, T454I, F455C, G466E, P470L/R/T, G474E/R/V, E475K, G477V, D478N, T479R, F484C, A488G, R490G, Y492C/H, Y492H, I494T, P496R, G498R, R503H, G513S/V, I522Y, K529E, W532G, P540T, T541S, D544N, R546W, R550C/G/H, S553P, S554C/G, V556D, R560T, D561G/H/Y, I567T, P569R, S577F, V578A, D579A/H, N583S, Q584H/K/R, I585R/T, M586V, D588G/Y, L594Q, S596P, N601D/K, R602G, S603I/R, W604C, Y605H/S, N609I, R612C, N631K/S, M633I, S635N, N637D/I/S, Y639C, L644V, L650F, V653A/M, L659P, A663V, Q664P, F677L, M681I, V682F, Y683C/N, T686R, F698L, M699T/V, M701I, G705V, G710W, N713I, R717L/W, G720D/S, M721I/L, A723T, L725Q, V727F, E739K, Y742C, R795G, P947R, V1012L, E1057K, H1066Y, D1260E, K1289Q, Q1336K, N1460K, L1481P, A1610S, I1698T, Y1699C/F, E1701K, Q1705H, R1708C/H, T1714S, R1715G, A1720V, E1723K, D1727V, Y1728C, R1740G, K1751Q, F1762L, R1768H, G1769R, L1771P, L1775F/V, L1777P, G1779E/R, P1780L, I1782R, D1788H, M1791T, A1798P, S1799H, R1800C/G/H, P1801A, Y1802C, S1803Y, F1804S, L1808F, M1842I, P1844S, T1845P, E1848G, A1853T/V, S1858C, K1864E, D1865N/Y, H1867P/R, G1869D/V, G1872E, P1873R, L1875P, V1876L, C1877R/Y, L1882P, R1888I, E1894G, I1901F, E1904D/K, S1907C/R, W1908L, Y1909C, A1939T/V,

N1941D/S, G1942A, M1945V, L1951F, R1960L/Q, L1963P, S1965I, M1966I/V, G1967D, S1968R, N1971T, H1973L, G1979V, H1980P/Y, F1982I, R1985Q, L1994P, Y1998C, G2000A, T2004R, M2007I, G2013R, W2015C, R2016P/W, E2018G, G2022D, G2028R, S2030N, V2035A, Y2036C, N2038S, 2040Y, G2045E/V, I2051S, I2056N, A2058P, W2065R, P2067L, A2070V, S2082N, S2088F, D2093G/Y, H2101D, T2105N, Q2106E/P/R, G2107S, R2109C, I2117F/S, Q2119R, F2120C/L, Y2124C, R2135P, S2138Y, T2141N, M2143V, F2145C, N2148S, N2157D, P2162L, R2169C/H, P2172L/Q/R, T2173A/I, H2174D, R2178C/H/L, R2182C/H/P, M2183R/V, L2185S/W, S2192I, C2193G, P2196R, G2198V, E2200D, I2204T, I2209N, A2211P, A2220P, P2224L, R2228G/L/P/Q, L2229F, V2242M, W2248C/S, V2251A/E, M2257V, T2264A, Q2265R, F2279C/I, I2281T, D2286G, W2290L, G2304V, D2307A, P2319L/S, R2323C/G/H/L, R2326G/L/P/Q, Q2330P, W2332R, I2336F, R2339T, G2344C/D/S и C2345S/Y. Белки фактора VIII также содержат полипептиды, содержащие посттрансляционные модификации.

[00127] Как правило, полинуклеотиды, кодирующие фактор VIII, кодируют неактивный одноцепочечный полипептид (например, пре-про-белок), который подвергается посттрансляционной обработке с образованием активного белка фактора VIII (например, FVIIIa). Например, в соответствии с Фигурой 1, предварительно пре-про-белок фактора VIII человека сначала расщепляется для высвобождения кодируемого сигнального пептида (не показан), образуя первый одноцепочечный про-белок (показанный как «FVIII дикого типа человека»). Про-белок затем расщепляется между доменами В и А3 с образованием первого полипептида, который содержит тяжелую цепь фактора VIII (например, домены А1 и А2) и В-домен, и второй полипептид, который содержит легкую цепь фактора VIII (например, содержит домены А3, С1 и С3). Первый полипептид далее расщепляется для удаления В-домена, а также для отделения доменов А1 и А2, которые остаются связанными с легкой цепью фактора VIII в зрелом протеине фактора VIIIa. Для обзора процесса созревания фактора VIII см. Graw et al., Nat Rev Genet., 6 (6): 488-501 (2005), содержание которого включено в данное описание посредством ссылки во всей его полноте для всех целей.

[00128] Однако в некоторых вариантах реализации изобретения полипептид фактора VIII представляет собой одноцепочечный полипептид фактора VIII. Одноцепочечные полипептиды фактора VIII сконструированы с удалением природных сайтов расщепления и, необязательно, удалением, укорочением или заменой В-домена фактора VIII. Как таковые, они не созревают при расщеплении (кроме отщепления необязательного сигнального и/или лидерного пептида) и активны как одна цепь. Неограничивающие примеры одноцепочечных полипептидов фактора VIII описаны в Zollner et al. (Thromb Res, 134(1):125-31 (2014)) и Donath et al. (Biochem J., 312 (1): 49-55 (1995)), описание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте для всех целей.

[00129] Используемый в данном документе термин «тяжелая цепь фактора VIII» или просто «тяжелая цепь» относится к объединению доменов A1 и A2 полипептида фактора VIII. В примерном варианте реализации изобретения аминокислоты 20-759 CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2) составляют тяжелую цепь фактора VIII.

[00130] Используемый в данном документе термин «легкая цепь фактора VIII» или просто «легкая цепь» относится к объединению доменов A3, C1 и C2 полипептида фактора VIII. В примерном варианте реализации изобретения аминокислоты 774-1457 CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2) составляют легкую цепь фактора VIII. В некоторых вариантах реализации изобретения легкая цепь фактора VIII не содержит кислый пептид a3, который высвобождается во время созревания *in vivo*.

[00131] Как правило, тяжелые и легкие цепи фактора VIII экспрессируются в виде одной полипептидной цепи, например, вместе с необязательным В-доменом или замещающим В-домен линкером. Однако в некоторых вариантах реализации изобретения тяжелая цепь фактора VIII и легкая цепь фактора VIII экспрессируются как отдельные полипептидные цепи (например, ко-экспрессированные) и восстанавливаются с образованием белка фактора VIII (например, *in vivo* или *in vitro*).

[00132] Используемые в данном документе термины «В-домен замещающий линкер» и «линкер фактора VIII» используются взаимозаменяемо и относятся к укороченным версиям В-домена

фактора VIII дикого типа (например, аминокислоты 760-1667 FVIII-FL-AA (SEQ ID NO: 19)) или пептиды, сконструированные для замены В-домена полипептида фактора VIII. Как используется в данном документе, линкер фактора VIII расположен между С-концом тяжелой цепи фактора VIII и N-концом легкой цепи фактора VIII в варианте полипептида фактора VIII в соответствии с некоторыми вариантами реализации. Неограничивающие примеры В-доменов замещающих линкеров описаны в патентах США № 4,868,112, 5,112,950, 5,171,844, 5,543,502, 5,595,886, 5,610,278, 5,789,203, 5,972,885, 6,048,720, 6,060,447, 6,114,148, 6,228,620, 6,316,226, 6,346,513, 6,458,563, 6,924,365, 7,041,635 и 7,943,374; Публикациях патентных заявок США № 2013/024960, 2015/0071883 и 2015/0158930; и в публикациях РСТ WO 2014/064277 и WO 2014/127215, описание которых включено в данное описание посредством ссылки во всей их полноте для всех целей.

[00133] Если не указано иное, нумерация аминокислот фактора VIII относится к соответствующей аминокислоте в полноразмерной последовательности человеческого фактора VIII дикого типа (FVIII-FL-AA), представленной в виде SEQ ID NO: 19 на Фигуре 18. Таким образом, когда речь идет о замещении аминокислоты в варианте белка VIII фактора, описанном в данном документе, указанное количество аминокислот относится к аналогичной (например, структурно или функционально эквивалентной) и/или гомологичной (например, эволюционно консервативной в первичной аминокислотной последовательности) полноразмерной аминокислотной последовательности фактора VIII дикого типа. Например, аминокислотная замена T2105N относится к замещению Т-N в положении 2105 полноразмерной последовательности фактора VIII дикого типа человека (FVIII-FL-AA, SEQ ID NO: 19) и замещению Т на N в положении 1211 варианта белка фактора VIII, кодируемого CS04 (CS04-FL-AA, SEQ ID NO: 2).

[00134] Как описано в данном документе, система нумерации аминокислот фактора VIII зависит от того, входит ли в состав сигнальный пептид фактора VIII (например, аминокислоты 1-19 полноразмерной последовательности фактора VIII дикого типа человека). Когда сигнальный пептид входит в состав, нумерация

обозначается как «включительно с сигнальным пептидом» или «SPI». Когда сигнальный пептид не входит в состав, нумерация обозначается как «без сигнального пептида» или «SPE». Например, F328S в SPI нумерации обозначает ту же аминокислоту, что и F309S в нумерации SPE. Если не указано иное, вся нумерация аминокислот относится к соответствующей аминокислоте в полноразмерной последовательности фактора VIII дикого типа человека (FVIII-FL-AA), представленной в виде SEQ ID NO: 19 на Фигуре 18.

[00135] Как описано в данном документе, полинуклеотиды с измененными кодонами обеспечивают повышенную экспрессию трансгенного фактора VIII *in vivo* (например, при введении в качестве части вектора генной терапии) по сравнению с уровнем экспрессии фактора VIII, обеспечиваемым природной кодируемой конструкцией фактора VIII (например, полинуклеотид, кодирующий ту же самую конструкцию фактора VIII человека с использованием кодонов дикого типа). Используемый в данном документе термин «повышенная экспрессия» относится к повышенному уровню активности трансгенного фактора VIII в крови животного, которому вводили полинуклеотид с измененными кодонами, кодирующий фактор VIII, по сравнению с уровнем активности в крови животного трансгенного фактора VIII вводимого в виде природно закодированной конструкции фактора VIII. Уровни активности можно измерять с использованием любой активности фактора VIII, известной в данной области. Типовой анализ для определения активности фактора VIII представляет собой анализ Technochrome FVIII (Technoclone, Вена, Австрия).

[00136] В некоторых вариантах реализации изобретения повышенная экспрессия относится к по меньшей мере на 25% большей трансгенной активности фактора VIII в крови животного, которому вводили полинуклеотид фактора VIII с измененными кодонами, по сравнению с уровнем трансгенной активности фактора VIII в крови животного, которому вводили природно кодируемый полинуклеотид фактора VIII. В некоторых вариантах реализации изобретения увеличенная экспрессия относится к по меньшей мере, на 50% большей, по меньшей мере на 75% большей, по меньшей мере на 100% большей, по меньшей мере в 3 раза большей, по меньшей мере в 4

раза большей, по меньшей мере в 5 раз большей, по меньшей мере в 6 раз большей, по меньшей мере в 7 раз большей, по меньшей мере в 8 раз большей, по меньшей мере в 9 раз большей, по меньшей мере в 10 раз большей, по меньшей мере в 15 раз большей, по меньшей мере в 20 раз большей, по меньшей мере в 25 раз большей, по меньшей мере в 30 раз большей, по меньшей мере в 40 раз большей, по меньшей мере в 50 раз большей, по меньшей мере в 60 раз большей, по меньшей мере в 70 раз большей, по меньшей мере в 80 раз большей, по меньшей мере в 90 раз большей, по меньшей мере в 100 раз большей, по меньшей мере в 125 раз большей, по меньшей мере в 150 раз большей, по меньшей мере в 175 раз большей, по меньшей мере в 200 раз большей, по меньшей мере в 225 раз большей или, по меньшей мере, в 250 раз более высокой активности трансгенного фактора VIII в крови животного, которым вводили полинуклеотид фактора VIII с измененными кодонами, по сравнению с уровнем активности трансгенного фактора VIII в крови животного, которым вводили природно кодируемый полинуклеотид фактора VIII.

[00137] Как описано в данном документе, полинуклеотиды с измененными кодонами обеспечивают увеличенное векторное продуцирование по сравнению с уровнем векторного продуцирования, обеспечиваемым природно кодируемой конструкцией фактора VIII (например, полинуклеотидом, кодирующим ту же самую конструкцию фактора VIII человека с использованием кодонов дикого типа). Используемый в данном документе термин «повышенное продуцирование вируса» относится к увеличению выхода вектора в культуре клеток (например, титр на литр культуры), инокулированном полинуклеотидом с измененными кодонами, кодирующим фактор VIII, по сравнению с выходом вектора в культуре клеток, инокулированным природно кодируемой конструкцией фактора VIII. Данные о выходе вектора могут быть получены с использованием любого анализа титра вектора, известного в данной области. Типовой анализ для определения выхода вектора (например, вектора AAV) представляет собой qPCR с использованием инвертированных терминальных повторов AAV2 (Aurnhammer, Human Gene Therapy Methods: Part B 23:18-28

(2012)).

[00138] В некоторых вариантах реализации изобретения увеличение производства вируса относится к по меньшей мере на 25% большему выходу вектора с измененными кодонами, по сравнению с выходом природно кодируемой конструкции фактора VIII в культуре того же типа. В некоторых вариантах реализации изобретения увеличенное векторное производство относится к по меньшей мере, на 50% большему, по меньшей мере на 75% большему, по меньшей мере на 100% большему, по меньшей мере в 3 раза большему, по меньшей мере в 4 раза большему, по меньшей мере в 5 раз большему, по меньшей мере в 6 раз большему, по меньшей мере в 7 раз большему, по меньшей мере в 8 раз большему, по меньшей мере в 9 раз большему, по меньшей мере в 10 раз большему, по меньшей мере в 15 раз большему или, по меньшей мере, в 20 раз большему выходу вектора по сравнению с выходом природно кодируемой конструкции фактора VIII в культуре одного и того же типа.

[00139] Используемый в данном документе термин «гемофилия» относится к группе болезненных состояний, широко характеризующихся сниженной свертываемостью крови или коагуляции. Гемофилия может относиться к гемофилии типа А, типа В или типа С или к совокупности всех трех типов заболеваний. Гемофилия типа А (гемофилия А) вызвана снижением или потерей активности фактора VIII (FVIII) и является наиболее известным из подтипов гемофилии. Гемофилия типа В (гемофилия В) является результатом потери или уменьшения функции фактора свертывания IX (FIX). Гемофилия типа С (гемофилия С) является следствием потери или снижения активности фактора свертывания XI (FXI). Гемофилия А и В являются X-связанными заболеваниями, тогда как гемофилия С является аутосомной. Обычные способы лечения гемофилии включают как профилактическое введение, так и введение по необходимости факторов свертывания крови, таких как FVIII, FIX, включая Bebulin®-VN и FXI, а также инфузии FEIBA-VN, десмопрессина и плазмы.

[00140] Используемый в данном документе термин «генная

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

[00141] Используемый в данном документе термин «обходная терапия» включает в себя любой терапевтический подход, предусматривающий предоставление гемостатических агентов, не относящихся к фактору VIII, соединений или факторов коагуляции пациенту для облегчения, уменьшения или предотвращения повторения одного или нескольких симптомов (например, клинических факторов) связанных с гемофилией. Соединения, не относящиеся к фактору VIII и факторы коагуляции включают, но не ограничиваются ими, обходную активность фактора VIII (FEIBA), рекомбинантный активированный фактор VII (FVIIa), протромбиновые комплексные концентраты и активированные комплексные концентраты протромбина. Эти соединения, не относящиеся к фактору VIII и факторы коагуляции могут быть получены рекомбинантно или из плазмы. Специалист в данной области поймет, что либо курс обходной терапии, либо доза обходной терапии могут быть изменены, например, на основании результатов, полученных в соответствии с данным изобретением.

[00142] Используемый в данном документе термин «комбинированная терапия», включает введение нуклеиновой кислоты, кодирующей молекулу фактора VIII и традиционных терапевтических агентов для лечения гемофилии А, включает любой терапевтический подход, обеспечивающий как нуклеиновую кислоту,

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

[00143] Термины «терапевтически эффективное количество или доза» или «терапевтически достаточное количество или доза» или «эффективное или достаточное количество, или доза» относятся к дозе, которая дает терапевтические эффекты, для достижения которых она вводится. Например, терапевтически эффективное количество лекарственного средства, полезного для лечения гемофилии, может быть количеством, которое способно предотвращать или облегчать один или несколько симптомов, связанных с гемофилией. Точная доза будет зависеть от цели лечения и будет определена специалистом в данной области с использованием известных методов (см., например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); и Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

[00144] Используемый в данном документе термин «ген» относится к сегменту молекулы ДНК, которая кодирует полипептидную цепь (например, кодирующая область). В некоторых вариантах реализации изобретения ген расположен в областях, непосредственно предшествующих, следующих за и/или перекрывающихся с кодирующей областью, которая участвует в получении полипептидной цепи (например, регуляторные элементы, такие как промотор, энхансер, последовательность

полиаденилирования, 5'-нетранслируемая область, 3'-нетранслируемая область или интрон).

[00145] Используемый в данном документе термин «регуляторные элементы» относится к нуклеотидным последовательностям, таким как промоторы, энхансеры, терминаторы, последовательности полиаденилирования, интроны и т. д., которые обеспечивают экспрессию кодирующей последовательности в клетке.

[00146] Используемый в данном документе термин «промоторный элемент» относится к нуклеотидной последовательности, которая помогает контролировать экспрессию кодирующей последовательности. Как правило, промоторные элементы расположены на 5'-конце начального сайта трансляции гена. Однако в некоторых вариантах реализации изобретения промоторный элемент может быть расположен внутри последовательности интрона или 3'-конца кодирующей последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения промотор, полезный для вектора генной терапии, получен из гена нативного белка-мишени (например, промотор фактора VIII). В некоторых вариантах реализации изобретения промотор, полезный для вектора генной терапии, специфичен для экспрессии в конкретной клетке или ткани целевого организма (например, промотор, специфичный для печени). В других вариантах реализации изобретения один из множества хорошо охарактеризованных промоторных элементов используется в векторе генной терапии, описанном в данном документе. Неограничивающие примеры хорошо охарактеризованных промоторных элементов включают ранний промотор CMV, промотор β -актина и промотор метил-CpG-связывающего белка 2 (MeCP2). В некоторых вариантах реализации изобретения промотор представляет собой конститутивный промотор, который обеспечивает по существу постоянную экспрессию белка-мишени. В других вариантах реализации изобретения промотор представляет собой индуцибельный промотор, который стимулирует экспрессию белка-мишени в ответ на конкретный стимул (например, воздействие конкретного лечения или агента). Для обзора получения промоторов для AAV-опосредованной генной терапии см.

Gray et al. (Human Gene Therapy 22: 1143-53 (2011)), чье содержание явно включено в качестве ссылки во всей своей полноте для всех целей.

[00147] Используемый в данном документе термин «вектор» относится к любому носителю, используемому для переноса нуклеиновой кислоты (например, кодирующей конструкцию генной терапии фактора VIII) в клетку-хозяина. В некоторых вариантах реализации изобретения вектор содержит репликон, который функционирует для репликации носителя вместе с нуклеиновой кислотой-мишенью. Неограничивающие примеры векторов, полезных для генной терапии включают плазмиды, фаги, космиды, искусственные хромосомы и вирусы, которые функционируют как автономные единицы репликации *in vivo*. В некоторых вариантах реализации изобретения вектор представляет собой вирусный носитель для введения нуклеиновой кислоты-мишени (например, полинуклеотид с измененными кодонами, кодирующий вариант фактора VIII). Многие модифицированные эукариотические вирусы, полезные для генной терапии, известны в данной области. Например, аденоассоциированные вирусы (AAV) особенно хорошо подходят для использования в генной терапии человека, потому что люди являются естественным хозяином этого вируса, природные вирусы, как известно, не способствуют каким-либо заболеваниям и эти вирусы вызывают незначительный иммунный ответ.

[00148] Используемый в данном документе термин «островок CpG» относится к области внутри полинуклеотида, имеющей статистически повышенную плотность CpG-динуклеотидов. Как используется в данном документе, область полинуклеотида (например, полинуклеотида с измененными кодонами, кодирующего белок фактора VIII) представляет собой остров CpG, если среди 200 оснований: (i) область имеет содержание GC более 50%, и (ii) отношение наблюдаемых CpG-динуклеотидов к ожидаемым CpG-динуклеотидам составляет по меньшей мере 0.6, как определено соотношением:

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

Дополнительную информацию о методах идентификации островков

CrG см. в Gardiner-Garden M. et al., J Mol Biol., 196(2):261-82 (1987), чье содержание прямо включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме, для всех целей.

[00149] Используемый в данном документе термин «нуклеиновая кислота» относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме и их комплементарным молекулам. Этот термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов или модифицированные остатки или связи, которые являются синтетическими, встречающимися в природе и не встречающимися в природе, которые имеют сходные связывающие свойства, как референтная нуклеиновая кислота, и которые метаболизируются способом, подобным референтным нуклеотидам. Примеры таких аналогов включают, но не ограничиваются ими, фосфотриоаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хираль-метилфосфонаты, 2-О-метил-рибонуклеотиды и пептид-нуклеиновые кислоты (ПНК).

[00150] Термин «аминокислота» относится к природным и неприродным аминокислотам, включая аминокислотные аналоги и аминокислотные миметики, которые функционируют аналогично природным аминокислотам. Естественно встречающиеся аминокислоты включают те, которые кодируются генетическим кодом, а также те аминокислоты, которые позднее модифицированы, например, гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат и О-фосфосерин. Естественно встречающиеся аминокислоты могут включать, например, D- и L-аминокислоты. Используемые в данном документе аминокислоты могут также включать неприродные аминокислоты. Аминокислотные аналоги относятся к соединениям, которые имеют ту же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота, то есть любой углерод, связанный с водородом, карбоксильная группа, аминогруппа и группа R, например, гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид или метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (например, норлейцин) или модифицированные пептидные скелеты, но сохраняют ту же основную химическую структуру, что и встречающаяся в природе аминокислота. Аминокислотные миметики относятся к химическим соединениям, которые имеют структуру, которая отличается от

общей химической структуры аминокислоты, но их функция аналогична природной аминокислоте. Аминокислоты могут быть обозначены их общеизвестными трехбуквенными обозначениями, либо однобуквенными символами, рекомендованными Комиссией по биохимической номенклатуре IUPAC-IUB. Нуклеотиды также могут упоминаться их общепринятыми однобуквенными обозначениями.

[00151] Что касается аминокислотных последовательностей, специалисту в данной области техники будет понятно, что индивидуальные замены, делеции или вставки в нуклеиновой кислоте или пептидной последовательности, которые изменяют, добавляют или удаляют одну аминокислоту или небольшой процент аминокислот в кодируемой последовательности является «консервативно модифицированным вариантом», где изменение приводит к замещению аминокислоты химически подобной аминокислотой. Таблицы консервативных замещений, представляющие функционально сходные аминокислоты, хорошо известны в данной области. Такие консервативно модифицированные варианты являются дополнением и не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели в данном описании.

[00152] Консервативные аминокислотные замещения, обеспечивающие функционально сходные аминокислоты, хорошо известны в данной области. В зависимости от функциональности конкретной аминокислоты, например, для каталитических, структурных или стерически важных аминокислот, различные группы аминокислот могут рассматриваться как консервативные замены друг для друга. В **Таблице 1** представлены группы аминокислот, которые считаются консервативными заменами на основе заряда и полярности аминокислоты, гидрофобности аминокислоты, поверхностным воздействиям/структурным характеристикам аминокислоты и влиянию аминокислоты на вторичную структуру.

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

Важная Особенность	Консервативные Группы
Заряд/Полярность	1. Н, R и K
	2. D и E

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

[00153] Термины «идентичная» или процентная «идентичность» в контексте двух или более нуклеиновых кислот или пептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (например, около 60% идентичности, предпочтительно 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больше идентичности в определенной области при сравнении и выравнивании для максимального соответствия участка сравнения или выделенной области) при измерении, например, с использованием алгоритмов сравнения последовательностей BLAST или BLAST 2.0 с параметрами по умолчанию, описанными ниже, или путем ручного выравнивания и визуального осмотра.

[00154] Как известно в данной области, множество различных программ могут быть использованы для определения идентичности

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

[00155] Примером полезного алгоритма является PILEUP. PILEUP создает множественное выравнивание последовательностей из группы связанных последовательностей с использованием прогрессивных парных выравниваний. Он также может отображать дерево, показывающее отношения кластеризации, используемые для создания выравнивания. PILEUP использует упрощение прогрессивного метода выравнивания Feng & Doolittle, *J. Mol. Evol.* 35: 351-360 (1987); метод аналогичен методу, описанному Higgins & Sharp CABIOS 5: 151-153 (1989), оба включены посредством ссылки. Полезные параметры PILEUP включают значение пропуска по умолчанию 3.00, значение длины пропуска по умолчанию 0.10, и взвешенные конечные пропуски.

[00156] Другим примером полезного алгоритма является

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

[00157] Дополнительным полезным алгоритмом является gapped BLAST, как сообщается в Altschul et al., Nucl. Acids Res., 25: 3389-3402, включена посредством ссылки. Gapped BLAST использует баллы замещения BLOSUM-62; пороговый параметр T установлен в 9; two-hit метод для запуска расширений без пропусков; оценка длины k пропусков равна $10+k$; X_u установлен на 16, а X_g установлен на 40 для этапа поиска базы данных и на 67 для выходного этапа алгоритмов. Выравнивания с разрывами запускаются с помощью оценки, соответствующей ~ 22 бит.

[00158] Значения процентной идентичности аминокислотной последовательности определяются количеством совпадающих идентичных остатков, деленными на общее количество остатков «более длинной» последовательности в выровненной области. «Более длинная» последовательность - та, которая имеет больше значимых остатков в выровненной области (пробелы, введенные WU-Blast-2, чтобы максимизировать оценку выравнивания, игнорируются). Аналогичным образом, «процентная идентичность последовательности нуклеиновой кислоты» (%) по отношению к кодирующей последовательности идентифицированных полипептидов определяется

как процентное содержание нуклеотидных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны остаткам нуклеотидов в кодирующей последовательности белка клеточного цикла. Предпочтительный метод использует модуль BLASTN для WU-BLAST-2, заданный по умолчанию, с интервалом перекрытия и долей перекрытия, установленным в 1 и 0,125 соответственно.

[00159] Выравнивание может включать введение пробелов в последовательностях, которые должны быть выровнены. Кроме того, для последовательностей, которые содержат либо больше или меньше аминокислот, чем белок, кодируемый последовательностью, изображенной на Фигуре 2 (SEQ ID NO: 1), понятно, что в одном варианте реализации изобретения процент идентичности последовательности будет определяться на основе количества идентичных аминокислот или нуклеотидов по отношению к общему количеству аминокислот или нуклеотидов. Таким образом, например, идентичность последовательностей, которые короче, чем изображенная на Фигуре. 2 (SEQ ID NO: 1), как обсуждается ниже, будет определяться с использованием количества нуклеотидов в более короткой последовательности в одном варианте реализации изобретения. В подсчетах процентной идентичности относительный вес не присваивается различным проявлениям вариации последовательности, таким как вставки, удаления, замены и т. д.

[00160] В одном варианте реализации изобретения только тождества оцениваются положительно (+1), и всем формам изменения последовательности, включая промежутки, присваивается значение «0», что устраняет необходимость в взвешенной шкале или параметрах, как описано ниже для расчетов подобия последовательности. Идентичность последовательности может быть рассчитана, например, путем деления количества совпадающих идентичных остатков на общее количество остатков «более короткой» последовательности в выровненной области и умножения на 100. «Более длинная» последовательность – это та, которая имеет больше остатков в выровненной области.

[00161] Термин «аллельные варианты» относится к полиморфным формам гена в определенном генетическом локусе, а также кДНК, полученным из мРНК транскриптов генов, и полипептидов,

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

[00162] Используемый в данном документе термин «измененный кодон» относится к полинуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид (например, вариант белка варианта VIII), где по меньшей мере один кодон природного полинуклеотида, кодирующего полипептид, был изменен для улучшения свойства полинуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения улучшенное свойство способствует увеличению транскрипции мРНК, кодирующей полипептид, повышенной стабильности мРНК (например, увеличению периода полувыведения мРНК), увеличению трансляции полипептида и/или улучшению упаковки полинуклеотида внутри вектора. Неограничивающие примеры изменений, которые могут быть использованы для получения улучшенных свойств, включают в себя изменение использования и/или распределения кодонов для определенных аминокислот, регулирование глобального и/или локального содержания GC, удаление последовательностей, с высоким содержанием AT, удаление повторяющихся элементов последовательности, корректировку глобального и/или локального содержания динуклеотида CpG, удаление критических регулирующих элементов (например, ТАТА-бокс и ССААТ-бокс), удаление сайтов сплайсинга интрон/экзон, улучшение регуляторных последовательностей (например, введение консенсусной последовательности Козака) и удаление элементов последовательности, способных образовывать вторичную структуру (например, шпильки) в транскрибируемой мРНК.

[00163] Как обсуждалось в данном документе, существуют различные номенклатуры для обозначения компонентов, описанных в данном документе. «CS-номер» (например, «CS04», «CS01», «CS23» и

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

Варианты фактора VIII с Измененными Кодонами

[00164] В некоторых вариантах реализации изобретения данное описание предлагает полинуклеотиды с измененными кодонами, кодирующие варианты фактора VIII. Эти полинуклеотиды с измененными кодонами обеспечивают значительно улучшенную экспрессию фактора VIII при введении в конструкции генной терапии на основе AAV. Полинуклеотиды с измененными кодонами также демонстрируют улучшенную упаковку AAV-вирионов по

сравнению с конструкциями с традиционной оптимизацией кодонов. Как показано в Примере 2 и Таблице 4, заявители достигают этих преимуществ благодаря открытию трех полинуклеотидов с измененными кодонами (CS01-FL-NA, CS04-FL-NA и CS23-FL-NA), кодирующих полипептид фактора VIII с тяжелой и легкой цепями фактора VIII человека и коротким 14-аминокислотным замещающий В-домен линкером (линкер SQ), содержащий фуриновый сайт расщепления для облегчения созревания активного белка FVIIIa *in vivo*.

[00165] В одном варианте реализации изобретения полинуклеотид с измененными кодонами, представленный в данном документе, имеет нуклеотидные последовательности с высокой идентичностью, по меньшей мере, с последовательностями CS01, CS04 или CS23 (SEQ ID NO 13, 1 и 20 соответственно), кодирующими тяжелую цепь фактора VIII и легкую цепь фактора VIII. Как известно в данной области, В-домен фактора VIII является непригодным для активности *in vivo*. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотиды с измененными кодонами, представленные в данном документе, полностью не содержат В-домен фактора VIII. В некоторых вариантах реализации изобретения нативный В-домен фактора VIII заменен на короткий аминокислотный линкер, содержащий фуриновый сайт расщепления, например, линкер SQ, состоящий из аминокислот 760-773 CS01, CS04 или CS23 (SEQ ID NO 2, 2 и 21 соответственно). Линкер «SQ» также относится к последовательности BDLO04 (-AA для аминокислотной последовательности и -NA для нуклеотидной последовательности).

[00166] В одном варианте реализации изобретения тяжелая и легкая цепи фактора VIII, кодируемые полинуклеотидом с измененными кодонами, представляют собой тяжелую и легкую цепи фактора VIII человека, соответственно. В других вариантах реализации изобретения тяжелая и легкая цепи фактора VIII, кодируемые полинуклеотидом с измененными кодонами представляют собой последовательности тяжелой и легкой цепей другого млекопитающего (например, фактора VIII свиньи). В других вариантах реализации изобретения тяжелая и легкая цепи фактора VIII представляют собой химерные тяжелую и легкую цепи

(например, комбинацию первой человеческой последовательности и второй последовательности млекопитающего). В других вариантах реализации изобретения тяжелая и легкая цепи фактора VIII представляют собой гуманизированную версию тяжелой и легкой цепей другого млекопитающего, например, последовательности тяжелой и легкой цепей другого млекопитающего, в котором остатки последовательности человека замещены в выбранных положениях, чтобы уменьшить иммуногенность получаемого пептида при введении человеку.

[00167] Содержание GC в генах человека варьирует в широких пределах: от менее 25% до более 90%. Однако, как правило, человеческие гены с более высоким содержанием GC экспрессируются на более высоких уровнях. Например, в Kudla et al. (PLoS Biol., 4 (6): 80 (2006)) показано, что увеличение содержания GC гена увеличивает экспрессию кодируемого полипептида, в первую очередь за счет усиления транскрипции и достижения более высокого уровня устойчивости транскрипта мРНК. Как правило, желаемое содержание GC в конструкции гена с оптимизацией кодонов равно или превышает 60%. Однако, родные геномы AAV имеют содержание GC около 56%.

[00168] Соответственно, в некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотиды с измененными кодонами, представленные в данном документе, имеют содержание CG, которое более соответствует содержанию GC в нативных AAV-вирионах (например, около 56% GC), которое ниже, чем предпочтительное содержание CG полинуклеотидов, которые обычно проходят оптимизацию кодонов для экспрессии в клетках млекопитающих (например, 60% GC или выше). Как указано в Примере 1, CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1), которая имеет содержание GC около 56%, имеет улучшенную упаковку вирионов по сравнению с аналогичными последовательностями с измененными кодонами с более высоким содержанием GC.

[00169] Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет менее 60%. В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами,

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

[00171] В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет $56 \pm 0.5\%$. В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет $56 \pm 0.4\%$. В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет $56 \pm 0.3\%$. В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет $56 \pm 0.2\%$. В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет $56 \pm 0.1\%$. В некоторых вариантах реализации изобретения общее содержание GC в полинуклеотиде с измененными кодонами, кодирующем полипептид фактора VIII, составляет 56%.

Линкер, Замещающий В-домен Фактора VIII

[00172] В некоторых вариантах реализации изобретения связь между тяжелой цепью FVIII и легкой цепью (например, В-доменом в Факторе VIII дикого типа) дополнительно изменяется. Из-за ограничений по размеру упаковочной емкости AAV, варианты с удаленным, усеченным и/или замещенным на линкер В-доменом должны улучшить эффективность конструкции генной терапии FVIII. Наиболее традиционно используемый замещающий В-домен линкер относится к SQ FVIII, который сохраняет только 14 аминокислот домена В в качестве линкерной последовательности. Другой вариант VIII свиньи («ОВI-1», описанный в патенте США № 6,458,563) хорошо экспрессируется в клетках CHO и имеет более длинный линкер из 24 аминокислот. В некоторых вариантах реализации

изобретения конструкции фактора VIII, кодируемые полинуклеотидами с измененными кодонами, описанные в данном документе, содержат в себе линкерную последовательность типа SQ В-домена. В других вариантах реализации изобретения конструкции фактора VIII, кодируемые полинуклеотидами с измененными кодонами, описанные в данном документе, содержат в себе линкерную последовательность типа OBI-1 В-домена.

[00173] В некоторых вариантах реализации изобретения кодируемые полипептиды фактора VIII, описанные в данном документе, содержат В-доменный линкер типа SQ (SFSQNPPVLKRHQ; BDL-SQ-AA; SEQ ID NO: 30), включая аминокислоты 760-762/1657-1667 В-домена фактора VIII дикого типа человека (FVIII-FL-AA, SEQ ID NO: 19) (Sandberg et al., *Thromb. Haemost.* 85:93 (2001)). В некоторых вариантах реализации изобретения В-доменный линкер SQ-типа имеет одну аминокислотную замену относительно соответствующей последовательности дикого типа. В некоторых вариантах реализации изобретения В-доменный линкер SQ-типа имеет две аминокислотные замены относительно соответствующей последовательности дикого типа.

[00174] В некоторых вариантах реализации изобретения кодируемые полипептиды фактора VIII, описанные в данном документе, содержат в себе линкер В-домена типа Greengene, включая аминокислоты 760/1582-1667 В-домена фактора VIII дикого типа человека (FVIII-FL-AA, SEQ ID NO: 19) (Oh et al., *Biotechnol. Prog.*, 17:1999 (2001)). В некоторых вариантах реализации изобретения В-доменный линкер Greengene-типа имеет одну аминокислотную замену относительно соответствующей последовательности дикого типа. В некоторых вариантах реализации изобретения В-доменный линкер Greengene-типа имеет две аминокислотные замены относительно соответствующей последовательности дикого типа.

[00175] В некоторых вариантах реализации изобретения кодируемые полипептиды фактора VIII, описанные в данном документе, содержат расширенный линкер В-домена SQ-типа, включая аминокислоты 760-769/1657-1667 Фактора VIII дикого типа человека (FVIII-FL-AA, SEQ ID NO: 19) (Thim et al., *Haemophilia*, 16: 349

(2010)). В некоторых вариантах реализации изобретения удлиненный В-доменный линкер SQ-типа имеет одну аминокислотную замену относительно соответствующей последовательности дикого типа. В некоторых вариантах реализации изобретения удлиненный В-доменный линкер SQ-типа имеет две аминокислотные замены относительно соответствующей последовательности дикого типа.

[00176] В некоторых вариантах реализации изобретения кодируемые полипептиды фактора VIII, описанные в данном документе, содержат В-доменный линкер типа OBI-1 свиньи, включая аминокислоты SFAQNSRPPSASAPKPPVLRRHQ (SEQ ID NO: 31) из В-домена свиного фактора VIII дикого типа (Toschi et al., Curr. Opin. Mol. Ther. 12:517 (2010)). В некоторых вариантах реализации изобретения В-доменный линкер типа OBI-1 свиньи имеет одну аминокислотную замену относительно соответствующей последовательности дикого типа. В некоторых вариантах реализации изобретения В-доменный линкер типа OBI-1 свиньи имеет две аминокислотные замены относительно соответствующей последовательности дикого типа.

[00177] В некоторых вариантах реализации изобретения кодируемые полипептиды фактора VIII, описанные в данном документе, содержат В-доменный линкер типа OBI-1 человека, включая аминокислоты 760-772/1655-1667 В-домена фактора VIII дикого типа человека (FVIII-FL- AA, SEQ ID NO: 19). В некоторых вариантах реализации изобретения В-доменный линкер типа OBI-1 человека имеет одну аминокислотную замену относительно соответствующей последовательности дикого типа. В некоторых вариантах реализации изобретения В-доменный линкер типа OBI-1 человека имеет две аминокислотные замены относительно соответствующей последовательности дикого типа.

[00178] В некоторых вариантах реализации изобретения кодируемые полипептиды фактора VIII, описанные в данном документе, содержат В-доменный линкер типа O8, включая аминокислоты SFSQNSRHQAYRYRRG (SEQ ID NO: 32) из В-домена фактора VIII дикого типа свиньи (Toschi et al., Curr. Opin. Mol. Ther. 12:517 (2010)). В некоторых вариантах реализации изобретения В-доменный линкер типа OBI-1 свиньи имеет одну

аминокислотную замену относительно соответствующей последовательности дикого типа. В некоторых вариантах реализации изобретения В-доменный линкер типа OBI-1 свиньи имеет две аминокислотные замены относительно соответствующей последовательности дикого типа.

[00179] Удаление В-домена из конструкций фактора VIII, по-видимому, не влияет на активность активированного фермента (например, FVIIIa), по-видимому, потому, что В-домен удаляется во время активации. Однако В-домен фактора VIII содержит несколько остатков, которые посттрансляционно модифицированы, например, путем N- или O-опосредованного гликозилирования. Анализ *in silico* (предсказание сайтов N-гликозилирования в белках человека, R. Gupta, E. Jung and S. Brunak, в подготовке (2004)) В-домена фактора VIII дикого типа, предсказывает, что по меньшей мере четыре из этих сайтов гликозилируются *in vivo*. Считается, что эти модификации внутри В-домена вносят вклад в посттрансляционное регулирование и/или период полураспада фактора VIII *in vivo*.

[00180] Хотя В-домен фактора VIII отсутствует в зрелом белке фактора VIIIa, гликозилирование в В-доме молекулы предшественника фактора VIII может увеличить период полувыведения белка до активации. Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер кодируемой конструкции фактора VIII, описанный в данном документе, содержит одну или несколько гликозилируемых последовательностей, чтобы обеспечить гликозилирование *in vivo*. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере одну консенсусную гликозилируемую последовательность (например, консенсусную последовательность с N- или O-опосредованным гликозилированием). В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере две консенсусные гликозилируемые последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере три консенсусные гликозилируемые последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере четыре

консенсусные гликозилируемые последовательности. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере пять консенсусных гликозилируемых последовательностей. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере 6, 7, 8, 9, 10 или более консенсусных гликозилируемых последовательностей.

[00181] В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере одну последовательность для N-опосредованного гликозилирования NXS/T, где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от P, S или T. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере две последовательности для N-опосредованного гликозилирования NXS/T, где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от P, S или T. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере три последовательности для N-опосредованного гликозилирования NXS/T, где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от P, S или T. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере четыре последовательности для N-опосредованного гликозилирования NXS/T, где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от P, S или T. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере пять последовательностей для N-опосредованного гликозилирования NXS/T, где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от P, S или T. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер содержит по меньшей мере 6, 7, 8, 9, 10 или более последовательностей для N-опосредованного гликозилирования NXS/T, где X представляет собой любую аминокислоту, отличную от P, S или T.

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

CS04 полинуклеотиды с измененными кодонами

[00182] В одном варианте реализации изобретения

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

[00183] В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 95% идентичности последовательности с CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NO 3 и 4) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 96% идентичности последовательности с CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NO 3 и 4) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 97% идентичности последовательности с CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NO 3 и 4) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 98% идентичности последовательности с CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NO 3 и 4) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 99% идентичности последовательности с CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NO 3 и 4) соответственно. В некоторых вариантах

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

[00184] В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер конструкции фактора VIII кодируется третьей нуклеотидной последовательностью, имеющей высокую идентичность последовательности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6), которая кодирует 14-аминокислотный линкер, соответствующий аминокислотам 760-773 CS04 -FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 95% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 96% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность идентична BDLO04 (SEQ ID NO: 6).

[00185] В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид с измененными кодонами имеет нуклеотидную последовательность с высокой идентичностью последовательности с CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 95% идентичности с CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 96% идентичности с CS04-FL-NA (SEQ ID NO:

1). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность идентична CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1).

[00186] В некоторых вариантах реализации изобретения вариант фактора VIII, кодируемый полинуклеотидом с измененными кодонами, имеет аминокислотную последовательность с высокой идентичностью с CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность идентична CS04-FL-AA (SEQ ID NO: 2).

CS01 полинуклеотиды с измененными кодонами

[00187] В одном варианте реализации изобретения полинуклеотиды с измененными кодонами, представленные в данном документе, содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую

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

[00188] В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 95% идентичности последовательности с CS01-HC-NA и CS01-LC-NA (SEQ ID NO 24 и 25) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 96% идентичности последовательности с CS01-HC-NA и CS01-LC-NA (SEQ ID NO 24 и 25) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 97% идентичности последовательности с CS01-HC-NA и CS01-LC-NA (SEQ ID NO 24 и 25) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 98% идентичности последовательности с CS01-HC-NA и CS01-LC-NA (SEQ ID NO 24 и 25) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 99% идентичности последовательности с CS01-HC-NA и CS01-LC-NA (SEQ ID NO 24 и 25) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 99.5% идентичности

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

[00189] В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер конструкции фактора VIII кодируется третьей нуклеотидной последовательностью, имеющей высокую идентичность последовательности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6), которая кодирует 14-аминокислотный линкер, соответствующий аминокислотам 760-773 CS01-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 95% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 96% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность идентична BDLO04 (SEQ ID NO: 6).

[00190] В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид с измененными кодонами имеет нуклеотидную последовательность с высокой идентичностью последовательности с CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 95% идентичности с CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 96% идентичности с CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с

CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность идентична CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13).

[00191] В некоторых вариантах реализации изобретения вариант фактора VIII, кодируемый полинуклеотидом с измененными кодонами, имеет аминокислотную последовательность с высокой идентичностью с CS01-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS01-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS01-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS01-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS01-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS01-FL-AA (SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность идентична CS01-FL-AA (SEQ ID NO: 2).

CS23 полинуклеотиды с измененными кодонами

[00192] В одном варианте реализации изобретения полинуклеотиды с измененными кодонами, представленные в данном документе, содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую вариант полипептида фактора VIII, с линкером, который расщепляется *in vivo*. Полипептид фактора VIII содержит легкую

цепь фактора VIII, тяжелую цепь фактора VIII и полипептидный линкер, соединяющий С-конец тяжелой цепи с N-концом легкой цепи. Тяжелая цепь полипептида фактора VIII кодируется первой нуклеотидной последовательностью, имеющей высокую идентичность последовательности с CS23-HC-NA (SEQ ID NO: 22), которая представляет собой часть CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20), кодирующей тяжелую цепь фактора VIII. Легкая цепь полипептида фактора VIII кодируется второй нуклеотидной последовательностью с высокой идентичностью последовательности с CS23-LC-NA (SEQ ID NO: 23), которая представляет собой часть CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20) кодирующей легкую цепь фактора VIII. Полипептидный линкер содержит фуриновый сайт расщепления, который позволяет созреть *in vivo* (например, после экспрессии *in vivo* или введения полипептида-предшественника).

[00193] В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 95% идентичности последовательности с CS23-HC-NA и CS23-LC-NA (SEQ ID NO 22 и 23) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 96% идентичности последовательности с CS23-HC-NA и CS23-LC-NA (SEQ ID NO 22 и 23) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 97% идентичности последовательности с CS23-HC-NA и CS23-LC-NA (SEQ ID NO 22 и 23) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 98% идентичности последовательности с CS23-HC-NA и CS23-LC-NA (SEQ ID NO 22 и 23) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 99% идентичности последовательности с CS23-HC-NA и CS23-LC-NA (SEQ ID NO 22 и 23) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 99.5% идентичности последовательности с CS23-HC-NA и CS23-LC-NA (SEQ ID NO 22 и 23) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения

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

[00194] В некоторых вариантах реализации изобретения полипептидный линкер конструкции фактора VIII кодируется третьей нуклеотидной последовательностью, имеющей высокую идентичность последовательности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6), которая кодирует 14-аминокислотный линкер, соответствующий аминокислотам 760-773 CS23-FL-AA (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 95% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 96% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с BDLO04 (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации изобретения третья нуклеотидная последовательность идентична BDLO04 (SEQ ID NO: 6).

[00195] В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид с измененными кодонами имеет нуклеотидную последовательность с высокой идентичностью последовательности с CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 95% идентичности с CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 96% идентичности с CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей

мере 98% идентичности с CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность идентична CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20).

[00196] В некоторых вариантах реализации изобретения вариант фактора VIII, кодируемый полинуклеотидом с измененными кодонами, имеет аминокислотную последовательность с высокой идентичностью с CS23-FL-AA (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS23-FL-AA (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS23-FL-AA (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS23-FL-AA (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS23-FL-AA (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS23-FL-AA (SEQ ID NO: 21). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность идентична CS23-FL-AA (SEQ ID NO: 21).

Полинуклеотиды с Измененными Кодонами, Кодирующие Одноцепочечный Белок Фактора VIII

[00197] Конструкции фактора VIII, в которых фуриновый сайт расщепления, расположенный на С-конце В-домена удален, сохраняют активность в виде одноцепочечного полипептида, несмотря на то, что нормальное созревание молекулы фактора VIII не может происходить (Leyte et al. (1991)). Аналогично, конструкция

Фактора VIII с отсутствующим В-доменом с аттенуированным фуриновым сайтом (содержащим аминокислотную замену R1664H) более биологически активна, чем соответствующая конструкция фактора VIII с фуриновым сайтом расщепления дикого типа (Siner et al. (2013)). Соответственно, в некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотиды с измененными кодонами, представленные в данном документе, содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую одноцепочечный вариант полипептида фактора VIII. Одноцепочечный полипептид фактора VIII содержит легкую цепь фактора VIII, тяжелую цепь фактора VIII и полипептидный линкер, соединяющий С-конец тяжелой цепи с N-концом легкой цепи. Полипептидный линкер не содержит фуриновый сайт расщепления.

CS04 одноцепочечные полинуклеотиды с измененными кодонами

[00198] В одном варианте реализации изобретения полинуклеотиды с измененными кодонами, представленные в данном документе, содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую одноцепочечный вариант полипептида фактора VIII. Полипептид фактора VIII содержит легкую цепь фактора VIII, тяжелую цепь фактора VIII и, необязательно, полипептидный линкер, соединяющий С-конец тяжелой цепи с N-концом легкой цепи. Тяжелая цепь полипептида фактора VIII кодируется первой нуклеотидной последовательностью, имеющей высокую идентичность последовательности с CS04-HC-NA (SEQ ID NO: 3), которая представляет собой часть CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1), кодирующей тяжелую цепь фактора VIII. Легкая цепь полипептида фактора VIII кодируется второй нуклеотидной последовательностью с высокой идентичностью последовательности с CS04-LC-NA (SEQ ID NO: 4), которая представляет собой часть CS04-FL-NA (SEQ ID NO: 1) кодирующей легкую цепь фактора VIII. Необязательный полипептидный линкер не содержит фуриновый сайт расщепления.

[00199] В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 95% идентичности последовательности с CS04-HC-NA и CS04-LC-NA (SEQ ID NO 3 и 4) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные

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

[00200] В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид с измененными кодонами имеет нуклеотидную последовательность с высокой идентичностью последовательности с CS04-SC1-NA (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 95% идентичности с CS04-SC1-NA (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 96% идентичности с CS04-SC1-NA (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS04-SC1-NA (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS04-SC1-NA (SEQ ID NO: 9). В некоторых

вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS04-SC1-NA (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS04-SC1-NA (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS04-SC1-NA (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность идентична CS04-SC1-NA (SEQ ID NO: 9).

[00201] В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид с измененными кодонами имеет нуклеотидную последовательность с высокой идентичностью последовательности с CS04-SC2-NA (SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 95% идентичности с CS04-SC2-NA (SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 96% идентичности с CS04-SC2-NA (SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS04-SC2-NA (SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS04-SC2-NA (SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS04-SC2-NA (SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS04-SC2-NA (SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS04-SC2-NA (SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность идентична CS04-SC2-NA (SEQ ID NO: 11).

[00202] В некоторых вариантах реализации изобретения одноцепочечный вариант фактора VIII, кодируемый полинуклеотидом с измененными кодонами, имеет аминокислотную последовательность с высокой идентичностью с последовательностью CS04-SC1-AA (SEQ

ID NO: 10, фактор VIII Δ человека (760-1667) (SPI; *HsFVIII Δ* (741-1648), SPE)). В некоторых вариантах реализации изобретения вариант фактора VIII, кодируемый полинуклеотидом с измененными кодонами, имеет аминокислотную последовательность с высокой идентичностью с CS04-SC1-AA (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS04-SC1-AA (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS04-SC1-AA (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS04-SC1-AA (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS04-SC1-AA (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS04-SC1-AA (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность идентична CS04-SC1-AA (SEQ ID NO: 10).

[00203] В некоторых вариантах реализации изобретения одноцепочечный вариант фактора VIII, кодируемый полинуклеотидом с измененными кодонами, имеет аминокислотную последовательность с высокой идентичностью с последовательностью CS04-SC2-AA (SEQ ID NO: 12, фактор VIII Δ человека (772-1667) (SPI; *HsFVIII Δ* (753-1648), SPE)). В некоторых вариантах реализации изобретения вариант фактора VIII, кодируемый полинуклеотидом с измененными кодонами, имеет аминокислотную последовательность с высокой идентичностью с CS04-SC2-AA (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS04-SC2-AA (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS04-SC2-AA (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная

последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS04-SC2-AA (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS04-SC2-AA (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS04-SC2-AA (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность идентична CS04-SC2-AA (SEQ ID NO: 12).

CS01 одноцепочечные полинуклеотиды с измененными кодонами

[00204] В одном варианте реализации изобретения полинуклеотиды с измененными кодонами, представленные в данном документе, содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую одноцепочечный вариант полипептида фактора VIII. Полипептид фактора VIII содержит легкую цепь фактора VIII, тяжелую цепь фактора VIII и, необязательно, полипептидный линкер, соединяющий С-конец тяжелой цепи с N-концом легкой цепи. Тяжелая цепь полипептида фактора VIII кодируется первой нуклеотидной последовательностью, имеющей высокую идентичность последовательности с CS01-HC-NA (SEQ ID NO: 24), которая представляет собой часть CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13), кодирующей тяжелую цепь фактора VIII. Легкая цепь полипептида фактора VIII кодируется второй нуклеотидной последовательностью с высокой идентичностью последовательности с CS01-LC-NA (SEQ ID NO: 25), которая представляет собой часть CS01-FL-NA (SEQ ID NO: 13) кодирующей легкую цепь фактора VIII. Необязательный полипептидный линкер не содержит фуриновый сайт расщепления.

[00205] В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 95% идентичности последовательности с CS01-HC-NA и CS01-LC-NA (SEQ ID NO 24 и 25) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 96% идентичности последовательности с CS01-HC-NA и CS01-LC-NA (SEQ ID NO 24 и 25) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей

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

[00206] В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид с измененными кодонами имеет нуклеотидную последовательность с высокой идентичностью последовательности с CS01-SC1-NA (SEQ ID NO: 26). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 95% идентичности с CS01-SC1-NA (SEQ ID NO: 26). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 96% идентичности с CS01-SC1-NA (SEQ ID NO: 26). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS01-SC1-NA (SEQ ID NO: 26). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS01-SC1-NA (SEQ ID NO: 26). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS01-SC1-NA (SEQ ID NO: 26). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с

CS01-SC1-NA (SEQ ID NO: 26). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS01-SC1-NA (SEQ ID NO: 26). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность идентична CS01-SC1-NA (SEQ ID NO: 26).

[00207] В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид с измененными кодонами имеет нуклеотидную последовательность с высокой идентичностью последовательности с CS01-SC2-NA (SEQ ID NO: 27). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 95% идентичности с CS01-SC2-NA (SEQ ID NO: 27). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 96% идентичности с CS01-SC2-NA (SEQ ID NO: 27). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS01-SC2-NA (SEQ ID NO: 27). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS01-SC2-NA (SEQ ID NO: 27). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS01-SC2-NA (SEQ ID NO: 27). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS01-SC2-NA (SEQ ID NO: 27). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS01-SC2-NA (SEQ ID NO: 27). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность идентична CS01-SC2-NA (SEQ ID NO: 27).

[00208] В некоторых вариантах реализации изобретения одноцепочечный вариант фактора VIII, кодируемый полинуклеотидом с измененными кодонами, имеет аминокислотную последовательность с высокой идентичностью с последовательностью CS01-SC1-AA (SEQ ID NO: 10, фактор VIII Δ человека (760-1667) (SPI; HsFVIII Δ (741-1648), SPE)). В некоторых вариантах реализации изобретения вариант фактора VIII, кодируемый полинуклеотидом с измененными кодонами, имеет аминокислотную последовательность с высокой

идентичностью с CS01-SC1-AA (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS01-SC1-AA (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS01-SC1-AA (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS01-SC1-AA (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS01-SC1-AA (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS01-SC1-AA (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность идентична CS01-SC1-AA (SEQ ID NO: 10).

[00209] В некоторых вариантах реализации изобретения одноцепочечный вариант фактора VIII, кодируемый полинуклеотидом с измененными кодонами, имеет аминокислотную последовательность с высокой идентичностью с последовательностью CS01-SC2-AA (SEQ ID NO: 12, фактор VIII Δ человека (772-1667) (SPI; HsFVIII Δ (753-1648), SPE)). В некоторых вариантах реализации изобретения вариант фактора VIII, кодируемый полинуклеотидом с измененными кодонами, имеет аминокислотную последовательность с высокой идентичностью с CS01-SC2-AA (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS01-SC2-AA (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS01-SC2-AA (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS01-SC2-AA (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS01-SC2-AA (SEQ ID NO: 12). В

некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS01-SC2-AA (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность идентична CS01-SC2-AA (SEQ ID NO: 12).

CS23 одноцепочечные полинуклеотиды с измененными кодонами

[00210] В одном варианте реализации изобретения полинуклеотиды с измененными кодонами, представленные в данном документе, содержат нуклеотидную последовательность, кодирующую одноцепочечный вариант полипептида фактора VIII. Полипептид фактора VIII содержит легкую цепь фактора VIII, тяжелую цепь фактора VIII и, необязательно, полипептидный линкер, соединяющий С-конец тяжелой цепи с N-концом легкой цепи. Тяжелая цепь полипептида фактора VIII кодируется первой нуклеотидной последовательностью, имеющей высокую идентичность последовательности с CS23-HC-NA (SEQ ID NO: 22), которая представляет собой часть CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20), кодирующей тяжелую цепь фактора VIII. Легкая цепь полипептида фактора VIII кодируется второй нуклеотидной последовательностью с высокой идентичностью последовательности с CS23-LC-NA (SEQ ID NO: 23), которая представляет собой часть CS23-FL-NA (SEQ ID NO: 20) кодирующей легкую цепь фактора VIII. Необязательный полипептидный линкер не содержит фуриновый сайт расщепления.

[00211] В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 95% идентичности последовательности с CS23-HC-NA и CS23-LC-NA (SEQ ID NO 22 и 23) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 96% идентичности последовательности с CS23-HC-NA и CS23-LC-NA (SEQ ID NO 22 и 23) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 97% идентичности последовательности с CS23-HC-NA и CS23-LC-NA (SEQ ID NO 22 и 23) соответственно. В некоторых вариантах реализации изобретения первая и вторая нуклеотидные последовательности имеют по меньшей мере 98% идентичности

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

[00212] В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид с измененными кодонами имеет нуклеотидную последовательность с высокой идентичностью последовательности с CS23-SC1-NA (SEQ ID NO: 28). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 95% идентичности с CS23-SC1-NA (SEQ ID NO: 28). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 96% идентичности с CS23-SC1-NA (SEQ ID NO: 28). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS23-SC1-NA (SEQ ID NO: 28). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS23-SC1-NA (SEQ ID NO: 28). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS23-SC1-NA (SEQ ID NO: 28). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS23-SC1-NA (SEQ ID NO: 28). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS23-SC1-NA (SEQ ID NO: 28). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная

последовательность идентична CS23-SC1-NA (SEQ ID NO: 28).

[00213] В некоторых вариантах реализации изобретения полинуклеотид с измененными кодонами имеет нуклеотидную последовательность с высокой идентичностью последовательности с CS23-SC2-NA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 95% идентичности с CS23-SC2-NA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 96% идентичности с CS23-SC2-NA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS23-SC2-NA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS23-SC2-NA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS23-SC2-NA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS23-SC2-NA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS23-SC2-NA (SEQ ID NO: 29). В некоторых вариантах реализации изобретения нуклеотидная последовательность идентична CS23-SC2-NA (SEQ ID NO: 29).

[00214] В некоторых вариантах реализации изобретения одноцепочечный вариант фактора VIII, кодируемый полинуклеотидом с измененными кодонами, имеет аминокислотную последовательность с высокой идентичностью с последовательностью CS23-SC1-AA (SEQ ID NO: 10, фактор VIII Δ человека (760-1667) (SPI; HsFVIII Δ (741-1648), SPE)). В некоторых вариантах реализации изобретения вариант фактора VIII, кодируемый полинуклеотидом с измененными кодонами, имеет аминокислотную последовательность с высокой идентичностью с CS23-SC1-AA (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS23-SC1-AA (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах реализации

изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS23-SC1-AA (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS23-SC1-AA (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS23-SC1-AA (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS23-SC1-AA (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность идентична CS23-SC1-AA (SEQ ID NO: 10).

[00215] В некоторых вариантах реализации изобретения одноцепочечный вариант фактора VIII, кодируемый полинуклеотидом с измененными кодонами, имеет аминокислотную последовательность с высокой идентичностью с последовательностью CS23-SC2-AA (SEQ ID NO: 12, фактор VIIIA человека (772-1667) (SPI; *HsFVIIIA* (753-1648), SPE)). В некоторых вариантах реализации изобретения вариант фактора VIII, кодируемый полинуклеотидом с измененными кодонами, имеет аминокислотную последовательность с высокой идентичностью с CS23-SC2-AA (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 97% идентичности с CS23-SC2-AA (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 98% идентичности с CS23-SC2-AA (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с CS23-SC2-AA (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.5% идентичности с CS23-SC2-AA (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность имеет по меньшей мере 99.9% идентичности с CS23-SC2-AA (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность идентична CS23-

SC2-AA (SEQ ID NO: 12).

Экспрессирующие Векторы Фактора VIII

[00216] В некоторых вариантах реализации изобретения описанные в данном документе полинуклеотиды с измененными кодонами, интегрированы в экспрессирующие векторы. Неограничивающие примеры экспрессирующих векторов включают вирусные векторы (например, векторы, подходящие для генной терапии), векторы в виде плазмид, векторы в виде бактериофагов, космиды, фазмиды, искусственные хромосомы и тому подобное.

[00217] Неограничивающие примеры вирусных векторов включают: ретровирус, например, вирус мышиной лейкемии Молони (MMLV), вирус мышиной саркомы Харви, вирус мышиной опухоли молочной железы и вирус саркомы Роуса; аденовирусы, аденоассоциированные вирусы; вирусы типа SV40; полиомавирусы; вирусы Эпштейна-Барра; вирусы папилломы; вирусы герпеса; вирусы осповакцины; и вирусы полиомиелита.

[00218] В некоторых вариантах реализации изобретения описанные в данном документе полинуклеотиды с измененными кодонами интегрированы в векторы генной терапии. В некоторых вариантах реализации изобретения вектор генной терапии является ретровирусом и, в частности, ретровирусом с дефективной репликацией. Протоколы для производства ретровирусов с дефицитной репликацией известны в данной области техники. Для обзора см. Kriegler, M., *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, W.H. Freeman Co., New York (1990) and Murry, E. J., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J. (1991).

[00219] В одном варианте реализации изобретения вектор генной терапии представляет собой вектор генной терапии, основанный на аденоассоциированном вирусе (AAV). AAV-системы были описаны ранее и, как правило, хорошо известны в данной области (Kelleher and Vos, *Biotechniques*, 17(6):1110-17 (1994); Cotten et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 89(13):6094-98 (1992); Curiel, *Nat Immun*, 13(2-3):141-64 (1994); Muzyczka, *Curr Top Microbiol Immunol*, 158:97-129 (1992); и Asokan A, et al., *Mol. Ther.*, 20(4): 699-708 (2012), которые включены в данное описание

посредством ссылки во всей полноте для всех целей). Подробная информация о генерации и использовании векторов rAAV описана, например, в патентах США № 5,139,941 и 4,797,368, каждый из которых включен в данное описание посредством ссылки во всей их полноте для всех целей. В конкретном варианте реализации изобретения вектор AAV представляет собой вектор AAV-8.

[00220] В некоторых вариантах реализации изобретения описанные в данном документе полинуклеотиды с измененными кодонами, интегрированы в ретровирусный вектор экспрессии. Эти системы были описаны ранее и, как правило, хорошо известны в данной области (Mann *et al.*, *Cell*, 33:153-159, 1983; Nicolas and Rubinstein, In: *Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses*, Rodriguez and Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494-513, 1988; Temin, In: *Gene Transfer*, Kucherlapati (ed.), New York: Plenum Press, pp. 149-188, 1986). В конкретном варианте реализации изобретения ретровирусный вектор представляет собой лентивирусный вектор (см., Например, Naldini *et al.*, *Science*, 272(5259):263-267, 1996; Zufferey *et al.*, *Nat Biotechnol*, 15(9):871-875, 1997; Blomer *et al.*, *J Virol.*, 71(9):6641-6649, 1997; патенты США № 6,013,516 и 5,994,136).

[00221] Широкое разнообразие векторов может быть использовано для экспрессии полипептида фактора VIII из полипептида с измененными кодонами в культуре клеток, включая эукариотические и прокариотические экспрессирующие векторы. В некоторых вариантах реализации изобретения предполагается, что плазмидный вектор используется для экспрессии полипептида фактора VIII в культуре клеток. В общем, плазмидные векторы, содержащие репликон и контрольные последовательности, которые получены от видов, совместимых с клеткой-хозяином, используются в связи с этими хозяевами. Вектор может содержать сайт репликации, а также маркирующие последовательности, которые способны обеспечивать фенотипический отбор в трансформированных клетках. Плазида будет содержать полинуклеотид с измененными кодонами, кодирующий полипептид фактора VIII, функционально связанный с одной или несколькими контрольными

последовательностями, например, промотором.

[00222] Неограничивающие примеры векторов для прокариотической экспрессии включают плазмиды, такие как pRSET, pET, pBAD и т. д., где промоторы, используемые в прокариотических экспрессирующих векторах, содержат lac, trc, trp, recA, araBAD и т. д. Примеры векторов для эукариотической экспрессии включают: (i) для экспрессии в дрожжах векторы, такие как pAO, pPIC, pYES, pMET, с использованием промоторов, таких как AOX1, GAP, GAL1, AUG1 и т. д.; (ii) для экспрессии в клетках насекомых векторы, такие как pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC и т. д., с использованием промоторов, таких как PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh и т. д. и (iii) для экспрессии в клетках млекопитающих векторы, такие как pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, pBPV и т. д., и векторы, полученные из вирусных систем, таких как вирус осповакцины, аденоассоциированные вирусы, вирусы герпеса, ретровирусы и т. д., с использованием промоторов таких как CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV и β -актин.

Примеры

Пример 1 – Конструирование Экспрессирующей Последовательности с Измененными Кодонами Варианта Фактора VIII

[00223] Необходимо было преодолеть два препятствия, чтобы создать кодирующую последовательность фактора VIII, которая эффективна для генной терапии гемофилии А. Во-первых, из-за ограничений размера генома обычных векторов доставки генной терапии (например, AAV-вирионов) полипептид, кодирующий фактор VIII, должен быть значительно укорочен. Во-вторых, кодирующую последовательность необходимо было изменить, чтобы: (i) стабилизировать взаимодействия при упаковке внутри вектора доставки, (ii) стабилизировать промежуточную мРНК и (iii) улучшить стабильность транскрипции/трансляции мРНК.

[00224] Для достижения первой цели Заявители начали с конструкции варианта фактора VIII с удаленным В-доменом, называемой в данном документе «FVIII-BDD-SQ». В этой конструкции В-домен заменяется последовательностью из 14 аминокислот, называемой последовательностью «SQ». Рекомбинантный FVIII-BDD-SQ

продается под торговым названием REFACTO® и, как было показано, эффективен для лечения гемофилии А. Однако нативная кодирующая последовательность для FVIII-BDD-SQ, которая содержит нуклеотидную последовательность дикого типа человека для тяжелой и легкой цепей фактора VIII, неэффективно экспрессируется в векторах генной терапии.

[00225] Чтобы усилить слабую экспрессию нативного FVIII-BDD-SQ, алгоритм оптимизации кодонов, описанный в Fath et al. (PLOS ONE, 6:e17596 (2011)), модифицированный, как описано в Ward et al. (Blood, 117:798 (2011)) и в McIntosh et al. (Blood, 121, 3335-3344 (2013)) применяли к последовательности FVIII-BDD-SQ для создания первой промежуточной кодирующей последовательности CS04a. Однако Заявители признали, что последовательность CS04a, созданная с использованием модифицированного алгоритма, может быть улучшена путем дальнейшей модификации последовательности. Соответственно, Заявители повторно вводили CpG-динуклеотиды, повторно вводили кодон CGC для аргинина, меняли распределения лейцинового и серинового кодона, повторно вводили высококонсервативные пары кодонов и удаляли скрытый блок ТАТА, блок ССААТ и элементы сайта сплайсинга, избегая при этом CpG-островков и локального преобладания АТ и GC-богатых участков.

[00226] Во-первых, модифицированный алгоритм систематически заменяет кодоны, содержащие CpG-динуклеотиды (например, аргининовые кодоны) на не-CpG динуклеотидные кодоны, и исключает/избегает CpG-динуклеотидов, формируемых соседними кодонами. Это строгое избегание CpG-динуклеотидов обычно делается для предотвращения индуцированного TLR иммунитета после внутримышечной инъекции ДНК-вакцин. Однако это ограничивает возможности оптимизации кодонов. Например, модифицированный алгоритм исключает использование полного набора кодонов CGX аргинина. Это особенно разрушительно в кодировании генов для экспрессии в клетках человека, поскольку CGC является наиболее часто используемым аргининовым кодоном в высоко экспрессируемых генах человека. Кроме того, предотвращение создания CpGs

соседними кодонами дополнительно ограничивает возможности оптимизации (например, ограничивает количество пар кодонов, которые могут использоваться вместе).

[00227] Поскольку не ожидается, что индуцированный TLR иммунитет будет проблемой, связанной с печеночной генной терапией на основе AAV, кодоны, содержащие CpG, и соседние кодоны, формирующие CpG, были повторно введены в промежуточную кодирующую последовательность CS04a, предпочтительно в последовательности, кодирующей легкую цепь фактора VIII (например, на 3'-конце кодирующей последовательности FVIII-BDD-SQ). Это позволило применять более частое использование предпочтительных кодонов человека, особенно для аргинина. Однако была предпринята осторожность, чтобы избежать создания островков CpG, которые являются областями кодирующей последовательности, имеющими высокую частоту CpG-сайтов. Это противоречит учениям Krinner et al. (Nucleic Acids Res., 42 (6): 3551-64 (2014)), где предполагается, что домены CpG ниже сайтов начала транскрипции способствуют высоким уровням экспрессии генов.

[00228] Во-вторых, модифицированный алгоритм применяет исключительно кодоны, такие как CTG для лейцина, GTG для валина и CAG для глутамина. Однако это нарушает принципы сбалансированного использования кодонов, например, как предложено в Haas et al. (Current Biology, 6(3):315-24 (1996)). Для учета чрезмерного использования предпочтительных кодонов с помощью модифицированного алгоритма, альтернативные кодоны лейцина были повторно введены, если это позволялось другими правилами, применяемыми к изменению кодона (например, частота CpG и содержание GC).

[00229] В-третьих, модифицированный алгоритм заменяет пары кодонов независимо от того, насколько они консервативны, когда выполняются определенные условия (например, наличие CG-динуклеотидов). Для учета полезных свойств, которые могли быть сохранены путем эволюции, наиболее консервативные пары кодонов, которые были заменены алгоритмом и наиболее консервативные предпочтительные пары кодонов, например, как описано в Tats et al. (BMC Genomics 9:463 (2008)), были проанализированы и

скорректированы там, где это позволялось другими правилами, применяемыми к изменению кодонов (например, частота CpG и содержание GC).

[00230] В-четвертых, сериновые кодоны, используемые в промежуточной кодирующей последовательности, также были повторно модифицированы. В частности, сериновые кодоны AGC, TCC и TCT были введены в модифицированную кодирующую последовательность с более высокой частотой, чтобы лучше соответствовать природному распределению кодонов человека (Haas et al., supra).

[00231] В-пятых, элементы ТАТА-бокса, ССААТ-бокса и сайты сплайна интрон/экзон были выявлены и удалены из модифицированной кодирующей последовательности. При модификации кодирующей последовательности была предпринята осторожность, чтобы избежать локального избыточного увеличения встречаемости АТ- или GC-насыщенных участков.

[00232] Наконец, помимо оптимизации использования кодонов в кодирующей последовательности, структурные требования для AAV-вириона были рассмотрены при дальнейшей модификации промежуточной кодирующей последовательности CS04a. AAV-векторы (например, часть нуклеиновой кислоты AAV-вириона) упаковываются в виде одноцепочечных молекул ДНК в их капсиды (для обзора см. Daya and Berns, Clin. Microbiol Rev., 21(4):583-93 (2008)). Следовательно, содержание GC в векторе, вероятно, будет влиять на упаковку генома и, следовательно, на выход вектора во время продукции. Как и многие алгоритмы, модифицированный алгоритм, используемый в данном документе, создает оптимизированную последовательность генов с содержанием GC не менее 60% (см. Fath et al., PLoS One, 6 (3): e17596 (2011) (erratum in: PLoS One, (6) 3 (2011)). Однако капсидный белок AAV8 кодируется нуклеотидной последовательностью, имеющей более низкое содержание GC около 56%. Таким образом, чтобы лучше имитировать природную кодирующую последовательность белка капсидного AAV8, содержание GC в промежуточной кодирующей последовательности CS04a было снижено до 56%.

[00233] Полученная CS04 кодирующая последовательность, изображенная на Фигуре 2, имеет общее содержание GC равное 56%.

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

[00234] Для сравнения были подготовлены несколько других конструкций ReFacto с оптимизированными кодонами. CS01 был сконструирован путем применения алгоритма оптимизации кодонов Fath et al., модифицированного согласно Ward et al., как это сделано для CS04. Однако, в отличие от CS04, конструкция CS01 не содержит никаких островков CpG. Конструкция CS08 ReFacto была подвергнута оптимизации кодонов, как описано в Radcliff P.M. et al., *Gene Therapy*, 15: 289-97 (2008), чье содержание полностью включено в данное описание посредством ссылки в полном объеме для всех целей. Конструкцию ReFacto с оптимизированными кодонами, основанную на кодонах CS10, была получена от Eurofins Genomics (Эберсберг, Германия). Конструкция CS11 ReFacto с оптимизированными кодонами, была получена от Integrated DNA Technologies, Inc. (Коралвилль, США). Конструкция CH25 ReFacto с оптимизированными кодонами, была получена от ThermoFischer Scientific's GeneArt services (Регенсбург, Германия). Конструкция CS40 ReFacto состоит из кодирующей последовательности фактора VIII дикого типа. Алгоритм, используемый для построения CS23, основан на JCAT tool (www.jcat.de), онлайн инструмент для оптимизации кодонов (Grote et al., 2005; *Nucl. Acids Res.* W526-31). Последовательность была дополнительно модифицирована, чтобы больше соответствовать использованию кодонов надсемейства альбумина (Mirzafian et al., 2014: *Sc. Word Journal* 2014, ID 639682). Идентификаторы последовательностей, общие для каждой из кодирующих последовательностей ReFacto, показаны в **Таблице 2** ниже.

Таблица 2 - Процентная матрица идентичности для конструкций

фактора VIII с измененными кодонами.

	CS01	CS04	CS08	CS10	CS11	CS40	CH25	CS23
CS01	100%							
CS04	93.0%	100%						
CS08	80.7%	82.2.%	100%					
CS10	79.1%	79.4%	78.4%	100%				
CS11	78.3%	78.3%	78.1%	77.5%	100%			
CS40	79.6%	79.8%	76.7%	77.6%	75.4%	100%		
CH25	81.3%	85.1%	85.0%	79.9%	79.4%	75.8%	100%	
CS23	84.3%	89.2%	85.1%	80.3%	79.9	76.5%	93.2%	100%

[00235] Плазмиды каждой конструкции были сконструированы путем клонирования различных синтетических фрагментов ДНК в одну и ту же векторную основную плазмиду (pCh-BB01). Синтез ДНК фрагментов BDD-FVIII Refacto-типа с фланкирующими сайтами рестрикции ферментов AscI и NotI были выполнены с помощью ThermoFischer Scientific (Регенсбург, Германия). Основа вектора содержит два фланкирующих инвертированных концевых повторов AAV2 (ITR), которые содержат последовательность промотора/энхансера, полученную из мышинового транстиретина печени, сайты рестрикции фермента AscI и NotI для вставки соответствующего BDD-FVIII типа Refacto и синтетический полиА-сайт. После лигирования подготовленной векторной основы и вставок с помощью сайтов AscI и NotI полученные плазмиды амплифицировали в миллиграммном масштабе. Последовательности конструкций BDD-FVIII типа Refacto были подтверждены прямым секвенированием (Microsynth, Balgach, Switzerland). Клонирование приводило к созданию семи различных плазмидных конструкций с именем pCS40, pCS01, pCS04, pCS08, pCS10, pCS11, pCh25 и pCS23 (Фигура 19). Конструкции имеют одинаковую векторную основу и кодируют один и тот же белок FVIII с отсутствующим В-доменом (Refacto-тип BDD-FVIII), но отличаются по своей кодирующей последовательности FVIII.

[00236] Векторы AAV8 были получены с помощью трех способов трансфекции плазмидами, как описано в Grieger JC, et al. (Virus

Vectors Using Suspension HEK293 Cells and Continuous Harvest of Vector From the Culture Media for GMP FIX and FLT1 Clinical Vector, *Mol Ther.*, Oct 6. (2015) doi: 10.1038/mt.2015.187. [Epub перед печатью]), чье содержание полностью включено в данное описание посредством ссылки в полном объеме для всех целей. Суспензированные клетки HEK293 использовали для трансфекции плазмидами с использованием соответствующей векторной плазмиды FVIII, хелперной плазмиды pXX6-80 (несущей аденовирусные хелперные гены) и упаковочной плазмиды pGSK2/8 (вносящей гены *rep2* и *cap8*). Чтобы изолировать конструкции AAV8, клеточный осадок из одного литра культуры обрабатывали с использованием градиентов йодиксанола, как описано в Grieger et al. (2015, *Supra*). Процедура привела к получению векторных препаратов, называемых vCS01, vCS04, vCS08, vCS10, vCS11 и vCH25. Векторы были количественно оценены с помощью qPCR, используя универсальную процедуру qPCR, с использованием инвертированных концевых повторов AAV2 (Aurnhammer, *Human Gene Therapy Methods: Part B* 23:18-28 (2012)). Контрольная векторная плазида, несущая инвертированные концевые повторы AAV2, использовалась для получения стандартной кривой. Результирующая конструкция vCS04 представлена как SEQ ID NO: 8 на Фигурах 7A-7C.

[00237] Целостность векторных геномов анализировали с помощью электрофореза AAV в агарозном геле. Электрофорез проводили, как описано в Fagone et al., *Human Gene Therapy Methods* 23:1-7 (2012). Вкратце, препараты AAV-вектора инкубировали при температуре 75°C в течение 10 минут в присутствии 0,5% SDS и затем охлаждали до комнатной температуры. Приблизительно 1.5E10 векторных геномов (vg) загружали на дорожку 1% 1xTAE агарозного геля и подвергали электрофорезу в течение 60 мин при напряженности электрического поля 7 В/см длины геля. Затем гель окрашивали с помощью раствора 2x GelRed (Biotium Cat # 41003) и визуализировали с помощью ChemiDocTMMP (Biorad). Результаты, изображенные на Фигуре 20, показывают, что вирусные векторы vCS01, vCS04 и vCS40 имеют геном одинакового размера, обозначенный отдельной полосой в диапазоне 5 кб (Фигура

20, дорожки 2-4). Несмотря на размер вектора около 5,2 кб, геном проявляется в виде однородной полоски, подтверждающей правильную упаковку генома несколько завышенного размера (относительно AAV генома дикого типа 4,7 т.п.н.). Все остальные векторы vCS демонстрируют тот же геномный размер (данные не показаны).

[00238] Чтобы подтвердить ожидаемый паттерн капсидных белков, SDS PAGE с последующим окрашиванием серебром проводили с векторами vCS01, vCS04 и vCS40 (Фигура 21). Как показано на Фигуре, дальнейшая процедура очистки привела к получению высокоочищенного препарата, демонстрирующего ожидаемый паттерн белков VP1, VP2 и VP3 (Фигура 21, дорожки 2-4). Тот же паттерн была получен для всех других вирусных препаратов (не показаны). Процедура SDS-PAGE препаратов AAV проводилась в соответствии со стандартными протоколами. Каждая дорожка содержала 1×10^{10} vg соответствующей вирусной конструкции и разделялась на 4-12% геле Bis-Tris (NuPAGE® Novex, Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя. Окрашивание серебром выполнялось с помощью набора SilverQuest™ (Novex, Life Technologies) в соответствии с инструкциями производителя.

[00239] Удивительно, но AAV-векторы vCS01 и vCS04 имели более плотную упаковку вирионов, измеряемую более высокими выходами при производстве вируса AAV по сравнению с кодирующей конструкцией дикого типа vCS40 и другими конструкциями с оптимизированными кодонами. Как показано в **Таблице 3**, векторы vCS01 и vCS04 реплицируются значительно лучше, чем vCS40, что обеспечивает увеличение выхода AAV в 5-7 раз.

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

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

Пример 2 – Экспрессия In Vivo вариантов экспрессирующих последовательностей фактора VIII с измененными кодонами

[00240] Для проверки биологической активности вариантов последовательностей фактора VIII с измененными кодонами, конструкции FVIII типа ReFacto, описанные в Примере 1, вводили мышам, не имеющим фактора VIII. Вкратце, анализы проводили с использованием нокаутных по C57Bl/6 FVIII мышей (на) (6–8 животных на группу) путем инъекции в хвостовую вену 4E12 векторных геномов (vg) на килограмм массы тела мыши. Кровь отбирали через 14 дней после инъекции путем ретроорбитальной пункции, плазму готовили и замораживали, используя стандартные процедуры. Уровни экспрессии измеряли на 14-й день из-за минимального влияния ингибирующих антител в это время, которое наблюдаются у некоторых животных этой мышью модели в более поздние сроки. Активность FVIII в мышью плазме определяли с использованием анализа Technochrome FVIII с незначительными модификациями, как это было предложено производителем (Technoclone, Вена, Австрия). Для анализа образцы плазмы соответствующим образом разбавляли и смешивали с аналитическими реагентами, содержащими тромбин, активированный фактор IX (FIXa), фосфолипиды, фактор X и кальций. После активации FVIII тромбином образуется комплекс с FIXa, фосфолипидами и кальцием. Этот комплекс активирует FX приводя к образованию активного FX (FXa), который, в свою очередь, отщепляет пара-нитроанилид (pNA) от хромогенного субстрата. Кинетику образования pNA измеряют при 405 нм. Скорость прямо пропорциональна концентрации FVIII в образце. Концентрации FVIII считываются с контрольной кривой, и

результаты приведены в виде IU FVIII/миллилитр.

[00241] Результаты, представленные в **Таблице 4** ниже, демонстрируют, что последовательности с измененными кодонами, разработанные с использованием коммерческих алгоритмов (CS10, CS11 и CH25), обеспечили лишь небольшое увеличение BDD-фактора VIII (в 3-4 раза) по сравнению с конструкцией BDD-фактора VIII дикого типа (CS40). Аналогично, конструкция BDD-фактора VIII с измененными кодонами, полученная, как описано в Radcliffe et al. (CS08) обеспечила лишь 3-4-кратное увеличение экспрессии BDD-FVIII. Этот результат согласуется с результатами, полученными в Radcliff et al. Удивительно, что конструкции CS01, CS04 и CS23 обеспечивали значительно более высокую экспрессию BDD-FVIII в исследованиях активности *in vivo* (соответственно в 18, 74 и 30 раз).

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

Конструкция	Кодоновый Алгоритм	Средний Уровень Экспрессии FVIII на 14 День [IU/мл]	Стандартное отклонение	Количество мышей	Кратность увеличения относительно wt
vCS40	Человек, дикий тип	0.03	0.03	12	–
vCS01	Способ Заявителей	0.55	0.28	22	18.3
vCS04	Способ Заявителей	2.21	1.20	55	73.7
vCS08	Radcliffe et al.	0.11	0.01	6	3.6
vCS10	Eurofins	0.09	0.01	7	3.0
vCS11	IDT	0.08	0.02	8	2.7
vCH25	GeneArt	0.13	0.12	18	4.3
vCS23	Способ Заявителей	0.91	0.32	5	30.3

Понятно, что примеры и варианты реализации изобретения,

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 13, причем полинуклеотид кодирует полипептид фактора VIII.

2. Полинуклеотид по п.1, в котором нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 13.

3. Полинуклеотид по п.1, в котором нуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 13.

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

где тяжелая цепь полипептида фактора VIII кодируется первой нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 24;

где легкая цепь полипептида фактора FVIII кодируется второй нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 25; и

где полипептидный линкер содержит сайт расщепления фурином.

5. Полинуклеотид по п.4, где полипептидный линкер кодируется третьей нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 5.

6. Полинуклеотид по п.4 или 5, где:

первая нуклеотидная последовательность по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 24; и

вторая нуклеотидная последовательность по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 25.

7. Полинуклеотид по п.4 или 5, где:

первая нуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 24; и

вторая нуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 25.

8. Полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 20, причем полинуклеотид кодирует полипептид фактора VIII.

9. Полинуклеотид по п.8, где нуклеотидная последовательность имеет по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 20.

10. Полинуклеотид по п.8, где нуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 20.

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

где тяжелая цепь полипептида фактора VIII кодируется первой нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 22;

где легкая цепь полипептида фактора FVIII кодируется второй нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 23; и

где полипептидный линкер содержит сайт расщепления фурином.

12. Полинуклеотид по п.11, где полипептидный линкер кодируется третьей нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 7.

13. Полинуклеотид по п.11 или 12, где:

первая нуклеотидная последовательность по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 22; и

вторая нуклеотидная последовательность по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 23.

14. Полинуклеотид по п.11 или 12, где:

первая нуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 22; и

вторая нуклеотидная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 23.

15. Полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид фактора VIII, причем полипептид фактора VIII содержит легкую цепь, тяжелую цепь и

полипептидный линкер, соединяющий С-конец тяжелой цепи с N-концом легкой цепи,

где тяжелая цепь полипептида фактора VIII кодируется первой нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 24.

16. Полинуклеотид по п.15, где тяжелая цепь полипептида фактора VIII кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 24.

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

где легкая цепь полипептида фактора VIII кодируется первой нуклеотидной последовательностью, имеющей по меньшей мере 99% идентичности с SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 25.

18. Полинуклеотид по п.17, где легкая цепь полипептида фактора VIII кодируется нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 25.

19. Полинуклеотид по любому из пп. 1-18, причем полинуклеотид кодирует полипептид фактора VIII, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 2.

20. Полинуклеотид по любому из пп. 1-18, где полинуклеотид кодирует полипептид фактора VIII, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

21. Полинуклеотид по любому из пп. 1-20, где кодируемый полипептид фактора VIII включает полипептид гликозилирования, расположенный между двумя последовательными аминокислотами.

22. Полинуклеотид по любому из пп. 1-21, дополнительно содержащий промоторный элемент, функционально связанный с полинуклеотидом, кодирующим полипептид фактора VIII.

23. Полинуклеотид по п.22, где промоторный элемент представляет собой специфичную для печени промоторную последовательность перед нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид фактора VIII.

24. Полинуклеотид по п.23, дополнительно содержащий последовательность интрона, расположенную между последовательностью промотора, специфичной для печени, и нуклеотидной последовательностью, кодирующей полипептид фактора VIII.

25. Вектор на основе аденоассоциированного вируса (AAV), содержащий полинуклеотид по любому из пп. 1-24.

26. Частица аденоассоциированного вируса (AAV), содержащая полинуклеотид по любому из пп. 1-24.

27. Клетка-хозяин, инфицированная частицей аденоассоциированного вируса (AAV), содержащей полинуклеотид по любому из пп. 1-24.

28. Способ получения частицы аденоассоциированного вируса (AAV), включающий введение полинуклеотида по любому из пп. 1-24 в клетку-хозяин млекопитающего, причем полинуклеотид компетентен для репликации в клетке-хозяине млекопитающего.

29. Способ лечения гемофилии А, включающий введение пациенту частицы аденоассоциированного вируса (AAV) по п.26.

30. Способ трансдукции клетки-хозяина, включающий контактирование клетки-хозяина с частицей аденоассоциированного вируса (AAV) по п.26.

31. Частица аденоассоциированного вируса (AAV) по п.26 для лечения гемофилии А.

32. Частица аденоассоциированного вируса (AAV) по п.26 для трансдукции клетки-хозяина.

33. Применение частицы аденоассоциированного вируса (AAV) по п.26 для получения лекарственного средства для лечения гемофилии А.

FVIII человека, дикий тип



BDD-FVIII, тип Refacto



Фиг. 1

CS04-FL-NA

atgcagattgagctgagcacctgcttcttctctgtgctgctgaggttctgcttctctgccaccagga
 gatactacctgggggctgtggagcttcttctgggactacatgcagctgacctgggggagctgctgt
 ggatgccaggttcccaccagagtgcacaaatccttccattcaacacctctgtgggtctacaagaag
 acctcttctgtggagttcactgaccacctgttcaacattgcaaaacccaggccacctggatgggac
 tctgtgggacccaccattcaggctgaggtgtatgacactgtggtcatcaccctcaagaacatggcctc
 ccacctgtgagcctgcatgctgtgtgggggtcagctactggaaggcctctgagggggtgagtatgat
 gaccagacctcccagaggagaaggaggatgacaaagtgttccctgggggcagccacacctatgtgt
 ggcaggtcctcaaggagaatggcccatggcctctgaccactctgctgacctactcctaccttct
 tcatgtggacctgggtcaaggacctcaactctggactgattggggcctgctgggtgtgcaggagggc
 tccctggccaaagagaagacccagacctgcacaagttcattctctgttctgtcttctgtatgagg
 gcaagagctggcactctgaaaccaagaactcctgatgcaggacagggatgctgctctgccaggggc
 ctggcccaagatgcacactgtgaatggctatgtgaacaggagcctgacctgactcattggctgccac
 aggaaatctgtctactggcatgtgattggcatggggacaacccctgaggtgcactccatttctctgg
 agggccacaccttctgttcagggaaccacagacaggccagcctggagatcagccccatcaccttct
 cactgccagacctgctgatggacctggacagttcctgctgttctgccacatcagctcccaccag
 catgatggcatggaggcctatgtcaaggtggacagctgccctgaggagccacagctcaggatgaaga
 acaatgaggaggctgaggactatgatgatgacctgactgactctgagatggatgtggtccgcttga
 tgatgacaaacagcccatccttcatcagatcaggtctgtgtgccaagaacaccccaagacctgggtg
 cactacattgctgctgaggaggaggactgggactatgcccaactggctcctggccctgatgacagga
 gctacaagagccagtaacctcaacaatggccacagaggattggagcgaagtacaagaaagtacaggt
 catggctacactgatgaaaccttcaagaccaggaggccattcagcatgagtctggcatcctggggc
 ccactcctglatggggaggtgggggacacctgctcatcatcttcaagaaccagcctccagggcct
 acaacatctaccacatggcatcactgatgtcaggccctgtacagccgaggctgccaaaggggt
 gaaacacctcaaggacttccccattctgctggggagatcttcaagtacaagtggactgtcactgtg
 gaggatggaccaaccaaatctgacccaggtgctcaccagatactactccagcttctgtgaacatgg
 agagggacctggcctctgctgctgattggccactgctcatctgtacaaggagtctgtggaccagag
 gggaaaccagatcatgtctgacaagaggaatgtgattctgttctctgtcttctgatgagaacaggagc
 tggtaactgactgagaacattcagcgcttctgcccacccctgctgggggtgcagctggaggacctg
 agttccaggccagcaacatcatgcactccatcaatggctatgtgtttgacagcctccagcttctgt
 ctgctgcatgaggtggcctactgggtacattcttcttctattggggccagactgacttcttctgtc
 ttcttctctggctacaccttcaaacacaagatgggtgtatgaggacacctgaccttcttccattct
 ctgggggagactgtgttctatgagcatggagaacctggcctgtggattctgggatgccacaactctga
 ctctccgcaacaggggcatgactgcctgctcaaagtctcctcctgtgacaagaacactggggactac
 tatgaggacagctatgaggacatctctgctacctgctcagcaagaacaatgccattgagcccagga
 gcttcagccagaatccacctgtcctgaaacgccaccagaggagatcaccaggaccacctccagtc
 tgaccaggaggagattgactatgatgacaccttctgtgtggagatgaagaagaggacttggacatc
 tatgacgaggacgagaaccagagcccaaggagcttccagaagaagaccaggcactacttcttctgt
 ctgtggagcgctgtgggactatggcatgagctccagcccccattgtcctcaggaacaggggccagtc
 tggctctgtgccacagttcaagaagtggtcttccaaagattcactgatggcagcttcccccagccc
 ctgtacagaggggagctgaatgagcacctgggactcctggggccatacatcagggctgaggtggagg
 acaacatcatgggtgaccttccgcaaccaggcctccaggccctacagcttctacagctcctcatcag
 ctatgagGaggaccagaggcagggggctgagccacgcaagaacttctgtgaaacccaatgaaaccaag
 acctacttctggaagtcagcaccacatggccccaccaaggatgagtttgactgcaaggcctggg

(Продолжение)

Фиг. 2А

cctacttctctgatgtggacctggagaaggatgtgcactctggcctgattggcccactcctgggtctg
ccacaccaacacctgaacctgcccattggaaggcaagtgaactgtgcaggagtttgccctcttcttc
accatctttgatgaaaccaagagctggtacttcactgagaacatggagcgcaactgcaggggcccat
gcaacattcagatggaggacccccaccttcaaagagaactaccgcttccatgccatcaatggctacat
catggacacctgacctgggtgtgtcatggcccaggaccagagatcaggtggtacctgcttctatg
ggctccaatgagaacattcactccatccacttctctgggcatgtcttcactgtgcgcaagaaggagg
agtacaagatggccctgtacaacctctacctgggggtctttgagactgtggagatgctgcccctcaa
agctggcatctggagggtggagtgcctcattggggagcacctgcatgctggcatgagcacctgttc
ctggctctacagcaacaagtgccagacccccctgggaatggcctctggccacatcagggaactccaga
tcactgacctgtggcagtatggcagtgggcccccaagctggccaggctccactactctggatccat
caatgcctggagcaccaaggagccattcagctggatcaaagtggacctgctggcccccatgatcatc
catggcatcaagacccagggggcccaggcagaagttctccagcctgtacatcagccagttcatcatca
tgtacagcctggatggcaagaaatggcagacctacagaggcaactccactggaacactcatgggtctt
ctttggcaatgtggacagctctggcatcaagcacacatcttcaaccccccaatcatcgccagatac
atcaggctgcacccacccactacagcatccgcagcacctcaggatggagctgatgggctgtgacc
tgaactcctgcagcatgccctgggcatggagagcaaggccatttctgatgccagatcactgcctc
cagctacttcaccaacatgtttgccacctggagcccaagcaaggccaggctgcacctccagggaagg
agcaatgcctggaggccccagggtcaacaacccaaaggagtggctgcagggtggacttcagaagacca
tgaaggctcactgggtgaccacccagggggtcaagagcctgctcaccagcatgtatgtgaaggagtt
cctgatcagctccagccaggatggccaccagtggacctcttcttccagaatggcaagggtcaagggtg
ttccagggaaccaggacagcttcacCctgtggtgaacagcctggacccccccctcctgaccagat
acctgaggattcacccccagagctgggtccaccagattgcctgaggatggaggtcctgggatgtga
ggcccaggacctgtactga (SEQ ID NO:1)

CS04-FL-AA

MQIELSTCFCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDAR' FPPRVPKSFPFNTSVVYK
 KTLFVEFTDHLFENIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEY
 DDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCRE
 GSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGC
 HRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLMDLGQFLLFCHISSH
 QHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTW
 VHYIAAEEEDWDYAPLVLPDDRYSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTRAIQHESGIL
 GPLLYGEVGDILLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFILPGEIFKYKWTVT
 VEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQGRNQIMSDKRNVLFSVFDENR
 SWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS
 VFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGD
 YYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNPVLRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFD
 IYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNRAQSGSVQPKKVVFQEFDTGSFTQ
 PLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKKNFVKPNET
 KTYFWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALF
 FTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRWYLLS
 MGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTL
 FLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI
 INGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIAR
 YIRLHPHTYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQG
 RSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVK
 VFQGNQDSFTFVVNSLDPPLLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY (SEQ ID NO:2)

Фиг. 3

CS04-HC-NA

```

                                gcc
accaggagat actacctggg ggotgtggag ttttcttggg actacatgca gtctgacctg
ggggagctgc ctgtggatgc caggttccca cccagagtgc ccaaatcctt cccattcaac
acctctgtgg tctacaagaa gacctctttt gtggagttca ctgaccacct gttcaacatt
gccaaaccca ggccaccctg gatgggactc ctgggacca ccattcaggc tgaggtgtat
gacactgtgg tcatcacctt caagaacatg gcctcccacc ctgtgagcct gcatgctgtg
ggggtcagct actggaaggc ctctgagggg gctgagtatg atgaccagac ctcccagagg
gagaaggagg atgacaaagt gttccctggg ggcagccaca cctatgtgtg gcaggtcctc
aaggagaatg gcccatggc ctctgaccca ctctgcctga cctactccta ctttctcat
gtggacctgg tcaaggacct caactctgga ctgattgggg ccctgctggt gtgcagggag
ggctccctgg ccaaagagaa gaccagacc ctgcacaagt tcattctcct gtttgcgtgc
tttgatgagg gcaagagctg gcaactctga accaagaact ccctgatgca ggacagggat
gctgcctctg ccagggcctg gcccaagatg cacactgtga atggctatgt gaacaggagc
ctgcctggac tcattggctg ccacaggaaa tctgtctact ggcattgtgt tggcatgggg
acaacccttg aggtgcactc ctttttctg gagggccaca ccttccctgt caggaaccac
agacaggcca gcctggagat cagccccatc accttcttca ctgcccagac cctgctgatg
gaacctggac agttcctgct gttctgccac atcagctccc accagcatga tggcatggag
gcctatgtca aggtggacag ctgccttgag gagccacagc tcaggatgaa gaacaatgag
gaggctgagg actatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtgtt ccgctttgat
gatgacaaca gcccatcctt cattcagatc aggtctgtgg ccaagaaaca cccaagacc
tggtgtgact acattgctgc tgaggaggag gactgggact atgccccact ggtcctggcc
cctgatgaca ggagctacaa gagccagtac ctcaacaatg gccacagag gattggacgc
aagtacaaga aagtcagggt catggcctac actgatgaaa cttcaagac caggagggcc
attcagcatg agtctggcat cctgggcca ctctgtatg gggaggtggg ggacaccctg
ctcatcatct tcaagaacca ggctccagg cctacaaca tctaccaca tggcatcact
gatgtcaggc cctgtacag ccgcaggctg ccaaagggg tgaaacacct caaggacttc
cccattctgc ctggggagat cttcaagtac aagtggactg tcactgtgga ggatggacca
accaaatctg accccagggt cctcaccaga tactactcca gctttgtgaa catggagagg
gacctggcct ctggcctgat tggccactg ctcatctgct acaaggagtc tgtggaccag
aggggaaacc agatcatgtc tgacaagagg aatgtgattc tgttctctgt ctttgatgag
aacaggagct ggtacctgac tgagaacatt cagcgcttcc tgcccaacc tgctggggtg
cagctggagg accctgagtt ccaggccagc aacatcatgc actccatcaa tggctatgtg
tttgacagcc tcagctttc tgtctgcctg catgaggtgg cctactggta cattctttct
attggggccc agactgactt ctttctgtc ttcttctctg gctacacctt caaacacaag
atggtgtatg aggacacct gacctcttc ccattctctg gggagactgt gttcatgagc
atggagaacc ctggcctgtg gattctggga tgccacaact ctgacttccg caacaggggc
atgactgccc tgcctcaaagt ctctcctgt gacaagaaca ctggggacta ctatgaggac
agctatgagg acatctctgc ctacctgtc agcaagaaca atgccattga gcccagg
(SEQ ID NO:3)

```

Фиг. 4

CS04-LC-NA

```

                                g agatcaccag gaccaccctc
cagtctgacc aggaggagat tgactatgat gacaccattt ctgtggagat gaagaaagag
gactttgaca tctatgacga ggacgagaac cagagcccaa ggagcttcca gaagaagacc
aggcactact tcattgctgc tgtggagcgc ctgtgggact atggcatgag ctcagcccc
catgtcctca ggaacagggc ccagtctggc tctgtgccac agttcaagaa agtggctctc
caagagttca ctgatggcag cttcaccag cccctgtaca gaggggagct gaatgagcac
ctgggactcc tggggccata catcagggct gaggtggagg acaacatcat ggtgaccttc
cgcacaccag cctccaggcc ctacagcttc tacagctccc tcatcagcta tgaggaggac
cagaggcagg gggctgagcc acgcaagaac tttgtgaaac ccaatgaaac caagacctac
ttctggaaag tccagcacca catggccccc accaaggatg agtttgactg caaggcctgg
gcctacttct ctgatgtgga cctggagaag gatgtgcact ctggcctgat tggcccactc
ctggctctgcc acaccaacac cctgaaccct gcccatggaa ggcaagtgc tgtgcaggag
tttgccctct tcttcaccat ctttgatgaa accaagagct ggtacttcac tgagaacatg
gagcgcact gcagggcccc atgcaacatt cagatggagg accccacctt caaagagaac
taccgcttcc atgcatcaa tggtacatc atggacacc tgctgggct tgtcatggcc
caggaccaga ggatcagggt gtacctgctt tctatgggct ccaatgagaa cttcactcc
atocacttct ctgggcatgt cttcactgtg cgcagaagg aggagtacaa gatggccctg
tacaacctct accctgggggt ctttgagact gtggagatgc tgccctccaa agctggcatc
tggagggttg agtgccctcat tggggagcac ctgcatgctg gcatgagcac cctgttcttg
gtctacagca acaagtgcc aacccccctg ggaatggcct ctggccacat cagggacttc
cagatcactg cctctggcca gtatggccag tgggccccca agctggccag gctccactac
tctggatcca tcaatgcctg gagcaccaag gagccattca gctggatcaa agtggacctg
ctggccccca tgatcatcca tggcatcaag acccaggggg ccaggcagaa gttctccagc
ctgtacatca gccagttcat catcatgtac agcctggatg gcaagaaatg gcagacctac
agaggcaact ccactggaac actcatggtc ttctttggca atgtggacag ctctggcatc
aagcacaaca tcttcaaccc cccaatcatc gccagatata tcaggctgca ccccaccac
tacagcatcc gcagcaccct caggatggag ctgatgggct gtgacctgaa ctctgcagc
atgcccctgg gcatggagag caaggccatt tctgatgcc agatcactgc ctcagctac
ttcaccaca tgtttgccac ctggagccca agcaaggcca ggtgcacct ccagggaagg
agcaatgcct ggaggcccca ggtcaacaac ccaaaggagt ggtgcaggt ggacttccag
aagaccatga aggtcactgg ggtgaccacc caggggtca agagcctgct caccagcatg
tatgtgaagg agttcctgat cagctccagc caggatggcc accagtggac cctcttctc
cagaatggca aggtcaaggt gttccagggc aaccaggaca gottcaccoc tgtggtgaac
agcctggacc cccccctct gaccagatac ctgaggattc accccagag ctgggtccac
cagattgccc tgaggatgga ggtcctggga tgtgaggccc aggacctgta c
(SEQ ID NO:4)

```

Фиг. 5

BDLO01 - agc ttctctcaga atccacctgt cctgaagaga caccagaga (SEQ ID NO:5)
BDLO04 - agc ttcagccaga atccacctgt cctgaaacgc caccagagg (SEQ ID NO:6)
BDLO23 - agc ttcagccaga acccccccggt gctgaagagg caccagagg (SEQ ID NO:7)

Фиг. 6

CS04-AV-NA

```

1      tcgcgcggttt cgggtgatgac ggtgaaaacc tctgacacat gcagctcccg gagacgggtca
61     cagcttgtct gtaagcggat gccgggagca gacaagcccg tcagggcgcg tcagcgggtg
121    ttggcgggtg tcggggcgtgg cttaactatg cggcatcaga gcagattgta ctgagagtgc
181    accatatgcg gtgtgaaata ccgcacagat gcgtaaggag aaaataccgc atcagggcgc
241    attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc ggtgcggggc tcttcgctat
301    tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggtg acgccagggt
361    tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgaatt cctcgagatt taaatgacgt
421    tggccactcc ctctctgcgc gctcgctcgc tcactgaggc cgggcgacca aaggtcgccc
481    gacgcccggg ctttgcccgg ggggcctcag tgagcgagcg agcgcgcaga gaggagtggt
541    ccaactccat cactagggtt tcttgagttt aaacttcgtc gacgattcga gcttggggtg
601    caggctcagg gcactgggag gatgttgagt aagatggaaa actactgatg acccttgcag
661    agacagagta ttaggacatg ttgaaacagg gcccgggcga tcagcaggta gctctagagg
721    atccccgtct gtctgcacat tctgtagagc gagtgttcog atactcta atctccataggc
781    aaggttcata tttgtgtagg ttacttatto tcttttgggt gactaagtca ataatacaga
841    tcagcagggt tggagtcagc ttggcaggga tcagcagcct gggttggaag gaggggggtat
901    aaaagcccct tcaccaggag aagccgtcac acagactagg cgcgccaccg ccaccatgca
961    gattgagctg agcacctgct tcttctgtgt cctgctgagg ttctgcttct ctgccaccag
1021   gagatactac ctgggggctg tggagcttct ttgggactac atgcagctct accctggggga
1081   gctgcctgtg gatgccaggt tcccaccagc agtgcccaaa tcttcccat tcaacacctc
1141   tgtggtctac aagaagcccc tctttgtgga gttcactgac cacctgttca acattgccaa
1201   acccaggcca ccttgatgg gactcctggg acccaccatt caggctgagg tgtatgacac
1261   tgtggtcacc accctcaaga acatggcctc ccaccctgtg agcctgcatt ctgtgggggt
1321   cagctactgg aaggcctctg agggggctga gtatgatgac cagacctccc agagggagaa
1381   ggaggatgac aaagtgttcc ctgggggcag ccacacctat gtgtggcagg tctcaaggga
1441   gaatggcccc atggcctctg acccactctg cctgacctac tctaccttt ctcatgtgga
1501   cctggtcaag gacctcaact ctggactgat tggggccctg ctggtgtgca gggagggctc
1561   cctggccaaa gagaagcccc agacctgca caagttcatt ctctgtttg ctgtctttga
1621   tgagggcaag agctggcact ctgaaaccaaa gaactccctg atgcaggaca gggatgctgc
1681   ctctgccagg gcctggccca agatgcacac tgtgaatggc tatgtgaaca ggagcctgcc
1741   tggactcatt ggctgccaca ggaaatctgt ctactggcat gtgattggca tggggacaac
1801   cctgaggtg cactccattt tcttgagggg ccacaccttc ctggtcagga accacagaca
1861   gggcagcctg gagatcagcc ccatcacctt cctcactgcc cagacctgc tgatggacct
1921   cggacagttc ctgctgttct gccacatcag ctcccaccag catgatggca tggaggccta
1981   tgtcaagggt gacagctgcc ctgaggagcc acagctcagg atgaagaaca atgaggaggc
2041   tgaggactat gatgatgacc tgactgactc tgagatggat gtggtccgct ttgatgatga
2101   caacagccca tcttccattc agatcaggtc tgtggccaag aaacacccca agacctgggt
2161   gcactacatt gctgctgagg aggaggactg ggaactatgc cactgggtcc tggccctga
2221   tgacaggagc tacaagagcc agtacctcaa caatggccca cagaggattg gacgcaagta
2281   caagaaagtc aggttcatgg cctacactga tgaaaccttc aagaccaggg aggccattca
2341   gcatgagttt ggcattcctg gccactcctt gtatggggag gtgggggaca cctgctcat
2401   catcttcaag aaccaggcct ccaggcccta caacatctac ccacatggca tcactgatgt
2461   caggccctctg tacagccgca ggctgccaaa ggggtgaaa cacctcaagg acttcccat

```

Фиг. 7А

```

2521 tctgcctggg gagatcttca agtacaagtg gactgtcact gtggaggatg gaccaaccaa
2581 atctgacccc aggtgcctca ccagatacta ctccagcttt gtgaacatgg agagggacct
2641 ggccctctggc ctgattggcc cactgctcat ctgctacaag gactctgtgg accagagggg
2701 aaaccagatc atgtctgaca agaggaatgt gattctgttc tctgtctttg atgagaacag
2761 gagctggtac ctgactgaga acattcagcg ctccctgccc aacctgctg gggtgcagct
2821 ggaggacct gagttccagg ccagcaacat catgcactcc atcaatggct atgtgtttga
2881 cagcctccag ctttctgtct gcctgcata ggtggcctac tggtagcttc tttctattgg
2941 ggcccagact gacttctctt ctgtctctct ctctggctac accttcaaac acaagatggg
3001 gtatgaggac acctgacccc tcttccatt ctctggggag actgtgttca tgagcatgga
3061 gaacctggc ctgtggatc tgggatgcca caactctgac ttccgcaaca gggcatgac
3121 tgccctgctc aaagtctcct cctgtgacaa gaacactggg gactactatg aggacagcta
3181 tgaggacatc totgctacc tgcctagcaa gaacaatgcc attgagcca ggagcttcag
3241 ccagaatcca cctgtcctga aacgccacca gagggagatc accaggacca cctccagtc
3301 tgaccaggag gagattgact atgatgacac catttctgtg gagatgaaga aagaggactt
3361 tgacatctat gaagaggacg agaaccagag cccaaggagc ttccagaaga agaccaggca
3421 ctacttcatt gctgctgtgg agcgccctgt ggactatggc atgagctcca gcccctatgt
3481 cctcaggaac agggcccagc ctggctctgt gccacagtc aagaaaagtg tcttccaaga
3541 gttcactgat ggcagcttca cccagccct gtacagaggg gagctgaatg agcacctggg
3601 actcctgggc ccatacatca gggctgaggt ggaggacaac atcatggtga ccttccgcaa
3661 ccaggcctcc agggcctaca gcttctacag ctccctcacc agctatgagg aggaccagag
3721 gcagggggct gagccacgca agaactttgt gaaacccaat gaaaccaaga cctacttctg
3781 gaaagtccag caccacatgg ccccaccaa gcatgagttt gactgcaagg cctgggccta
3841 cttctctgat gtggacctgg agaaggatgt gcaactctgg ctgattggcc cactcctggt
3901 ctgccacacc aacacctga acctgccc caagaggcaa gtgactgtgc aggagtttgc
3961 cctctcttcc accatctttg atgaaaccaa gagctggtac ttactgaga acatggagcg
4021 caactgcagg gcccctgca acattcagat ggaggacccc accttcaaa agaaactaccg
4081 cttccatgcc atcaatggct acatcatgga cacctgcct gggcttgtca tggcccagga
4141 ccagaggatc aggtgttacc tgccttctat gggctccaat gagaacattc actccatcca
4201 cttctctggg catgtcttca ctgtgcgcaa gaaggaggag tacaagatgg cctgtacaa
4261 cctctacctt ggggtctttg agactgtgga gatgctgccc tccaaagctg gcatctggag
4321 ggtggagtgc ctcatgggg agcacctgca tgctggcatg agcacctgt tctgggtcta
4381 cagcaacaag tgccagaccc cctgggaat ggctctgtgc cacatcaggg acttccagat
4441 cactgcctct ggccagtatg gccagtgggc cccaagctg gccaggctcc actactctgg
4501 atccatcaat gcctggagca ccaaggagcc attcagctgg atcaaagtgg acctgctggc
4561 ccccatgac atccatggca tcaagaccca gggggccagg cagaagttct ccagcctgta
4621 catcagccag ttcacatca tgtacagcct ggtggcaag aaatggcaga cctacagagg
4681 caactccact ggaacactca tggctctctt tggcaatgtg gacagctctg gcatcaagca
4741 caacatcttc aacccccaa tcatcgccag atacatcagg ctgcaccca ccaactacag
4801 catccgcagc acctcagga tggagctgat gggtgtgac ctgaactcct gcagcatgcc
4861 cctgggcatg gagagcaagg ccatttctga tgcccagatc actgcctcca gctacttcac
4921 caacatgttt gccacctgga gcccagcaa ggccaggctg cactccagg gaaggagcaa
4981 tgcctggagg cccaggtca acaacccaaa ggagtggctg caggtggact tccagaagac

```

Фиг. 7В

```

5041 catgaaggtc actgggggtga ccaccaggg ggccaagagc ctgctcacca gcatgtatgt
5101 gaaggagttc ctgatcagct ccagccagga tggccaccag tggacctct tcttcagaa
5161 tggcaaggtc aagggtgttc agggcaacca ggacagcttc acccctgtgg tgaacagct
5221 ggaccccccc ctctgacca gatacctgag gattcaccac cagagctggg tccaccagat
5281 tgccctgagg atggaggtcc tgggatgtga ggcccaggac ctgtactgat gacgagcggc
5341 cgctcttagt agcagtatcg ataataaaag atctttattt tcattagatc tgtgtgttgg
5401 ttttttgtgt gtttaattaag ctgcggaagg aaaccttagt gatggagtgt gccactccct
5461 ctctgcgcgc tcgctcgcctc actgaggccg ggcgaccaa ggctgcgccg cgcgcgggt
5521 ttgcccgggc ggccctcagt agcagagcag cgcgcagaga gggagtggcc aagacgattt
5581 aaatgacaag cttggcgtaa tcatggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc
5641 tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagt taagacctgg ggtgcctaatt
5701 gagtgaagta actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc
5761 tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc aaocgcgggg gagaggcggg ttgcgtattg
5821 ggcgctcttc cgcttctctg ctcaactgact cgctgcgcctc ggctgttcgg ctgcggcgag
5881 cgggtatcagc tcaactcaaag gcggtaatat ggttatccac agaactcagg gataacgcag
5941 gaaagaaatc gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag gccgcgttgc
6001 tggcggtttt ccataggctc cgccccctcg acgagcatca caaaaatcga cgtcaagtc
6061 agaggtggcg aaaccgcgac ggactataaa gataccaggc gtttccccct ggaagctccc
6121 tcgtgcgcctc tctgttctcg acctgcgcgc ttaccggata cctgtccgcc tttctccctt
6181 cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg gtgtaggctg
6241 ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gccgcaccgc tgcgccttat
6301 ccggttaacta tcgtcttgag tccaaccctg taagacacga ctatcgcca ctggcagcag
6361 ccactggtta caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag ttcctgaagt
6421 ggtggcctaa ctacgcctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcct ctgctgaagc
6481 cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaaacaaac accgctggta
6541 gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga tctcaagaag
6601 atcctttgat cttttctacg ggggtctgac ctacagtggaa cgaaaactca cgttaaggga
6661 ttttggctcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ccttttaaat taaaaatgaa
6721 gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac caatgcttaa
6781 tcagtgaggg acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt gctgactcc
6841 ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt gctgcaatga
6901 taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc aataaaccag ccagccggaa
6961 gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc catccagctc attaatgtt
7021 gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt gttgocattg
7081 ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc tccggttccc
7141 aacgatcaag gcgagttaca tgatccccc tgtgtgtcaa aaaagcgggt agctccttcg
7201 gtctccgat cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtggt atcactcatg gttatggcag
7261 cactgcataa ttctcttact gtcattgcat ccgtaagatg cttttctgtg actggtgagt
7321 actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgccgcgacc gagttgctct tgcggcggt
7381 caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc attggaaaac
7441 gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct tacgcctggt gagatccagt tccatgtaac
7501 ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt tctgggtgag
7561 caaaaacagg aaggcaaaat gcgcgaaaaa agggaaataa ggcgacacgg aaatgttgaa
7621 tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat tgtctcatga
7681 gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg cgcacatttc
7741 cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta acctataaaa
7801 ataggcgtat cccgagggcc tttcgtc (SEQ ID NO:8)

```

Фиг. 7С

CS04Δ(760-1667) - CS04-SC1-NA

ATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCTGCTGCTGAGGTTCTGCTTCTGCTGCCACCAGGAGATAC
 TACCTGGGGGCTGTGGAGCTTTCTTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCTGTGGATGCCAGG
 TTCCCACCCAGAGTGCCCAATCCTTCCCATTCACACCTCTGTGGTCTACAAGAAGACCCCTCTTTGTGGAG
 TTCACTGACCACCTGTTCAACATTGCCAAAACCCAGGCCACCCCTGGATGGGACTCCTGGGACCCACCATTACAG
 GCTGAGGTGTATGACACTGTGGTCATCACCCCTCAAGAACATGGCCCTCCACCCCTGTGAGCCTGCATGCTGTG
 GGGGTCAGCTACTGGAAGGCCCTCTGAGGGGGCTGAGTATGATGACCAGACCTCCACAGAGGAGAAGGAGGAT
 GACAAAGTGTTCCTGGGGGCAGCCACACCTATGTGTGGCAGGTCCTCAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTCT
 GACCCACTCTGCCTGACCTACTCCTACCTTTCTCATGTGGACCTGGTCAAGGACCTCAACTCTGGACTGATT
 GGGGCCCTGCTGGTGTGCAGGGAGGGCTCCCTGGCCAAAGAGAAGACCCAGACCCCTGCACAAGTTCATTCTC
 CTGTTTGCTGTCTTTGATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAATCCCTGATGCAGGACAGGGAT
 GCTGCCTCTGCCAGGGCTGGCCCAAGATGCACACTGTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGACTC
 ATTGGCTGCCACAGGAAATCTGTCTACTGGCATGTGATTGGCATGGGGACACCCCTGAGGTGCATCCATT
 TTCCTGGAGGGCCACACCTTCCTGGTCAGGAACCACAGACAGGCCAGCCTGGAGATCAGCCCCATCACCTTC
 CTCACTGCCCCAGACCCCTGCTGATGGACCTCGGACAGTTCTGCTGTCTGCCACATCAGCTCCACCCAGCAT
 GATGGCATGGAGGCCATGTCAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCACAGCTCAGGATGAAGAACAATGAG
 GAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGACTCTGAGATGGATGTGGTCCGCTTTGATGATGACAACAGC
 CCATCCTTCATTACAGATCAGGTCTGTGGCCAAGAAACACCCCAAGACCTGGGTGCATACATTGCTGCTGAG
 GAGGAGGACTGGGACTATGCCCCACTGGTCTGGCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTCAAC
 AATGGCCACAGAGGATTGGACGCAAGTACAAGAAAGTCAGGTTTCATGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAG
 ACCAGGGAGGCCATTCAGCATGAGTCTGGCATCCTGGGCCACTCCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCCTG
 CTCATCATCTTCAAGAACCAGGCCTCCAGGCCCTACAACATCTACCCACATGGCATCACTGATGTGAGGCC
 CTGTACAGCCCGAGGCTGCCAAAGGGGTGAACACCTCAAGGACTTCCCCATTCTGCCTGGGGAGATCTTC
 AAGTACAAGTGGACTGTCACTGTGGAGGATGGACCAACCAAATCTGACCCAGGTGCCTCACCAGATACTAC
 TCCAGCTTTTGTAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTGGCCCACTGCTCATCTGCTACAAGGAG
 TCTGTGGACCAGAGGGGAAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAATGTGATTCTGTTCTGTCTTTGATGAG
 AACAGGAGCTGGTACCTGACTGAGAACATTCAGCGCTTCCTGCCCAACCTGCTGGGGTGCAGCTGGAGGAC
 CCTGAGTTCCAGGCCAGCAACATCATGCACTCCATCAATGGCTATGTGTTTGACAGCCTCCAGCTTTCTGTC
 TGCCTGCATGAGGTGGCCTACTGGTACATTCCTTTCTATTGGGGCCAGACTGACTTCCTTTCTGTCTTCTTC
 TCTGGCTACACCTTCAAACACAAGATGGTGTATGAGGACACCCCTGACCCCTCTTCCCATTCCTGTTGGGAGACT
 GTGTTTCATGAGCATGGAGAACCCTGGCCTGTGGATTCTGGGATGCCACAACCTTGACTTCCGCAACAGGGGC
 ATGACTGCCCTGCTCAAAGTCTCCTCCTGTGACAAGAACACTGGGGACTACTATGAGGACAGCTATGAGGAC
 ATCTCTGCCTACCTGCTCAGCAAGAACAATGCCATTGAGCCAGGGAGATCACCAGGACCACCCCTCCAGTCT
 GACCAGGAGGAGATTGACTATGATGACACCATTTCTGTGGAGATGAAGAAAGAGGACTTTGACATCTATGAC
 GAGGACGAGAAACCAGAGCCCAAGGAGCTTCCAGAAGAAGACCAGGCACTACTTCATTGCTGCTGTGGAGCGC
 CTGTGGGACTATGGCATGAGCTCCAGCCCCCATGTCTCAGGAACAGGGCCCACTGTGGCTCTGTGCCACAG
 TTCAAGAAAGTGGTCTTCCAAGAGTTCACTGATGCCAGCTTCACCCAGCCCTGTACAGAGGGGAGCTGAAT
 GAGCACCTGGGACTCCTGGGCCATACATCAGGGCTGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCCGCAAC
 CAGGCCCTCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCTCCCTCATCAGCTATGAGGAGGACCAGAGGCAGGGGGCTGAG
 CCACGCAAGAAGTTTGTGAACCCAATGAAACCAAGACCTACTTCTGGAAAGTCCAGCACCACATGGCCCCC

(Продолжение)

Фиг. 8А

ACCAAGGATGAGTTTGACTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCTCTGATGTGGACCTGGAGAAGGATGTGCACTCT
GGCCTGATTGGCCCACTCCTGGTCTGCCACACCAACACCTGAACCTGCCCATGGAAGGCAAGTGACTGTG
CAGGAGTTTGCCCTCTCTTCACCATCTTTGATGAAACCAAGAGCTGGTACTTCACTGAGAACATGGAGCGC
AACTGCAGGGCCCCATGCAACATTCAGATGGAGGACCCACCTTCAAAGAGAACTACCGCTTCCATGCCATC
AATGGCTACATCATGGACACCTGCCTGGGCTTGTCTATGGCCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTT
TCTATGGGCTCCAATGAGAACATTCCTCCATCCACTTCTCTGGGCATGTCTTCACTGTGCCGAAGAAGGAG
GAGTACAAGATGGCCCTGTACAACCTCTACCCTGGGGTCTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCCTCCAAAGCT
GGCATCTGGAGGGTGGAGTGCCTCATTTGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAGCACCTGTTCTCTGGTCTAC
AGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGAATGGCCTCTGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGC
CAGTATGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGGCTCCACTACTCTGGATCCATCAATGCCTGGAGCACCAAG
GAGCCATTTCAGCTGGATCAAAGTGGACCTGCTGGCCCCCATGATCATCCATGGCATCAAGACCAGGGGGCC
AGGCAGAAGTTCTCCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGATGGCAAGAAATGGCAG
ACCTACAGAGGCAACTCCACTGGAACACTCATGGTCTTCTTTGGCAATGTGGACAGCTCTGGCATCAAGCAC
AACATCTTCAACCCCCAATCATCGCCAGATACATCAGGCTGCACCCACCCACTACAGCATCCGAGCAACC
CTCAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGAACCTGAACCTCTGCAGCATGCCCTGGGCATGGAGAGCAAGGCCATT
TCTGATGCCCAGATCACTGCCTCCAGCTACTTCAACCAACATGTTTGGCACCTGGAGCCCAAGCAAGGCCAGG
CTGCACCTCCAGGGAAGGAGCAATGCCTGGAGGCCCCAGGTCAACAACCCAAAGGAGTGGCTGCAGGTGGAC
TTCCAGAAGACCATGAAGGTCACTGGGGTGACCAACCCAGGGGGTCAAGAGCCTGCTCACCAGCATGTATGTG
AAGGAGTTCTGATCAGCTCCAGCCAGGATGGCCACCAGTGGACCTCTTCTTCCAGAATGGCAAGGTCAAG
GTGTTCCAGGGCAACCAGGACAGCTTCACCCCTGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCTCCTGACCAGATAC
CTGAGGATTCACCCCCAGAGCTGGGTCCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTCCTGGGATGTGAGGCCAG
GACCTGTACTGA (SEQ ID NO:9)

Фиг. 8В

CS04Δ(760-1667) - CS04-SC1-AA

MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELFVDARFPPRPVPSFPFNTSVVYKK
 TLFVEFTDHLFNIAPRPPWMGLLGPTIQAEVYDVTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYD
 DQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREG
 SLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCH
 RKSVMYWHVIGMGTTPFVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITELTAQTLMDLGQFLFCHISSHQ
 HDGMEAYVKVDSCPPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWV
 HYIAAEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILG
 PLLYGEVGDITLLIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTV
 EDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRS
 WYLTENIQRFLEPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSV
 FFSGYTFFKHKMVEYEDTLTLPFSGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDY
 YEDSYEDISAYLLSKNNAIEPREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQK
 KTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNRAQSGSVPOFKKVVEQFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLG
 PYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLSYEEDQRQGAEPKRNFKVPNETKTYFWKVQHMAPTK
 DEFDCAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIIDETKSWYFTEN
 MERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGH
 VFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMA
 SGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAFMIHGIKTQGARQKFSS
 LYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIENPPIIARYIRLHPTHYSIRSTL
 RMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEW
 LQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVVFQGNQDSFTPVVNS
 LDPPLLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY (SEQ ID NO:10)

Фиг. 9

CS04Δ(772-1667) - CS04-SC2-NA

ATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCCCTGTGCCTGCTGAGGTTCTGCTTCTCTGCCACCAGG
 AGATACTACCTGGGGGCTGTGGAGCTTTCTTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGGGAGCTGCCT
 GTGGATGCCAGGTTCCCACCCAGAGTGCCCAAATCCTTCCCATTCAACACCTCTGTGGTCTACAAG
 AAGACCCCTCTTTGTGGAGTTCAGTACCACCTGTTCAACATTGCCAAACCCAGGCCACCCCTGGATG
 GGAATCCTGGGACCCACCATTCAAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTCAATCACCCCTCAAGAACATG
 GCCTCCCACCCCTGTGAGCCTGCATGCTGTGGGGGTGAGCTACTGGAAGGCCTCTGAGGGGGCTGAG
 TATGATGACCAGACCTCCCAGAGGGAGAAGGAGGATGACAAAGTGTTCCCTGGGGGCAGGCCACACC
 TATGTGTGGCAGGTCCTCAAGGAGAATGGCCCCATGGCCTCTGACCCACTCTGCCTGACCTACTCC
 TACCTTTCTCATGTGGACCTGGTCAAGGACCTCAACTCTGGACTGATTGGGGCCCTGCTGGTGTGC
 AGGGAGGGCTCCCTGGCCAAAGAGAAGACCCAGACCCCTGCACAAGTTCAATCTCCTGTTTGTGTG
 TTTGATGAGGGCAAGAGCTGGCACTCTGAAACCAAGAATCCCTGATGCAGGACAGGGATGCTGCC
 TCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCACACTGTGAATGGCTATGTGAACAGGAGCCTGCCTGGACTC
 ATTGGCTGCCACAGGAAATCTGTCTACTGGCATGTGATTGGCATGGGGACAACCCCTGAGGTGCAC
 TCCATTTTCTGGAGGGCCACACCTTCCTGGTCAAGAACACAGACAGGCCAGCCTGGAGATCAGC
 CCCATCACCTTCCTCACTGCCCAGACCCCTGCTGATGGACCTCGGACAGTTCCCTGCTGTTCTGCCAC
 ATCAGCTCCCACAGCATGATGGCATGGAGGCCTATGTCAAGGTGGACAGCTGCCCTGAGGAGCCA
 CAGCTCAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGACTCTGAGATG
 GATGTGGTCCGCTTTGATGATGACAACAGCCCATCCTTCATTCAGATCAGGTCTGTGGCCAAAGAAA
 CACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATTGCTGCTGAGGAGGAGGACTGGGACTATGCCCCACTGGTC
 CTGGCCCCCTGATGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTCAACAATGGCCACAGAGGATFGGACGC
 AAGTACAAGAAAGTCAGGTTTCATGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAGACCAGGGAGGCCATTAG
 CATGAGTCTGGCATCCTGGGCCACTCCTGTATGGGGAGGTGGGGGACACCCCTGCTCATCATCTTC
 AAGAACCAGGCCTCCAGGCCCTACAACATCTACCCACATGGCATCACTGATGTGAGGCCCTGTAC
 AGCCGCAGGCTGCCAAAGGGGTGAAACACCTCAAGGACTTCCCCATTCTGCCTGGGGAGATCTTC
 AAGTACAAGTGGACTGTCACTGTGGAGGATGGACCAACCAAACTGACCCCAGGTGCCTCACCAGA
 TACTACTCCAGCTTTGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATTGGCCACTGCTCATC
 TGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGGGGAAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAATGTGATTCTG
 TTCTCTGTCTTTGATGAGAACAGGAGCTGGTACCTGACTGAGAACATTCAGCGCTTCCTGCCCCAAC
 CCTGCTGGGGTGCAGCTGGAGGACCCCTGAGTTCCAGGCCAGCAACATCATGCACTCCATCAATGGC
 TATGTGTTTGACAGCCTCCAGCTTTCTGTCTGCCTGCATGAGGTGGCCTACTGGTACATTCTTTCT
 ATTGGGGCCCAGACTGACTTCCTTTCTGTCTTCTTCTCTGGCTACACCTTCAAACACAAGATGGTG
 TATGAGGACACCCCTGACCTCTTCCCATTCTCTGGGGAGACTGTGTTTCATGAGCATGGAGAACCCCT
 GGCCTGTGGATTCTGGGATGCCACAACCTGACTTCCGCAACAGGGGCATGACTGCCCTGCTCAAA
 GTCTCCTCCTGTGACAAGAACAATGCCATTGAGCCAGGAGCTTCAGCCAGAATCCAGACACCCAGCACC
 AGGGAGATCACCAGGACCACCCTCCAGTCTGACCAGGAGGAGATTGACTATGATGACACCATTTCT
 GTGGAGATGAAGAAAGAGGACTTTGACATCTATGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCAAGGAGCTTC

(Продолжение)

Фиг. 10А

CAGAAGAAGACCAGGCCTACTTCATTGCTGCTGTGGAGCGCCTGTGGGACTATGGCATGAGCTCC
AGCCCCCATGTCTCAGGAACAGGGCCCAGTCTGGCTCTGTGCCACAGTTCAAGAAAGTGGTCTTC
CAAGAGTTCACTGATGGCAGCTTCACCCAGCCCCCTGTACAGAGGGGAGCTGAATGAGCACCTGGGA
CTCCTGGGCCCATAACATCAGGGCTGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCCGCAACCAGGCC
TCCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCTCCCTCATCAGCTATGAGGAGGACCAGAGGCAGGGGGCTGAG
CCACGCAAGAACTTTGTGAAACCAATGAAACCAAGACCTACTTCTGGAAAGTCCAGCACCATG
GCCCCACCAAGGATGAGTTTGAAGGCTGCAAGGCTGGGCTACTTCTCTGATGTGGACCTGGAGAAG
GATGTGCACTCTGGCCTGATTGGCCCACTCCTGGTCTGCCACACCAACACCTGAACCTGCCCCAT
GGAAGGCAAGTGACTGTGCAGGAGTTTGGCCTCTTCTTCACCATCTTTGATGAAACCAAGAGCTGG
TACTTCACTGAGAACATGGAGCGCAACTGCAGGGCCCCATGCAACATTCAGATGGAGGACCCACCC
TTCAAAGAGAACTACCGCTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCCCTGCCTGGGCTTGTCT
ATGGCCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTACCTGCTTTCTATGGGCTCCAATGAGAACATTCACCTCC
ATCCACTTCTCTGGGCATGTCTTCACTGTGCGCAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTGTACAAC
CTCTACCCCTGGGGTCTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCCTCCAAAGCTGGCATCTGGAGGTGGAG
TGCCTCATTTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGAGCACCTGTTCTCTGGTCTACAGCAACAAGTGC
CAGACCCCCCTGGGAATGGCCTCTGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGCCAGTAT
GGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGGCTCCACTACTCTGGATCCATCAATGCCTGGAGCACCAAG
GAGCCATTCAGCTGGATCAAAGTGGACCTGCTGGCCCCCATGATCATCCATGGCATCAAGACCCAG
GGGGCCAGGCAGAAAGTTCTCCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGATGGC
AAGAAATGGCAGACCTACAGAGGCAACTCCACTGGAACACTCATGGTCTTCTTTGGCAATGTGGAC
AGCTCTGGCATCAAGCACAAACATCTTCAACCCCCCAATCATCGCCAGATACATCAGGCTGCACCCC
ACCCACTACAGCATCCGCAGCACCTCAGGATGGAGCTGATGGGCTGTGACCTGAACTCCTGCAGC
ATGCCCCCTGGGCATGGAGAGCAAGGCCATTTCTGATGCCCAGATCACTGCCTCCAGCTACTTCACC
AACATGTTTGCCACCTGGAGCCCAAGCAAGGCCAGGCTGCACCTCCAGGGAAGGAGCAATGCCTGG
AGGCCCCAGGTCAACAACCCAAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAGACCATGAAGGTCACT
GGGGTGACCACCCAGGGGGTCAAGAGCCTGCTCACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCTTGATCAGC
TCCAGCCAGGATGGCCACCAGTGGACCCCTCTTCTTCCAGAATGGCAAGGTCAAGGTGTTCCAGGGC
AACCAGGACAGCTTCACCCCTGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCTCCTGACCAGATACCTGAGG
ATTCAACCCCCAGAGCTGGGTCCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTCTTGGGATGTGAGGCCACG
GACCTGTACTGA (SEQ ID NO:11)

Фиг. 10В

CS04Δ(772-1667) - CS04-SC2-AA

MQIELSTCFFLCLLRFCFSATTRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKK
 TLFVEFTDHLFNIAPRPPWMGLLGPTIQAEVYDVTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYD
 DQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREG
 SLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCH
 RKSVYVHVIGMGTTEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQ
 HDGMEAYVKVDSCEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTVV
 HYIAAEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFTKREAIQHESGILG
 PLLYGEVGDILLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTV
 EDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRS
 WYLTENIQRFLEPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSV
 FFSGYTFKHKMVEYEDTLTLFFFSGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDY
 YEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSRHPSTREITRTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYD
 EDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNRAQSGSVFPQFKKVVFQEFDTGSGFTQPLY
 RGELNEHLGGLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLSYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKTY
 FWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFTI
 FDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRIRWYLLSMGS
 NENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV
 YSNKCQTPLCMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI IHG
 IKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPPIIARYIR
 LHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSN
 AWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVVFQ
 GNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY (SEQ ID NO:12)

Фиг. 11

CS01-FL-NA

ATGCAGATTGAGCTGTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTGCTGAGATTCTGCTTCTCTGCCACCAGG
 AGATACTACCTGGGGGCTGTGGAACCTTTCTTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGAGAGCTGCCT
 GTGGATGCCAGGTTCCACCCAGAGTGCCTCAAGTCTTCCCATTTCAACACCTCTGTGGTCTACAAG
 AAGACACTCTTTGTGGAATTCAGTACCCAGCTGTTCAACATTGCAAAACCCAGACCACCTGGATG
 GGACTCCTGGGACCCACCATTCAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTCATCACCTCAAGAACATG
 GCATCCACCCCTGTGTCTCTGCATGCTGTGGGAGTCTCATACTGGAAAGCCTCTGAAGGGGCTGAG
 TATGATGACCAGACATCCCAGAGAGAGAAAGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGGATCTCACACC
 TATGTGTGGCAAGTCTCAAGGAGAATGGACCCATGGCATCTGACCCACTCTGCCTGACATACTCC
 TACCTTTCTCATGTGGACCTGGTCAAGGACCTCAACTCTGGACTGATTGGGGCACTGCTGGTGTGC
 AGGGAAGGATCCCTGGCCAAGGAGAAAACCCAGACACTGCACAAGTTTCTTCTCTGTTTGTGTCTC
 TTTGATGAGGGCAAGTCTTGGCACTCTGAAACAAAGAAGTCCCTGATGCAAGACAGGGATGCTGCC
 TCTGCCAGGGCATGGCCCAAGATGCACACTGTGAATGGCTATGTGAACAGATCACTGCCTGGACTC
 ATTGGCTGCCACAGGAATCTGTCTACTGGCATGTGATTGGCATGGGGACAACCCCTGAAGTGCAC
 TCCATTTTCTGGAGGGACACACCTTCTGGTCAGGAACACAGACAAGCCTCTCTGGAGATCTCT
 CCCATCACCTTCTCTACTGCACAGACACTGCTGATGGACCTTGGACAGTCTCTGCTGTTCTGCCAC
 ATCTCTTCCACACAGCATGATGGCATGGAAGCCTATGTCAAGGTGGACTCATGCCCTGAGGAACCA
 CAGCTCAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGACTCTGAGATG
 GATGTGGTCAGATTTGATGATGACAACCTCTCCATCCTTCATTGATCAGGTCTGTGGCAAGAAA
 CACCCCAAGACATGGGTGCACTACATTGCTGCTGAGGAAGAGGACTGGGACTATGCACCACTGGTC
 CTGGCCCCCTGATGACAGGAGCTACAAGTCTCAGTACCTCAACAATGGCCCCACAAAGAATTGGAAGA
 AAGTACAAGAAAGTCAGATTGATGGCTACACTGATGAAACCTTCAAGACAAGAGAAGCCATTGAG
 CATGAGTCTGGCATTCTGGGACCACTCCTGTATGGGGAAGTGGGAGACACCCCTGCTCATCATCTTC
 AAGAACCAGGCCCTCCAGGCCCTACAACATCTACCCACATGGCATCACTGATGTCAGGCCCTGTAC
 AGCAGGAGACTGCCAAAAGGGGTGAAACACCTCAAGGACTTCCCCATTCTGCCTGGAGAGATCTTC
 AAGTACAAGTGGACTGTCACTGTGGAGGATGGACCAACAAAGTCTGACCCAGGTGCCTCACCAGA
 TACTACTCCTCTTTTGTGAACATGGAGAGAGACCTGGCATCTGGACTGATTGGACCACTGCTCATC
 TGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGAGGCAACCAGATCATGTCTGACAAGAGAAATGTGATTCTG
 TTCTCTGTCTTTGATGAGAACAGATCATGGTACCTGACTGAGAACATTGAGAGATTCCTGCCCAAC
 CCTGTCTGGGGTGCAACTGGAAGACCCCTGAGTTCCAGGCAAGCAACATCATGCACTCCATCAATGGC
 TATGTGTTTGAATCTCTCCAGCTTTCTGTCTGCCTGCATGAGGTGGCCTACTGGTACATTCTTTCT
 ATTGGGGCACAACTGACTTCCTTTCTGTCTTCTTCTCTGGATACACCTTCAAGCACAAAGTGGTG
 TATGAGGACACCCCTGACACTCTTCCCATCTCTGGGGAACTGTGTTTATGAGCATGGAGAACCCT
 GGACTGTGGATTCTGGGATGCCACAACCTGACTTCAGAAACAGGGGAATGACTGCACTGCTCAA
 GTCTCCTCCTGTGACAAGAACACTGGGGACTACTATGAGGACTCTTATGAGGACATCTCTGCCTAC
 CTGCTCAGCAAGAACAATGCCATTGAGCCCAAGAGCTTCTCTCAGAATCCACCTGTCTGAAGAGA
 CACCAGAGAGAGATCACCAGGACAACCCCTCCAGTCTGACCAGGAAGAGATTGACTATGATGACACC
 ATTTCTGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTTGACATCTATGATGAGGACGAGAACCAGTCTCCAAGA
 TCATTCAGAGAAGAAGACAAGACACTACTTCATTGCTGCTGTGGAAAGACTGTGGGACTATGGCATG
 TCTTCCCTCTCCCATGTCTCAGGAACAGGGCACAGTCTGGCTCTGTGCCACAGTTCAAGAAAGTG
 GTCTTCCAGGAGTTCACTGATGGCTCATTCACCCAGCCCTGTACAGAGGGGAAGTGAATGAGCAC

(Продолжение)

Фиг. 12А

CTGGGACTCCTGGGACCATACATCAGGGCTGAGGTGGAAGACAACATCATGGTGACATTCAGAAAC
CAGGCCCTCCAGGCCCTACAGCTTCTACTCTTCCCTCATCAGCTATGAGGAAGACCAGAGACAAGGG
GCTGAGCCAAGAAAGAACTTTGTGAAACCCAATGAAACCAAGACCTACTTCTGGAAAGTCCAGCAC
CACATGGCACCCACCAAGGATGAGTTTGA CTGCAAGGCCTGGGCATACTTCTCTGATGTGGACCTG
GAGAAAGATGTGCACTCTGGCCTGATTGGCCCACTCCTGGTCTGCCACACCAACACCCCTGAACCCCT
GCACATGGAAGGCAAGTGACTGTGCAGGAGTTTGGCCCTTCTTTCACCATCTTTGATGAAACCAAG
TCATGGTACTTCACTGAGAACATGGAGAGAACTGCAGAGCACCATGCAACATTAGATGGAAGAC
CCCACCTTCAAGGAGAACTACAGGTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCCCTGCCTGGG
CTTGTCATGGCACAGGACCAGAGAATCAGATGGTACCTGCTTTCTATGGGATCCAATGAGAACATT
CACTCCATCCACTTCTCTGGGCATGTCTTCACTGTGAGAAAGAAGGAGGAATACAAGATGGCCCTG
TACAACCTCTACCCCTGGGGTCTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCCTCCAAAGCTGGCATCTGGAGG
GTGGAATGCCTCATTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGTCAACCCCTGTTCTCTGGTCTACAGCAAC
AAGTGCCAGACACCCCTGGGAATGGCCTCTGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGC
CAGTATGGCCAGTGGGCACCCAAACTGGCCAGGCTCCACTACTCTGGCTCCATCAATGCATGGTCA
ACCAAGGAGCCATTCTCTTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCACCCATGATCATTCATGGCATCAAG
ACACAGGGGGCAAGACAGAAATTCTCCTCTCTGTACATCTCACAGTTCATCATCATGTACTCTCTG
GATGGCAAGAAGTGGCAGACATACAGAGGCAACTCCACTGGCACCCCTCATGGTCTTCTTTGGCAAT
GTGGACAGCTCTGGCATCAAGCACACATCTTCAACCCCTCCCATCATTGCCAGATACATCAGGCTG
CACCCACCCCACTACTCAATCAGATCAACCCCTCAGGATGGAAGTATGGGATGTGACCTGAACTCC
TGCTCAATGCCCCTGGGAATGGAGAGCAAGGCCATTTCTGATGCCCAGATCACTGCATCCTCTTAC
TTCACCAACATGTTTGGCACCTGGTCACCATCAAAAGCCAGGCTGCACCTCCAGGGAAGAAGCAAT
GCCTGGAGACCCAGGTCAACAACCCAAAGGAATGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGACAATGAAA
GTCACTGGGGTGACAACCCAGGGGGTCAAGTCTCTGCTCAOCTCAATGTATGTGAAGGAGTTCCTG
ATCTCTTCCTCACAGGATGGCCACCACTGGACACTCTTCTTCCAGAATGGCAAAGTCAAGGTGTTT
CAGGGCAACCAGGACTCTTTCACACCTGTGGTGAACCTCACTGGACCCCCCCTCCTGACAAGATAC
CTGAGAATTCACCCCACTCTTGGGTCCACCAGATTGCCCTGAGAATGGAAGTCTTGGGATGTGAG
GCACAAGACCTGTACTGA (SEQ ID NO:13)

Фиг. 12В

CS08-FL-NA

ATGCAGATCGAACTGAGCACTTGCTTCTCCTGTGTCTCCTGCGCTTTTGCTTCTCCGCCACAAGG
 AGATACTATCTCGGTGCCGTGGAGCTCAGCTGGGACTACATGCAGAGCGACTTGGGTGAACTGCCT
 GTGGACGCCAGGTTTCCACCCCGCGTGCCCAAGAGTTTCCCGTTCAACACCACTGTCGTGTACAAG
 AAAACCTCTTTCGTGGAATTCACCGACCACCTGTTCAACATCGCCAAACCGCGCCCTCCCTGGATG
 GGGCTGCTCGGCCCGACGATCCAGGCTGAGGTCTATGACACGGTGGTGATTACCCCTCAAGAACATG
 GCTAGCCACCCGGTGAGCTGCACGCCGTGGGCGTGCTTATTGGAAGCGTCCGAGGGTGCGGAG
 TACGATGACCAGACTTCACAGCGGGAGAAGGAAGACGACAAAGTGTCCCCGGGGGTTCACACACC
 TATGTCTGGCAGGTCCCTGAAGGAGAATGGTCCCTATGGCTCCGACCCATTGTGCCTCACCTACTCT
 TACCTAAGCCATGTGGATCTCGTCAAGGACCTGAACCTCGGGGCTGATCGGCGCCCTGCTCGTGTGC
 CGGGAGGGCTCACTGGCCAAGGAGAAGACCCAAACTCTGCACAAGTTCATCCTGCTGTTTCGCGGTA
 TTCGACGAGGGGAAGTCCCTGGCACTCCGAGACCAAGAACAGCCTGATGCAGGACCGCGACGCGACC
 TCGGCCCGTGCGTGGCCAAAGATGCACACCGTGAACGGCTACGTTAACAGGAGCCTACCCGGCCTG
 ATCGGCTGCCACCGCAAATCGGTCTACTGGCATGTGATCGGAATGGGCACAACGCCCGAGGTCCAC
 AGTATCTTCCTCGAGGGCCACACTTTCCCTGGTCCGGAATCACCGCCAGGCCAGCCTGGAGATCAGC
 CCCATAACCTTTCTGACGGCGCAGACCTTACTCATGGATCTCGGCCAGTTCCTCCTGTTCTGCCAC
 ATTTCTGCCACACGACGATGGGATGGAAGCATATGTGAAAGTGGACTCCTGCCCCGAGGAACCC
 CAGCTTAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCCGAGGACTACGACGATGACCTTACCGATTAGAAATG
 GACGTAGTACGCTTTGACGACGACAACCTCTCCATCCTTCATACAGATTGCTCCGTCCGCGCAAGAAG
 CACCCTAAGACTTGGGTGCACTACATCGCGGCCGAGGAGGAGGACTGGGATTATGCTCCCTGGTG
 CTGGCCCCCGACGACCGCAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAATAACGGGCCCCAGCGCATCGGCCGG
 AAGTACAAGAAAGTGGGTTTCATGGCTTACACGGACGAGACCTTCAAGACCCGGGAGGCTATCCAG
 CATGAGAGCGGCATCTTGGGGCCCTCCTGTACGGCGAAGTTGGAGACACACTGCTGATCATCTTC
 AAGAACCAGGCGAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCCACGGCATTACCGATGTCCGGCCGTGTGAC
 AGCCGACGGCTGCCCAAGGGCGTGAAGCACCTGAAGGACTTTCCGATCCTGCCGGGCGAGATCTTC
 AAGTACAAGTGGACTGTGACCGTGGAGGATGGGCCGACCAAGAGCGATCCGCGCTGCCTGACCCGT
 TACTACTCCAGCTTTGTCAATATGGAGCGCGACCTCGCTAGCGGCTTGATTGGCCCTCTGCTGATC
 TGCTACAAGGAGTCCGTGGACCAAGAGGGGAATCAGATCATGAGTGACAAGAGGAACGTGATCCTG
 TTCTCCGTGTTGACGAAAACCGCAGCTGGTATCTCACCAGAGAATATCCAGCGCTTCTGCCCAAC
 CCGGCCGTGTGACGCTGGAGGACCCCGAGTTTCAGGCCAGCAACATCATGCATTCTATCAACGGA
 TATGTGTTTGATTCCCTGCAGCTCTCAGTGTGTCTGCACGAGGTCGCCTACTGGTATATCCTCAGC
 ATTGGGGCACAGACCGACTTCCTGAGCGTGTCTTCTCCGGGTATACCTTCAAGCACAGATGGTG
 TACGAGGATACCCTGACCTGTTCCCTTTAGCGGCGAAACCGTGTATTATGTCTATGGAGAACCC
 GGGCTCTGGATCCTTGGCTGCCATAACTCCGACTTCGCAACCGCGGAATGACCGCGCTCCTGAAA
 GTGTGAGTTGTGACAAGAACACCGCGACTATTACGAGGACAGTTACGAGGACATCTCTGCGTAC
 CTCTTAGCAAGAATAACGCCATCGAGCCAAGATCCTTCAGCCAGAACCCCCAGTGTGAAGAGG
 CATCAGCGGGAGATCACCGCACGACCTGCAGTCGGATCAGGAGGAGATTGATTACGACGACAG
 ATCAGTGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTCGACATCTACGACGAAGATGAAAACAGTCCCTCGG
 TCCTTCCAAAAGAAGACCCGGCACTACTTCATCGCCGCTGTGGAACGCCTGTGGGACTATGGAATG

(Продолжение)

Фиг. 13А

TCTTCTAGCCCTCACGTTTTGAGGAACCGCGCCAGTCGGGCAGCGTGCCCCAGTTCAAGAAAAGTG
 GTGTTCCAGGAGTTCACCGACGGCTCCTTCACCCAGCCACTTTACCGGGGCGAGCTCAATGAACAT
 CTGGGCCTGCTGGGACCCCTACATCAGGGCTGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACATTCCGGAAT
 CAGGCCAGCAGACCATAACAGTTTCTACAGTTCACTCATCTCCTACGAGGAGGACCAGCGCCAGGGG
 GCTGAACCCCGTAAGAACTTCGTGAAGCCAAACGAAACAAAGACCTACTTCTGGGAAGGTCCAGCAC
 CACATGGCACCTACCAAGGACGAGTTCGATTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCTCCGACGTGGACCTG
 GAGAAAAGATGTGCACAGCGCCCTGATTGGCCCTCTGCTGGTGTGTACACGAACACACTCAACCCCT
 GCACACGGGGCGGAGGTCACTGTGCAGGAATTCGCCCTGTTCTTTACCATCTTTGATGAGACGAAG
 TCCTGGTATTTACCCGAAAACATGGAGAGGAAGTCCCGCGCACCCCTGCAACATCCAGATGGAAGAT
 CCGACATTCAAGGAGAACTACCGGTTCCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCCCTGCCTGGC
 CTCGTGATGGCCCAAGACCAGCGTATCCGCTGGTATCTGCTGTGCGATGGGCTCCAACGAGAACATC
 CATAGTATCCACTTCAGCGGGCATGTCTTCACGGTGAGGAAAAAGGAGGAGTACAAGATGGCACTG
 TACAACCTCTATCCCGGCGTGTTCGAGACCGTGAGATGCTGCCCTCCAAGGCCGGCATCTGGAGA
 GTGGAATGCCTGATCGGCGAGCACCTCCACGCTGGGATGTCCACGCTGTTCTCTCGTTTACAGCAAT
 AAGTGCCAGACCCCTCTGGGCATGGCGAGCGGCCACATCCGCGACTTCCAGATTACAGCCAGCGGC
 CAGTACGGTCAGTGGGCTCCAAAGCTGGCCCGTCTGCACTACTCCGGATCCATCAACGCCTGGTCC
 ACCAAGGAACCGTTCTCCTGGATCAAAGTAGACCTGCTAGCCCCCATGATCATTCACGGCATCAAG
 ACACAAGGCGCCCGACAGAAGTTCTCGAGCCTCTATATCTCCAGTTTCATCATCATGTATAGCCTG
 GACGGAAAGAAGTGGCAGACTTACCGCGGAAACTCGACAGGGACCCTGATGGTATCTTCGGTAAC
 GTGGACAGCTCCGGAATCAAGCACAAACATCTTCAACCCACCCATTATCGCCCCGTACATCCGCCTG
 CACCCCACTCACTATAGCATTAGGTCCACCCTGCGAATGGAGCTCATGGGCTGTGACCTGAACAGC
 TGTAGCATGCCCCTCGGCATGGAGTCTAAGGCGATCTCCGACGCACAGATAACGGCATCATCTAC
 TTTACCAACATGTTGCTACCTGGTCCCCCTCCAAGGCCGACTCCACCTGCAAGGGAGATCCAAC
 GCCTGGCGGCCACAGGTCAACAATCCCAAGGAGTGGCTGCAAGTGGAATTTTCAGAAAACATATGAAA
 GTCAACGGAGTGACCACACAGGGAGTGAAGTCTCTGCTGACCAGCATGTACGTGAAGGAGTTCTTC
 ATCTCCAGTTCGCAGGATGGCCACCAGTGGACGTTGTTCTTCCAAAACGGTAAAGTCAAAGTCTTC
 CAAGGGAACAGGACAGCTTTACACCCGTCGTGAAGTCCCTGGACCCCCCGCTTCTCACTAGATAC
 CTCCGCATCCACCTCAGAGCTGGGTGCACCAGATTGCCCTGCGCATGGAGGTTCTGGGGTGTGAA
 GCCCAGGACCTGTACTAA (SEQ ID NO:14)

Фиг. 13В

CS10-FL-NA

ATGCAGATTGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTCTGCCTTCTTCGCTTCTGCTTTTCTGCCACACGC
 AGGTACTATTTGGGAGCAGTGGAACTGAGCTGGGATTACATGCAGAGTGACCTTGGTGAACCTTCCT
 GTGGACGCTCGTTTTTCCACCTAGAGTTCCCAAGTCCCTTCCCTTCAACACCTCAGTGGTCTACAAG
 AAAACGCTGTTTTGTGGAGTTCACTGACCACCTCTTCAACATTGCCAAACCAAGACCCCCCTTGGATG
 GGATTGCTGGGACCCACAATAACAAGCAGAAGTCTACGACACGGTGGTGATTACCCTGAAGAACATG
 GCGTCACACCCTGTTTCACTTCACGCTGTTGGGGTCAGTTATTGGAAAGCCTCAGAGGGTGCAGAA
 TACGATGATCAAACCAGCCAGAGGGAGAAGGAAGATGACAAGGTCTTTCCCTGGGGGTAGCCATACC
 TATGTTTTGGCAGGTGCTGAAAGAGAATGGGCCCTATGGCCTCTGATCCCTTGTGCCTCACATACTCT
 TACCTGAGTCACGTCGACCTGGTGAAAGACCTGAATAGCGGTCTGATTGGTGCAGTGCCTTGTGTGT
 AGAGAGGGGAGTTTGGCCAAGGAGAAAACCTCAGACTCTCCACAAGTTTATCCTCCTGTTTGCTGTG
 TTCGACGAGGGCAAGTCTTGGCACTCTGAAACAAAGAAGTCCCTGATGCAGGACAGAGATGCTGCA
 TCTGCAAGGGCTTGGCCAAAAATGCACACAGTGAACGGCTATGTGAATCGATCACTGCCAGGACTG
 ATAGGCTGTCATCGCAAGTCAGTGTATTGGCACGTTATCGGGATGGGAACAACCTCCAGAAGTGCAC
 AGCATCTTCCTTGAGGGCCACACTTTCCCTGGTTTCGGAATCATAGACAGGCCAGCCTTGAGATCAGC
 CCAATCACCTTTCTGACTGCCCAAACCTTGCTGATGGATCTGGGACAGTTCCTCCTGTTTTGTCAAC
 ATCTCCTCCCAACATGACGGGATGGAGGCTTATGTGAAGGTCGATAGCTGTCCGGAGGAACCA
 CAACCTGAGGATGAAGAACAACGAAGAGGCAGAGGACTATGACGACGATCTGACTGACAGTGAATG
 GACGTGGTTTCGGTTCGACGATGACAATTCTCCTTCATTATCCAGATCCGTTCCGTGGCCAAGAAG
 CACCCCAAGACTTGGGTTTCATTACATCGCTGCTGAGGAGGAGGATTGGGACTACGCGCCCTTGGTG
 TTGGCCCCAGACGATCGCTCATAACAAGAGCCAGTACCTTAACAATGGTCCACAAAGGATCGGCCGG
 AAGTACAAGAAGGTTAGATTTATGGCTTATACCGACGAGACTTTTAAACTAGGGAAGCAATTCAG
 CATGAAAGTGGCATTCTTGGACCCCTGCTGTATGGCGAGGTTGGCGACACCCCTGCTGATTATCTTT
 AAGAACCAGGCAAGCCGGCCCTACAACATCTACCCGCACGGCATAACCGATGTACGACCCCTGTAC
 AGTCGCAGACTTCCTAAAGGGGTGAAACACCTGAAGGACTTCCCAATTCTGCCCGGGGAGATCTTC
 AAGTATAAATGGACCGTGACGGTTGAGGATGGTCCCACAAAGTCCGATCCGAGATGCCTTACCCGA
 TATTATTCCAGCTTCGTGAACATGGAAGGGACCTGGCCAGCGGGCTGATTGGCCCACTGCTGATT
 TGTTACAAGGAGTCTGTGATCAAAGAGGAAACCAATAATGAGCGACAACCGTAACGTATCCTG
 TTCAGCGTCTTTGATGAGAATAGAAGCTGGTACCTCACAGAAAATATTAGCGGGTTTCTGCCTAAC
 CCCGCAGGCGTCCAGCTGGAAGATCCCGAGTTCCAAGCCTCAAACATCATGCATAGCATCAACGGA
 TACGTATTTCGATAGCCTGCAGCTGTCCGTCTGTCTCCATGAAGTGGCATATTGGTACATCCTGAGT
 ATCGGGGCGCAGACCGACTTCCTGAGCGTGTCTTTTCTGGATACACGTTCAAACACAAAATGGTC
 TATGAAGATACCCTGACTCTGTTTCCATTCTCAGGAGAGACAGTCTTTATGAGTATGGAAAATCCT
 GGACTGTGGATCCTGGGCTGTCACAATCTGATTTTTCGGAACAGAGGCATGACAGCCCTGCTTAAA
 GTGAGCTCATGCGACAAGAACACCGGTGATTACTACGAAGATAGCTATGAGGACATCAGTGCCTAT
 TTGCTCTCCAAGAACAACGCTATCGAGCCACGGTCTTTCAGTCAGAATCCTCCCGTTCTGAAGCGG
 CATCAGCGCGAAATAACACGCACAACCTTCAGTCAGACCAAGAGGAAATCGACTACGATGATACT
 ATCTCTGTGGAGATGAAGAAGGAGGATTTCGACATTTACGACGAGGACGAGAATCAGTCCCCAAGG
 AGCTTTCAGAAGAAAACAAGACACTATTTTCATTGCCGCCGTGGAGCGACTGTGGGACTACGGCATG

(Продолжение)

Фиг. 14А

TCTAGCTCTCCGCATGTACTTAGAAATAGGGCACAAAGCGGATCCGTGCCTCAGTTTAAGAAAGTT
 GTCTTTCAGGAGTTTACAGATGGCTCCTTCACCCAGCCCTTGTATCGCGGGGAACCAATGAACAC
 CTGGGCCTCCTGGGTCTTATATTAGGGCCGAAGTCGAGGACAATATCATGGTGACCTTTAGGAAC
 CAGGCATCTAGACCTTACTCTTTCTACTCCTCCCTGATATCCTATGAGGAGGACCAGCGGCAAGGC
 GCTGAGCCTCGGAAGAACTTTGTGAAGCCAAATGAAACCAAAACATACTTTTGGAAAGTTCAGCAC
 CACATGGCTCCCACGAAGGACGAATTTGACTGTAAAGCCTGGGCCTACTTCTCAGATGTAGATCTC
 GAGAAAGACGTGCACTCAGGGCTCATTGGTCCCCCTCCTGGTCTGTCACTAATAACCCTCAATCCA
 GCACACGGACGTGAGGTAACCGTCCAGGAATTTGCCCTGTTCTTTACCATTTTCGATGAGACTAAA
 TCCTGGTACTTTACCGAAAACATGGAGAGGAATTGCAGAGCCCATGCAACATCCAGATGGAGGAC
 CCTACCTTCAAAGAGAACTATCGCTTCCATGCCATTAACGGTTACATTATGGATACTCTCCCAGGA
 CTTGTGATGGCACAGGATCAGCGGATAAGATGGTATCTGTTGAGCATGGGCTCCAACGAGAATATT
 CACAGCATCCATTTCTCCGGTCACGTGTTTACAGTGAGAAAGAAAGAGTACAAGATGGCTCTG
 TATAATCTCTATCCAGGCGTATTCGAAACGGTGGAGATGTTGCCTAGCAAGGCCGGCATTGCGGA
 GTAGAATGCCTTATCGGGGAACATCTGCATGCCGGAATGAGCACGCTCTTCTGGTGTATAGTAAC
 AAGTGCCAGACTCCGCTGGGCATGGCATCTGGCCATATACGGGACTTTCAGATTACGGCTAGCGGG
 CAGTATGGGCAGTGGGCACCCAACTTGCGCGACTGCACTATTCAGGCTCTATCAATGCATGGTCC
 ACCAAGGAACCCCTTCTCTTGATTAAAGGTGGACCTTTTGGCGCCCATGATAATCCATGGGATCAAA
 ACCCAGGGCGCTCGTCAGAAATTCATCACTCTACATCTCTCAGTTCATAATAATGTATTCACTG
 GATGGGAAGAAATGGCAGACTTACAGAGGAAACAGCACCGGGACGCTGATGGTGTCTTTGGCAAC
 GTGGACAGCAGCGGCATCAAACACAACATCTTCAATCCTCCCATTATTGCCCCGTTATATTAGACTG
 CATCCCCTCACTACTCTATACGCAGCACACTTAGGATGGAGCTCATGGGATGCGACCTGAACAGT
 TGTAGTATGCCCTTGGGGATGGAGTCCAAAGCTATAAGCGACGCACAAATTACAGCTAGCTCTTAC
 TTTACGAATATGTTGCCACGTGGAGCCCAAGCAAAGCCCGCTGCATTTCAGGGTCCGAGTAAT
 GCTTGGCGCCACAGGTGAATAACCCCTAAGGAATGGTTGCAAGTAGATTTCAGAAAACATGAAG
 GTAACCGGCGTCACTACACAGGGAGTCAAGTCCCTCTTGACCTCTATGTACGTCAAGGAGTTCCCTG
 ATTAGCAGCAGTCAGGATGGGCACCAATGGACACTGTTCTTCCAGAATGGGAAAGTTAAAGTATTT
 CAGGGTAACCAGGACTCCTTTACACCTGTGGTGAATAGCCTCGACCCACCCCTGCTGACACGATAC
 CTCCGCATCCACCTCAGTCTTGGGTGCATCAAATGCCCTGCGAATGGAGGTGTTGGGATGCGAA
 GCTCAGGACCTCTACTGA (SEQ ID NO:15)

Фиг. 14В

CS11-FL-NA

ATGCAGATCGAACTCTCTACTTGCTTCTTCTGTGCCTTCTGAGGTTCTGCTTCTCTGCCACTCGC
 CGATATTACCTCGGGGCGGTGGAGTTGAGTTGGGACTACATGCAATCAGATCTGGGCGAACTCCCT
 GTGGATGCCCCGATTCCCACCGCGGTGCCAAGTCTTTCCCATTTAATACTTCTGTGGTGACAAAG
 AAGACATTGTTTGTGGAGTTTACCGATCACCTGTTCAACATCGCCAAACCGCGGCCCCCATGGATG
 GGTCTGCTTGGGCCCCACCATTCAGCGGAGGTCTATGATACAGTGGTGATAACGCTTAAGAACATG
 GCGAGCCACCCAGTGTCTCTGCATGCCGTTGGTGTATCATATTGGAAGGCCAGCGAAGGAGCGGAG
 TACGATGACCAGACCTCTCAGAGAGAGAAGGAAGACGATAAGGTTTTTCTGGCGGAAGTCATACA
 TATGTATGGCAGGTCTCTGAAAGAGAATGGGCCGATGGCTTCTGACCCCCCTTGTCTTACCTATAGT
 TATCTGAGCCACGTGGACCTGGTCAAGGACCTCAACAGTGGTCTGATTGGGGCTCTGCTTGTGTTGT
 AGAGAGGGTAGCTTGGCTAAGGAGAAAACCCAAACACTCCATAAGTTTCATTTTGTGTTTCGCGGTG
 TTCGACGAGGGAAGAGTTGGCACAGCGAAACAAAGAATTCAGTGATGCAAGACAGGGACGCCGCT
 TCCGCAAGGGCTTGGCTAAGATGCATACGGTGAATGGGTATGTGAACCGGAGCCTCCCGGGGCTG
 ATCGGGTGCCATCGCAAGTCTGTTTACTGGCACGTCAATGGAATGGGGACAACGCCAGAGGTACAT
 AGTATATTTCTTGAAGGCCACACGTTCTCGTACGGAACCCAGCAGGCTTCCCTGGAGATAAGC
 CCCATTACCTTTCTGACCGCTCAGACTCTGCTGATGGACCTTGGCCAGTTTCTCCTGTTCTGCCAT
 ATTAGCAGCCACCAGCAGCAGCGGTATGGAAGCATACGTGAAAGTCGATAGCTGTCTTGAGGAGCCT
 CAGCTCAGAATGAAGAACAACGAGGAGGCCGAAGACTATGACGATGACCTTACAGATTCCGAGATG
 GACGTGGTGCGCTTTGACGACGATAACAGTCTTAGTTTCATTCAAATCAGATCCGTAGCCAAAAAG
 CATCCAAAGACATGGGTGCATTACATTGCAGCCGAAGAGGAGGATTGGGATTATGCGCCCCCTGTT
 CTGGCTCCAGATGACAGGAGCTATAAGTCCCAGTACTTGAACAACGGGCCACAGCGAATCGGTAGA
 AAATATAAGAAGGTAAGATTCATGGCCTACACTGACGAAACATTTAAACCCAGGGAAGCTATCCAA
 CACGAATCTGGAATTCCTCGGCCCTCTGCTCTACGGTGAGGTGGGGGACACCTTGCTGATCATTTTC
 AAAAATCAGGCATCCAGGCCTTACAACATATACCCCCATGGCATCACCGATGTCCGCCCCGTGTAT
 TCCAGAAGACTCCCCAAGGGAGTGAAACATCTGAAAGATTTTCCCATCCTGCGGGCGAGATCTTT
 AAATACAAATGGACTGTGACTGTAGAGGACGGGCCTACAAAATCAGACCCACGGTGCCTGACAAGG
 TATTACAGTAGCTTCGTCAACATGGAACGCGACCTCGCCAGCGGACTCATTGCCCCACTGTTGATC
 TGTTACAAAGAGTCAGTGGATCAGAGGGGAAATCAGATCATGAGCGATAAGAGAAACGTTATCCTG
 TTTAGTGTCTTCGACGAGAACCGGTCTTGGTACCTTACTGAGAACATCCAGAGGTTCTGCGCGAAT
 CCGGCTGGCGTTCAGCTCGAGGACCCAGAGTTCAGGCCAGTAATATAATGCACTCAATCAACGGT
 TATGTGTTTCGATAGCCTGCAGCTGAGCGTCTGCCTCCACGAGGTAGCCTATTGGTACATATTGTCC
 ATCGGGGCTCAGACCGATTCTCTGTCCGTGTTCTTTAGCGGGTATACCTTTAAACATAAAATGGTC
 TATGAAGACACCCTGACCTGTTCCTTCTCCGGTGAGACTGTGTTTCATGTCCATGGAGAACCCA
 GGGCTGTGGATCCTGGGGTGTCACAATAGTGACTTTAGGAATCGGGGAATGACGGCACTGCTGAAG
 GTGAGTTCTTGCATAAAAATACAGGAGATTACTATGAGGATAGTTACGAGGATATCAGTGCCTAT
 CTGCTTTCAAAAAACAACGCAATTGAGCCCCGGTCTTTCTCACAAAACCCCCGGTGTGAAGCGC
 CACCAGCGCGAAATTACCCGGACAACCTTGCAGTCCGACCAGGAGGAAATCGATTATGACGATACT
 ATCAGTGTAGAAATGAAAAAGGAGGATTTTGATATTTACGACGAAGACGAGAACCAGTCTCCGCGA

(Продолжение)

Фиг. 15А

AGTTTTCAGAAGAAAACGCGACACTACTTTATAGCTGCCGTGGAACGACTCTGGGATTATGGCATG
 TCCTCCAGCCCTCATGTCTTAGGAATCGAGCGCAGAGTGGCTCTGTGCCTCAGTTCAAAAAGGTT
 GTGTTCCAGGAATTCACCGACGGCTCATTTACCCAGCCGCTGTACAGAGGCGAACTCAACGAACAC
 CTTGGGCTGCTTGGGCCATATATTCGAGCAGAGGTGGAAGATAATATCATGGTAACCTTTAGAAAC
 CAGGCGTCAAGACCCTATTCCCTTCTACAGTTCTCTGATCAGCTACGAGGAGGACCAAAGACAGGGA
 GCTGAACCCAGGAAGAACTTTGTGAAACCTAATGAGACCAAGACCTACTTCTGGAGGTCCAGCAC
 CATATGGCCCCAACTAAAGATGAATTCGATTGCAAGGCCTGGGCTTATTTACGCGACGTGGATCTC
 GAAAAGGATGTGCACAGCGGGTTGATCGGACCGCTTTTGGTGTGCCACACAAATACCCTCAATCCT
 GCCACGGGCGGCAGGTCACAGTTCAGAGTTTGCACTCTTCTTTACAATATTTGACGAGACAAAG
 TCATGGTATTTTACAGAGAATATGGAGAGAAATTGTCGCGCACCTTGCAACATTCAGATGGAGGAC
 CCCACATTTAAGGAGAATTACAGATTTTCATGCTATCAATGGGTACATTATGGATACTCTGCCTGGT
 CTGGTCATGGCCCAGGATCAGCGCATAAGGTGGTACTTGCTGAGCATGGGATCTAATGAGAATATA
 CACAGCATTCACTTCAGTGGCCACGTTTTTACTGTTAGAAAAGAGGAGGTACAAAATGGCGCTC
 TACAACCTTTACCCGGGTGTGTTTGAGACAGTGGAGATGCTGCCAAGCAAGGCAGGCATCTGGAGG
 GTTGAGTGTCTTATTGGGGAGCATCTGCATGCTGGAATGTCCACCCTCTTTCTTGTTACAGCAAT
 AAGTGCCAGACACCGCTTGGCATGGCCAGCGGCCACATTAGGGACTTTTCAGATAACTGCCAGTGGGA
 CAGTACGGCCAGTGGGCTCCCAAGCTTGCAAGACTCCACTACTCCGGAAGCATAAACGCATGGAGC
 ACCAAGGAACCCCTTCTCTTGGATTAAGGTGGACCTGCTGGCGCCAATGATCATTACGGGCATAAAA
 ACCCAAGGGGCACGACAGAAATTTTCATCTTTGTATATTAGTCAGTTTATCATCATGTACAGCTTG
 GATGGAAAGAAGTGGCAGACGTACAGGGGCAATTCTACAGGAACACTTATGGTGTTTTTTGGGAAT
 GTCGATTCCAGCGGGATCAAACATAACATCTTCAATCCTCCTATTATCGCCCCGATATATCCGCCTG
 CACCCTACGCATTACTCCATCAGGTCCACATTGAGAATGGAAGTATGGGGTGGCAGCTGAATAGT
 TGTAGTATGCCACTGGGCATGGAGTCTAAAGCCATCAGCGATGCACAGATCACTGCCAGCTCTTAC
 TTCACCAACATGTTTGCAACTTGGTCCCCCTCTAAAGCTCGCCTGCATCTGCAGGACGCTCAAAT
 GCATGGCGACCACAGGTGAACAATCCAAAAGAGTGGCTCCAGGTGCACTTTTCAGAAGACAATGAAG
 GTAACAGGAGTGACAACCCAGGGTGTAAGGCTCCTTACGAGTATGTACGTTAAGGAGTTTCTG
 ATTTCTAGCTCCCAGGACGGACACCAGTGGACTCTGTTCTTCCAGAACGGCAAAGTGAAGGTATTT
 CAGGGAAACCAGGATTCTTTTACCCGGTAGTGAATAGCCTGGATCCACCGTTGCTGACCCGCTAT
 CTGAGAATTCATCCACAATCCTGGGTGCATCAGATTGCCCTCCGGATGGAAGTGCTCGGCTGTGAA
 GCTCAGGATCTGTATTAG (SEQ ID NO:16)

Фиг. 15В

CS40-FL-NA

ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGGGATTCTGCTTTAGTGCCACCAGA
 AGATACTACCTGGGTGCAGTGGAACTGTCATGGGACTATATGCAAAGTGATCTCGGTGAGCTGCCT
 GTGGACGCAAGATTTCTCTAGAGTGCCAAAATCTTTCCATTCAACACCTCAGTCGTGTACAAA
 AAGACTCTGTTTGTAGAATTCACGGATCACCTTTTCAACATCGCTAAGCCAAGGCCACCTGGATG
 GGTCTGCTAGGTCTACCATCCAGGCTGAGGTTTATGATACAGTGGTCATTACACTTAAGAACATG
 GCTTCCCATCCTGTCTAGTCTTTCATGCTGTTGGTGTATCCTACTGGAAAGCTTCTGAGGGAGCTGAA
 TATGATGATCAGACCAGTCAAAGGGAGAAAAGAAGATGATAAAGTCTTCCCTGGTGGAAAGCCATACA
 TATGTCCTGGCAGGTCCCTGAAAGAGAATGGTCCAATGGCCTCTGACCCACTGTGCCTTACCTACTCA
 TATCTTTCTCATGTGGACCTGGTAAAAGACTTGAATTCAGGCCTCATTGGAGCCCTACTAGTATGT
 AGAGAAGGGAGTCTGGCCAAGGAAAAGACACAGACCTTGACAAAATTTATACTACTTTTTGCTGTA
 TTTGATGAAGGGAAAAGTTGGCACTCAGAAAACAAAGAACTCCTTGATGCAGGATAGGGATGCTGCA
 TCTGCTCGGGCCTGGCCTAAAATGCACACAGTCAATGGTTATGTAAACAGGTCTCTGCCAGGTCTG
 ATTGGATGCCACAGGAAATCAGTCTATTGGCATGTGATTGGAATGGGCACCACTCCTGAAATGCAC
 TCAATATTCCTCGAAGGTCACACATTTCTTGTGAGGAACCATCGCCAGGCGTCTTGGAAATCTCG
 CCAATAACTTTCTTACTGCTCAAACACTCTTGATGGACCTTGGACAGTTTCTACTGTTTTGTCTAT
 ATCTCTTCCCACCAACATGATGGCATGGAAGCTTATGTCAAAGTAGACAGCTGTCCAGAGGAACCC
 CAACTACGAATGAAAAATAATGAAGAAGCGGAAGACTATGATGATGATCTTACTGATTCTGAAATG
 GATGTGGTCAAGTTTGATGATGACAACCTCTCCTTCCTTTATCCAAATTCGCTCAGTTGCCAAGAAG
 CATCCTAAAACCTTGGGTACATTACATTTGCTGCTGAAGAGGAGGACTGGGACTATGCTCCCTTAGTC
 CTGCCCCCGATGACAGAAGTTATAAAAGTCAATATTTGAACAATGGCCCTCAGCGGATTGGTAGG
 AAGTACAAAAAGTCCGATTTATGGCATACACAGATGAAACCTTTAAGACTCGTGAAGCTATTTCAG
 CATGAATCAGGAATCTTGGGACCTTTACTTTATGGGGAAGTTGGAGACACACTGTTGATTATATTT
 AAGAATCAAGCAAGCAGACCATATAACATCTACCCTCACGGAATCACTGATGTCCGTCCTTTGTAT
 TCAAGGAGATTACCAAAAGGTGTAAAACATTTGAAGGATTTTCCAATTCGCCAGGAGAAATATTC
 AAATATAAATGGACAGTGAAGTGTAGAAGATGGGCCAACTAAATCAGATCCTCGGTGCCTGACCCGC
 TATTACTCTAGTTTCGTTAATATGGAGAGAGATCTAGCTTCAGGACTCATTTGGCCCTCTCCTCATC
 TGCTACAAAGAATCTGTAGATCAAAGAGGAAACAGATAATGTGACACAAGAGGAATGTATCCTG
 TTTTCTGTATTTGATGAGAACCGAAGCTGGTACCTCACAGAGAATATACAACGCTTTCTCCCCAAT
 CCAGCTGGAGTGCAGCTTGAGGATCCAGAGTTCCAAGCCTCCAACATCATGCACAGCATCAATGGC
 TATGTTTTTGTATAGTTTGCAGTTGTCTAGTTTGTGTTGTCATGAGGTGGCATACTGGTACATTCTAAGC
 ATTGGAGCACAGACTGACTTCCTTTCTGTCTTCTTCTCTGGATATACCTTCAAACACAAAATGGTC
 TATGAAGACACACTCACCTATTCCCATTCTCAGGAGAACTGTCTTCATGTGATGGAAAACCCA
 GGTCTATGGATTCTGGGGTGCCACAACCTCAGACTTTTCGGAACAGAGGCATGACCGCCTTACTGAAG
 GTTTCTAGTTGTGACAAGAACACTGGTGATTATTACGAGGACAGTTATGAAGATATTTCAGCATAC
 TTGCTGAGTAAAAACAATGCCATTGAACCAAGAAGCTTCTCCAGAATCCACCAGTCTTGAACGC
 CATCAACGGGAAATAACTCGTACTACTCTTCAGTCAGATCAAGAGGAAATGACTATGATGATACC
 ATATCAGTTGAAATGAAGAAGGAAGATTTTGACATTTATGATGAGGATGAAAATCAGAGCCCCCGC
 AGCTTTCAAAGAAAACACGACACTATTTTATTGCTGCAGTGGAGAGGCTCTGGGATTATGGGATG

(Продолжение)

Фиг. 16А

AGTAGCTCCCCACATGTTCTAAGAAACAGGGCTCAGAGTGGCAGTGTCCCTCAGTTCAAGAAAGTT
 GTTTTCCAGGAATTTACTGATGGCTCCTTTACTCAGCCCTTATACCGTGGAGAACTAAATGAACAT
 TTGGGACTCCTGGGGCCATATATAAGAGCAGAAGTTGAAGATAATATCATGGTAACTTTCAGAAAT
 CAGGCCTCTCGTCCCTATTCTTCTATTCTAGCCTTATTTCTTATGAGGAAGATCAGAGGCAAGGA
 GCAGAACCCTAGAAAAAACTTTGTCAAGCCTAATGAAACCAAACTTACTTTTGGAAAGTGCAACAT
 CATATGGCACCCACTAAAGATGAGTTTGACTGCAAAGCCTGGGCTTATTTCTCTGATGTTGACCTG
 GAAAAAGATGTGCACTCAGGCCTGATTTGGACCCCTTCTGGTCTGCCACACTAACACACTGAACCTT
 GCTCATGGGAGACAAGTGACAGTACAGGAATTTGCTCTGTTTTTACCATCTTTGATGAGACCAAA
 AGCTGGTACTTCACTGAAAATATGGAAAGAACTGCAGGGCTCCCTGCAATATCCAGATGGAAGAT
 CCCACTTTTAAAGAGAATTATCGCTTCCATGCAATCAATGGCTACATAATGGATACACTACCTGGC
 TTAGTAATGGCTCAGGATCAAAGGATTCGATGGTATCTGCTCAGCATGGGCAGCAATGAAAACATC
 CATTTCTATTCTATTTTCACTGGACATGTGTTCACTGTACGAAAAAAGAGGAGTATAAAATGGCACTG
 TACAATCTCTATCCAGGTGTTTTTGAGACAGTGGAAATGTTACCATCCAAAGCTGGAATTTGGCGG
 GTGGAATGCCTTATTGGCGAGCATCTACATGCTGGGATGAGCACACTTTTCTGGTGTACAGCAAT
 AAGTGTGCACTCCCTGGGAATGGCTTCTGGACACATTAGAGATTTTCAGATTACAGCTTCAGGA
 CAATATGGACAGTGGGCCCCAAAGCTGGCCAGACTTCATTATTCCGGATCAATCAATGCCTGGAGC
 ACCAAGGAGCCCTTTTCTGGATCAAGGTGGATCTGTTGGCACCAATGATTATTACGGCATCAAG
 ACCCAGGGTGCCCGTCAGAAGTTCTCCAGCCTCTACATCTCTCAGTTTATCATCATGTATAGTCTT
 GATGGGAAGAAGTGGCAGACTTATCGAGGAAATTCACCTGGAACCTTAATGGTCTTCTTTGGCAAT
 GTGGATTCTCTGGGATAAAACACAATATTTTTAACCCTCCAATTATTGCTCGATACATCCGTTTG
 CACCCAATCATTATAGCATTCGCAGCACTCTTCGCATGGAGTTGATGGGCTGTGATTTAAATAGT
 TGCAGCATGCCATTGGGAATGGAGAGTAAAGCAATATCAGATGCACAGATTACTGCTTCATCCTAC
 TTTACCAATATGTTTGGCACCTGGTCTCCTTCAAAAGCTCGACTTCACCTCCAAGGGAGGAGTAAT
 GCCTGGAGACCTCAGGTGAATAATCCAAAAGAGTGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGACAATGAAA
 GTCACAGGAGTAACACTCTCAGGGAGTAAATCTCTGCTTACCAGCATGTATGTGAAGGAGTTCTCTC
 ATCTCCAGCAGTCAAGATGGCCATCAGTGGACTCTCTTTTTTTCAGAAATGGCAAAGTAAAGGTTTTT
 CAGGGAAATCAAGACTCCTTCACACCTGTGGTGAACCTCTAGACCCACCGTTACTGACTCGCTAC
 CTTTCAATTACCCCCAGAGTTGGGTGCACCAGATTGCCCTGAGGATGGAGGTTCTGGGCTGCGAG
 GCACAGGACCTCTACTGA (SEQ ID NO:17)

Фиг. 16В

CH25-FL-NA

ATGCAGATCGAGCTGTCCACATGCTTTTTTCTGTGCCTGCTGCGGTTCTGCTTCAGCGCCACCCGG
 CCGTACTACCTGGGCGCCGTGGAGCTGTCTGGGACTACATGCAGAGCGACCTGGGCGAGCTGCCC
 GTGGACGCGCCGGTTCCCCCCCAGAGTGCCCAAGAGCTTCCCTTCAACACCAGCGTGGTGACAAG
 AAAACCCGTGTTCTGTGGAGTTCACCGACCACCTGTTCAACATCGCCAAGCCAGGCCCCCCTGGATG
 GGCCTGCTGGGCCCCACCATCCAGGCCGAGGTGTACGACACCGTGGTGATCACCTGAAGAACATG
 GCCAGCCACCCCGTGAGCCTGCACGCCGTGGGCGTGAGCTACTGGAAGGCCTCCGAGGGCGCCGAG
 TACGACGACCAGACCAGCCAGCGGGAGAAAGAGGACGACAAAGTCTTTCTGGCGGCAGCCACACC
 TACGTGTGGCAGGTCTTGAAAGAAAACGCCCCATGGCCTCCGACCCCTGTGCCTGACCTACAGC
 TACCTGAGCCACGTGGACCTGGTGAAGGACCTGAACAGCGGGCTGATTGGGGCCCTGCTGGTCTGC
 CGGGAGGGCAGCCTGGCCAAAGAGAAAACCCAGACCCTGCACAAGTTCATCTGCTGTTTCGCCGTG
 TTCGACGAGGGCAAGAGCTGGCACAGCGAGACCAAGAACAGCCTGATGCAGGACCGGGACGCCGCC
 TCTGCCAGAGCCTGGCCCAAGATGCACACCGTGAACGGCTACGTGAACAGAAGCCTGCCCGGCCCTG
 ATTGGCTGCCACCGGAAGAGCGTGTACTGGCACGTGATCGGCATGGGCACCACACCCGAGGTGCAC
 AGCATCTTTCTGGAAGGGCACACCTTTCTGGTGCGGAACCACCGGCAGGCCAGCCTGGAAATCAGC
 CCTATCACCTTCCTGACCGCCAGACACTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTCCTGCTGTTTTGCCAC
 ATCAGCTCTCACCAGCACGACGGCATGGAAGCCTACGTGAAGGTGGACTCCTGCCCCGAGGAACCC
 CAGCTGCCGATGAAGAACAACGAGGAAGCCGAGGACTACGACGACGACCTGACCAGACGCGAGATG
 GACGTGGTGCGGTTTCGACGACGACAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGAAGCGTGGCCAAGAAG
 CACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATCGCCGCCGAGGAAGAGGACTGGGACTACGCCCCCTGGTG
 CTGGCCCCCGACGACAGAAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAATGGCCCCCAGCGGATCGGCCGG
 AAGTACAAGAAAGTGCGGTTCATGGCCTACACCGACGAGACCTTCAAGACCCGGGAGGCCATCCAG
 CACGAGAGCGGCATCCTGGGCCCCCTGCTGTACGGCGAAGTGGGCGACACACTGCTGATCATCTTC
 AAGAACCAGGCCAGCCGGCCCTACAACATCTACCCCCACGGCATCACCGACGTGCGGCCCTGTAC
 AGCAGGCGGCTGCCCCAAGGGCGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCCATCCTGCCCCGGCGAGATCTTC
 AAGTACAAGTGGACCGTGACCGTGGAGGACGGCCCCACCAAGAGCGACCCAGATGCCCTGACCCGG
 TACTACAGCAGCTTCGTGAACATGGAACGGGACCTGGCCTCCGGGCTGATCGGACCTCTGTGATC
 TGCTACAAAGAAAGCGTGGACAGCGGGCAACCAGATCATGAGCGACAGCGGAACGTGATCCTG
 TTCAGCGTGTTTCGATGAGAACCGGTCTCGGTATCTGACCGAGAACATCCAGCGGTTTCTGCCCAAC
 CCTGCCGGGGTGACGTGGAAGATCCCGAGTTCAGGCCAGCAACATCATGCACTCCATCAATGGC
 TACGTGTTTCGACAGCCTGCAGCTGTCCGTGTGTCTGCACGAGGTGGCCTACTGGTACATCCTGAGC
 ATCGGCGCCAGACCGACTTCCTGAGCGTGTCTTCAGCGGCTACACCTTCAAGCACAAAGATGGTG
 TACGAGGACACCCCTGACCTGTTCCCTTTCAGCGGCGAGACCGTGTTCATGAGCATGGAAAACCC
 GGCCTGTGGATCCTGGGCTGCCACAACAGCGACTTCCGGAACCGGGGCATGACCGCCCTGCTGAAG
 GTGTCCAGCTGCGACAAGAACACCGGCGACTACTACGAGGACAGCTACGAGGATATCAGCGCCTAC
 CTGCTGTCCAAGAACAACGCCATCGAGCCCAAGCTTCAGCCAGAACCCCTGTGCTGAAGCGG
 CACCAGAGAGAGATCACCCGACACCCCTGCAGTCCGACCAGGAAGAGATCGATTACGACGACACC

(Продолжение)

Фиг. 17А

ATCAGCGTGGAGATGAAAAAGAAGATTTGACATCTACGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCCGG
 TCCTTCCAGAAGAAAACCCGGCACTACTTTATCGCCGCCGTGGAGCGGCTGTGGGACTACGGCATG
 AGCAGCAGCCCCACGTGCTGCGGAACCGGGCCAGAGCGGCAGCGTGCCCCAGTTCAAGAAAGTG
 GTGTTCCAGGAATTCACCGACGGCAGCTTCACCCAGCCCCTGTACCGGGGCGAGCTGAACGAGCAC
 CTGGGGCTGCTGGGGCCCTACATCAGGGCCGAAGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCGGGAAT
 CAGGCCAGCAGACCCTACTCCTTCTACAGCAGCCTGATCAGCTACGAAGAGGACCAGCGGCAGGGC
 GCTGAACCCCGGAAGAACTTCGTGAAGCCCAATGAGACCAAGACCTACTTCTGGAAAGTGACGAC
 CACATGGCCCCACCAAGGACGAGTTGACTGCAAGGCCTGGGCCTACTTCAGCGACGTGGATCTG
 GAAAAGGACGTGCACTCTGGACTGATTGGCCCTCTGCTGGTGTGCCACACCAACACCCCTGAACCCC
 GCCCACGGCCGGCAGGTGACCGTGCAGGAATTCGCCCTGTCTTCACCATCTTCGACGAGACCAAG
 TCCTGGTACTTCACCGAGAATATGGAACGGAAGTGCAGAGCCCCCTGCACATCCAGATGGAAGAT
 CCTACCTTCAAAGAGAACTACCGGTTCCACGCCATCAACGGCTACATCATGGACACCCCTGCCTGGC
 CTGGTGATGGCCAGGACCAGAGGATCCGGTGGTATCTGCTGTCCATGGGCGACCAACGAGAATATC
 CACAGCATCCACTTCAGCGGCCACGTGTTACCGGTGAGGAAGAAAGAAGAGTACAAGATGGCCCTG
 TACAACCTGTACCCCGGCGTGTTTCGAGACCGTGGAGATGCTGCCAGCAAGGCCGGCATCTGGCGG
 GTGGAGTGTCTGATCGGCGAGCACCTGCATGCCGGGATGAGCACCCCTGTTCTGGTGTACAGCAAC
 AAGTGCCAGACCCCCCTGGGCATGGCCAGCGGCCACATCCGGGACTTCCAGATCACCGCCTCCGGC
 CAGTACGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCCGGCTGCACTACAGCGGCAGCATCAACGCCTGGTCC
 ACCAAAGAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCCCTATGATCATCCACGGCATTAAAG
 ACCCAGGGCGCCAGGCAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTTCATCATGTACAGCCTG
 GACGGCAAGAAGTGGCAGACCTACCGGGGCAACAGCACCGGCACCCCTGATGGTGTCTTCGGCAAC
 GTGGACAGCAGCGGCATCAAGCACAACTCTTCAACCCCCCATCATCGCCCGGTACATCCGGCTG
 CACCCACCCACTACAGCATCAGATCCACCCTGCGGATGGAAGTGTGGGCTGCGACCTGAAGTCC
 TGCAGCATGCCTCTGGGCATGGAAAGCAAGGCCATCAGCGACGCCAGATCACAGCCAGCAGCTAC
 TTCACCAACATGTTTCGCCACCTGGTCCCCCTCCAAGGCCAGGCTGCACCTGCAGGGCCGGTCCAAC
 GCCTGGCGGCCTCAGGTGAACAACCCCAAAGAATGGCTGCAGGTGGACTTTCAGAAAACCATGAAG
 GTGACCGGCGTGACCACCCAGGGCGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTACGTGAAAGAGTTCTG
 ATCAGCAGCAGCCAGGACGGCCACCAAGTGGACCTGTTCTTTTCAAGACGGCAAGGTGAAAGTGTTC
 CAGGGCAACCCAGGACTCCTTCACCCCGTGGTGAAGTCCCTGGACCCCCCTGCTGACCGCTAC
 CTGCGGATCCACCCCACTCTTGGGTGCACCAGATCGCCCTGAGGATGGAAGTGTGGGATGTGAG
 GCCCAGGATCTGTACTGA (SEQ ID NO:18)

Фиг. 17В

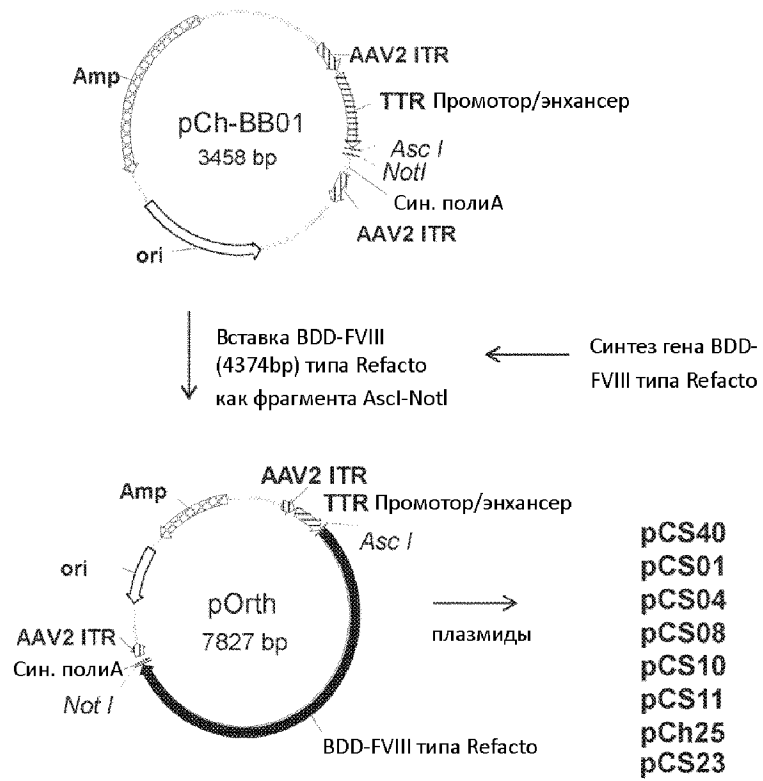
FVIII-FL-AA

```

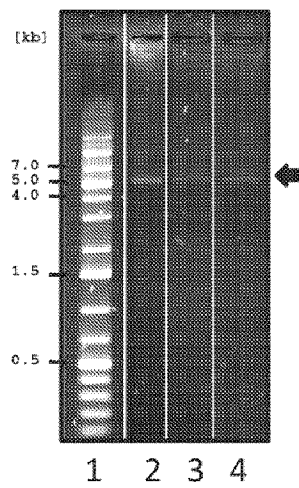
mqielstcfff lcllrfcfsa trryylgave lswdymqsdl gelpvdarfp prvpksfpfn
tsvvykktlf veftdhlfnl akprppwmgf lgptiqaevy dtvvitlknm ashpvsilhav
gvsywkaseg aeyddqtsqr ekeddkvfpg gshtyvwqvl kengpmasdp lcitysylsh
vdlvkdlng ligallvcre gslakektqt lhkfillfav fdegkswhse tknslmqdrd
aasarawpkm htvngyvnrslpgligchrk svywhvigmg tpevhsifl eghtflvrnh
rqasleispi tfltaqtllm dlqgfillfch isshqhdgme ayvkvdscpe epqlrmkne
eaedydddlit dsemdvvrfd ddnspsfiqu rsvakhhpkt wvhyiaaeew dwdyaplvla
pddrsyksqy lnnqpqrigr kykkvrfmay tdetfktrea iqhesgilgp llygevgdtl
liifknqasr pyniyphgit dvrplysrri pkgvkhkdf pilpgeifky kwtvtvedgp
tksdprcltr yyssfvnmr dlasgligpl licykesvdq rgngimsdkr nvilfsvfde
nrswylteni qrflpnpagv qledpefgas nimhsingyv fdlqlslvcl hevaywyils
igaqtdflsv ffsgytfkhk mvyedtlitf pfsgetvfms menpglwilg chnsdfrnrg
mtallkvssc dkntgdyed syedisayll sknnaleprs fsqnsrhpst rqqkfnatti
pendiektqp wfahrtmpk iqnvssdill mllrqsptph glslsdlqea kyetfsddps
pgaidsnsl semthfrpql hhsqdmvftp esglqlrlne klgttaatel kklldfkvsst
snnlistips dnlaagtdnt sslgppsmvp hydsqldtl fgkksplte sggplslsee
nndskillesg lmsqesswg knvsstesgr lfkgrahgp alltkdnalf kvsislktn
ktsnnsatnr kthidgpsll ienspsvwqn ilesdtefkk vtplihdrml mdknatalrl
nhmsnktts knmemvqqk egpippdaqn pdmsffkmlf lpesarwiqr thgknslnsg
qgspkqlvs lgpeksvegq nflseknkv vgkgeftkdv glkemvfpss rnlfltnldn
lhennthnqe kkiqeelekk etliqenvvl pqihtvtgk nfmknflfs trqnvegsyd
gayapvlqdf rslndstnrt kkhtahfskk geeenleglg nqtqgiveky acttrispt
sqgnfvtrsr kralkqfrlp leetelekri ivddtstqws knmkhltpst ltqidyneke
kgaitqspls dcltrshsip qanrspia kvssfpirp iyltrvlfgd nshlpaasy
rkkdsgvqes shflqgakkn nlsalittle mtgdqrevgs lgtsatnsvt ykkventvlp
kpdlpktsqk vellpkvhiy qkdlfptets ngspghldlv egslqgteg aikwneanrp
gkvpflrvat essaktpskl ldplawdnhy gtqipkeewk sqekspekta fkkkdtlsl
nacesnhaia ainegqnkpe ievtwakqr terlcsqnp vlkrhqreit rttlgsdqe
idyddtisve mkkedfdiyd edenqsprsf qkktrhyfia averlwdygm sssphvlrnr
aqsgsvpqfk kvvfqeftdg sftqplyrge lnehlglgp yiraevedni mvtfrnqasr
pysfysslis yeedqrqgae prknfvkpne tktyfwkvqh hmaptkdefd ckawayfsdv
dlekdvhsgl igpllvchn tlnpahgrqv tvgefalfit ifdetkswyf tenmerncra
pcniqmedpt fkenyrfhai ngyimdtlpg lvmaqdrir wyllsmgsne nihsihfsg
vftvrkkey kmalynlypg vftvmlps kagiwrvecl igehlhagms tllfvyshk
qtplgmasgh irdfqitasg qyggwapkla rlhysgsina wstkepfswi kvdlapmii
hgiktqgarq kfsslyisqf iimysldgk wqtyrgnstg tlmvffgnvd ssgikhnifn
ppiiaryirl hpthysirst lrmelmgcdl nscsmplgme skaisdaqit assyftnmfa
twspkskarlh lqgrsnawrp qvnnpkewlq vdfqktmkvt gvttqgvksl ltsmyvkefl
issqdghqwl tlfqngkvk vfqgnqdsft pvvnslppl ltrylrihpq swvhiqlarm
evlgceaqdl y (SEQ ID NO:19)

```

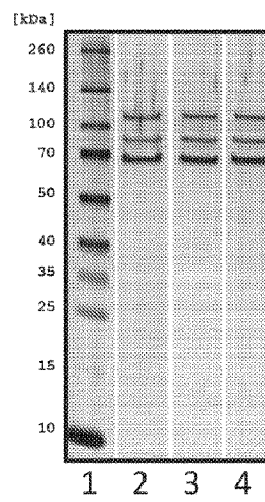
Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21

CS23-FL-NA

atgcagattgagctgagcacctgcttcttctgtgctgctgaggttctgcttcttctgccaccagg
 agatactacctgggcccgtggagctgagctgggactacatgcagctctgacctgggagagctgct
 gtggacgccagggttccccccagagtgcccaagagcttcccttcaacacctcagtggtgtacaag
 aagacctgttctgtgagttcacgaccacctgttcaacatcgccaagcccaggccccctggatg
 ggctgctgggccccaccatccaggccgaggtgtacgacacctgggtgatcacctgaagaacatg
 gccagccaccccgtagcctgcacgccgtgggctgagctactggaaggcctctgagggcgccgag
 tatgacgaccagaccagccagaggagagaaggaggacgacaaggtgttccccggcgccagccacac
 tacgtgtggcaggtgctgaaggagaacggccccatggccagcgacccccctgtgctgacctacagc
 tacctgagccacgtggacctggtgaaggacctgaactctggcctgatcggcgccctgctggtgtgc
 agggagggcagcctggccaaggagaagaccagacctgcacaagttcatcctgctgttccgcctg
 ttcatgagggcaagagctggcacagcgagaccaagaacagcctgatgcaggacagggatgccgcc
 tctgccagggcctggcccaagatgcacacctgaacggctacgtgaacaggagcctgcccgccctg
 atcggtgccacaggaagtctgtgtactggcagctgatcgccatgggcaccacccccgaggtgcac
 agcatcttctctggaggggccacaccttctctggtgaggaaccaaggcaggccagcctggagatcagc
 cccatcaccttctgaccgcccagacctgctgatggacctgggcccagttctctgctgttctgccac
 atcagcagccaccagcacgacggcctggaggcctacgtgaagggtggacagctgccccgaggagccc
 cagctgaggatgaagaacaacgaggagggccgagactatgatgatgacctgaccgactctgagatg
 gacgtggtgaggtttgatgatgacaacagccccagcttcatccagatcaggtctgtggccaagaag
 ccccccaagacctgggtgcactacatcgccgcccaggaggaggactgggactacgccccctgggtg
 ctggcccccgacgacaggagctacaagagccagtaacctgaacaacggccccccagaggatcggcagg
 aagtacaagaagggtcagattcatggcctacaccgacgagaccttcaagaccaggaggccatccag
 cagagctctggcatcctgggccccctgctgtacggcgaggtgggcgacacctgctgatcatcttc
 aagaaccaggccagcaggccctacaacatctacccccacggcatcacccgatgtgaggccccctgtac
 agcaggaggtgcccaggggcgtgaagcacctgaaggacttccccatcctgccccggcgagatcttc
 aagtacaagtgaccgtgacctggaggatggccccaccaagctctgacccagggtgctgaccagg
 tactacagcagcttctgtgaacatggagaggacctggcctctggcctgatcgccccctgctgatc
 tgctacaaggagagcgtggaccagaggggcaaccagatcatgtctgacaagagggaacgtgatctg
 ttctctgtgttgatgagaacaggagctggtatctgaccgagaacatccagagggttctgccccaac
 cccgcccggctgcagctggaggacccccagttccaggccagcaacatcatgcacagcatcaacggc
 tacgtgttcgacagcctgcagctgtctgtgtgctgcacgaggtggcctactgggtacatcctgagc
 atcgggcgcccagaccgacttctgtctgtgttcttctctgtgctacaccttcaagcacaagatgggtg
 tacgaggacacctgacctgttccccctcagcgccgagacctgttcatgagcatggagaacccc
 ggctgtggatcctgggtgccacaacagcgaacttcaggaacaggggcatgacggccctgctgaaa
 gtcagcagctgcgacaagaacacggcgactactacgaggacagctacgaggacatcagcgccctac
 ctgctgagcaagaacaacgccatcgagcccaggagcttcagccagaacccccccgtgctgaagagg
 caccagaggagatcaccaggaccacctgcagagcgaccaggaggagatcgactatgatgacacc

(Продолжение)

Фиг. 22А

atcagcgtggagatgaagaaggaggacttcgacatctacgaaggagacgagaaccagagccccagg
 agcttccagaagaagaccaggcactacttcatcgccgccgtggagaggctgtgggactatggcatg
 agcagcagccccacgtgctgaggaacaggccccagagcggcagcgtgccccagttcaagaagggtg
 gtgttccaggagttcacccagggcagcttcacccagccccgttacagaggcgagctgaacgagcac
 ctgggacctgctgggccccctacatcagggcggaggtggaggacaacatcatggtgaccttcaggaa
 caggccagcaggccccctacagcttctacagcagcctgatcagctacgaggaggaccagaggcagggc
 gccgagcccaggaagaacttcgtgaagcccaacgagaccaagacctacttcttgaagggtgcagcac
 cacatggccccccaccaaggacgagttcgaactgcaaggcctgggacctacttctctgatgtggacctg
 gagaaggacgtgcacagcggcctgatcgccccctgctgggtgtgccacaccaacacctgaacccc
 gccacggcaggcaggtgacctgagaggttcgccccctgttcttcaccatcttcgacgagaccaag
 agctggtaacttcaccgagaacatggagaggaactgcaggccccctgcaacatccagatggaggac
 cccaccttcaaggagaactacaggttccacgccatcaacggctacatcatggacacctgccccggc
 ctgggtgatggcccaggaccagaggatcaggtgggtatctgctgagcatgggcagcaacgagaacatc
 cacagcatccacttcagcggccacgtgttcacctgaggaagaaggaggagtacaagatggccctg
 tacaacctgtacccccggcgtgttcgagaccgtggagatgctgccagcaaggccggcatctggagg
 gtggagtgctgatcgccgagcacctgcacgccggcatgagcaacctgttcttgggtgtacagcaac
 aagtgccagacccccctgggcattggccagcggccacatcagggaacttcagatcacgcctctggc
 cagtacggccagtgggcccccaagctggccaggctgcactacagcggcagcatcaacgcctggagc
 accaaggagcccccttcagctggatcaagtggaacctgctggcccccatgatcatccacggcatcaag
 acccagggcgccaggcagaagttcagcagcctgtacatcagccagttcatcatgtacagcctg
 gacggcaagaagtggcagacctacaggggcaacagcacccggcacctgatgggtgttcttcggcaac
 gtggacagcagcggcatcaagcacacatcttcaaccccccatcatcgccagggtacatcaggctg
 cccccacccactacagcatcaggagcaccttgcggatggaactgatgggctgcgacctgaacagc
 tgcagcatgccccctgggcattggagagcaaggccatctctgacgccagatcacgccagcagctac
 ttcaccaacatgttcgccacctggagccccagcaaggccaggctgcacctgcagggcaggagcaac
 gcctggaggccccaggtgaacaacccccaaaggagtggtgcagggtggacttcagaaagaccatgaag
 gtgaccggcgtgaccacccaggggcgtgaagagcctgctgaccagcatgtacgtgaaggagttcctg
 atcagcagcagccaggacggccaccagtggaacctgttcttccagaacggcaagtgaaaggtgttc
 cagggcaaccaggacagcttcacCcccgtggtgaacagcctggacccccccctgctgaccaggtat
 ctgaggatccacccccagagctgggtgcaccagatcgccctgagaatggaagtgctgggatgcgag
 gcccaggacctgtactga (SEQ ID NO:20)

Фиг. 22В

CS23-FL-AA

MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDAR' FPPRVPKSFPPNTSVVYK
 KTLFVEFTDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQA EVDYDTVVITLKNMASHFVSLHAVGVSYWKASEGAEY
 DDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCRE
 GSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGC
 HRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSH
 QHDCMEAYVKVDSCEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTW
 VH YIAAEEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGIL
 GPLLYGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVT
 VEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLI CYKESVDQRCNQIMSDKRN VILFSVFDENR
 SWYLTENIQRF LNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS
 VFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFM SMENPGLWILGCHNSDFRN RGMTALLKVSSCDKNTGD
 YYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNP PVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFD
 IYDEENQSPRSFQKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSV PQFKKVVFQEFTDGSFTQ
 PLYRGELNEHLGLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLSIYEEDQRQGAEPKNEFVKPNET
 KTYFWKVQH HMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLL VCHTNTLNPAGRQVTVQEFALF
 FTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLS
 MGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLP SKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTL
 FLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI
 IHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPPIIAR
 YIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNM FATWSPSKARLHLQG
 RSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVK
 VFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY (SEQ ID NO:21)

CS23-HC-NA

```

                                gcc
accaggagat actacctggg cgccgtggag ctgagctggg actacatgca gtctgacctg
ggcgagctgc ctgtggacgc caggttcccc cccagagtgc ccaagagctt ccccttcaac
acctcagtgg tgtacaagaa gacctgttc gtggagtcca ccgaccacct gttcaacatc
gccaagccca ggccccctg gatgggcctg ctgggccccca ccatccaggc cgaggtgtac
gacaccgtgg tgatcacctt gaagaacatg gccagccacc ccgtgagcct gcacgccgtg
ggcgtgagct actggaaggc ctctgagggc gccgagtatg acgaccagac cagccagagg
gagaaggagg acgacaaggt gttccccggc ggcagccaca cctacgtgtg gcaggtgctg
aaggagaacg gcccctggc cagcgacccc ctgtgcctga cctacagcta cctgagccac
gtggacctgg tgaaggacct gaactctggc ctgatcggcg ccctgctggt gtgcaggag
ggcagcctgg ccaaggagaa gaccagacc ctgcacaagt tcatcctgct gttcgccgtg
ttogatgagg gcaagagctg gcacagcgag accaagaaca gcctgatgca ggacagggat
gccgcctctg ccagggcctg gcccagatg cacaccgtga acggctacgt gaacaggagc
ctgcccggcc tgatcggctg ccacaggaag tctgtgtact ggcacgtgat cggcatgggc
accacccccg aggtgcacag catcttctctg gagggccaca ccttctggtg gaggaacccac
aggcaggcca gcctggagat cagccccatc accttctctga ccgccagac cctgctgatg
gacctgggcc agttctctgt gttctgccac atcagcagcc accagcacga cggcatggag
gcctacgtga aggtggacag ctgcccggag gaggcccagc tgaggatgaa gaacaacgag
gagggccgag actatgatga tgacctgacc gactctgaga tggacgtggt gaggttctgat
gatgacaaca gcccagctt catccagatc aggtctgtgg ccaagaagca cccaagacc
tgggtgcact acatcgccgc cgaggaggag gactgggact acgccccctt ggtgctggcc
ccgacgaca ggagctacaa gagccagtac ctgaacaacg gccccagag gatcggcagg
aagtacaaga aggtcagatt catggcctac accgacgaga ccttcaagac cagggaggcc
atocagcacg agtctggcat cctgggcccc ctgctgtacg gcgagggtgg cgacaccctg
ctgatcatct tcaagaacca ggccagcagg ccctacaaca tctaccccca cggcatcacc
gatgtgaggc ccctgtacag caggaggctg cccaagggcg tgaagcacct gaaggacttc
cccctctctg ccggcgagat cttcaagtac aagtggaccg tgaccgtgga ggatggcccc
accaagtctg accccagggt cctgaccagg tactacagca gcttcgtgaa catggagagg
gacctggcct ctggcctgat cggccccctg ctgatctgct acaaggagag cgtggaccag
aggggcaacc agatcatgtc tgacaagagg aacgtgatcc tgttctctgt gttogatgag
aacaggagct ggtatctgac cgagaacatc cagaggttcc tgccaaccc cggcggcgtg
cagctggagg accccgagtt ccaggccagc aacatcatgc acagcatcaa cggctacgtg
ttogacagcc tgcagctgtc tgtgtgcctg cagcaggtgg cctactggta catcctgagc
atcggcgccc agaccgactt cctgtctgtg ttcttctctg gctacacctt caagcacaag
atggtgtacg aggacacctt gacctgttc cccttcagcg gcgagaccgt gttcatgagc
atggagaacc ccggcctgtg gatcctgggc tgccacaaca gcgacttcag gaacaggggc
atgaccgccc tgctgaaagt cagcagctgc gacaagaaca ccggcgacta ctacagggac
agctacgagg acatcagcgc ctacctgctg agcaagaaca acgcatcga gccccagg
(SEQ ID NO:22)

```

Фиг. 24

CS23-LC-NA

```

                                g agatcaccag gaccacccctg
cagagcgacc aggaggagat cgactatgat gacaccatca gcgtggagat gaagaaggag
gacttcgaca tctacgacga ggacgagaac cagagcccca ggagcttcca gaagaagacc
aggcactact tcatcgccgc cgtggagagg ctgtgggact atggcatgag cagcagcccc
cacgtgctga ggaacagggc ccagagcggc agcgtgcccc agttcaagaa ggtgggtgttc
caggagtcca ccgacggcag cttcaccacg cccctgtaca gaggcgagct gaacgagcac
ctgggcctgc tgggccccta catcagggcc gaggtggagg acaacatcat ggtgaccttc
aggaaccagg ccagcaggcc ctacagcttc tacagcagcc tgatcagcta cgaggaggac
cagaggcagg gcgccgagcc caggaagaac ttcgtgaagc ccaacgagac caagacctac
ttctggaagg tgcagacca catggccccc accaaggacg agttcgactg caaggcctgg
gcctacttct ctgatgtgga cctggagaag gacgtgcaca gcggcctgat cggcccccctg
ctgggtgtgcc acaccaacac cctgaacccc gcccaaggca ggcaggtgac cgtgcaggag
ttcgccctgt tcttcaccat cttcgacgag accaagagct ggtacttcac cgagaacatg
gagagggaact gcagggcccc ctgcaacatc cagatggagg accccacctt caaggagaac
tacaggttcc acgccatcaa cggctacatc atggacaccc tgcccggcct ggtgatggcc
caggaccaga ggatcaggtg gtatctgctg agcatgggca gcaacgagaa catccacagc
atccacttca gcggccacgt gttcacctg aggaagaagg aggagtacaa gatggccctg
tacaacctgt accccggcgt gttcgagacc gtggagatgc tgcccagcaa ggccggcatc
tgagggttg agtgctgat cggcgagcac ctgcacgcgg gcatgagcac cctgttctctg
gtgtacagca acaagtgcc aacccccctg ggcatggcca gcggccacat cagggaacttc
cagatcacccg cctctggcca gtacggccag tgggccccca agctggccag gctgcactac
agcggcagca tcaacgcctg gaggaccaag gaggccctca gctggatcaa ggtggacctg
ctggccccca tgatcatcca cggcatcaag acccaggggc ccaggcagaa gttcagcagc
ctgtacatca gccagttcat catcatgtac agcctggacg gcaagaagtg gcagacctac
aggggcaaca gcaccggcac cctgatggtg ttcttcggca acgtggacag cagcggcatc
aagcacaaca tcttcaaccc ccccatcatc gccaggtaaa tcaggctgca ccccaccac
tacagcatca ggagcaccct gcggatggaa ctgatgggct gcgacctgaa cagctgcagc
atgcccctgg gcatggagag caaggccatc tctgacgccc agatcacccg cagcagctac
ttaccaaca tgttcgccac ctggagcccc agcaaggcca ggctgcacct gcagggcagg
agcaacgcct ggaggcccca ggtgaacaac cccaaggagt ggctgcaggt ggacttccag
aagaccatga aggtgaccgg cgtgaccacc caggcgtga agagcctgct gaccagcatg
tacgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggacggcc accagtggac cctgttcttc
cagaacggca aagtgaagg gtccagggc aaccaggaca gcttcacccc cgtggtgaac
agcctggacc cccccctgct gaccaggtat ctgaggatcc acccccagag ctgggtgcac
cagatcgccc tgagaatgga agtgctggga tgcgaggccc aggacctgta c
(SEQ ID NO:23)

```

Фиг. 25

CS01-HC-NA

```

                                gcc
accaggagat actacctggg ggctgtggaa ctttcttggg actacatgca gtctgacctg
ggagagctgc ctgtggatgc cagggttccca cccagagtgc ccaagtcctt cccattcaac
acctctgtgg tctacaagaa gacactcttt gtggaattca ctgaccacct gttcaacatt
gcaaaaccca gaccaccctg gatgggactc ctgggaccca ccattcaggc tgagggtgat
gacactgtgg tcatcacccct caagaacatg gcatcccacc ctgtgtctct gcatgctgtg
ggagtctcat actggaaagc ctctgaaggg gctgagtatg atgaccagac atcccagaga
gagaaagagg atgacaaggt gttccctggg ggatctcaca cctatgtgtg gcaagtcctc
aaggagaatg gacccatggc atctgaccca ctctgcctga catactccta cctttctcat
gtggacctgg tcaaggacct caactctgga ctgattgggg cactgctggt gtgcagggaa
ggatccctgg ccaaggagaa aaccacagac ctgcacaagt tcattctcct gtttgctgtc
tttgatgagg gcaagtcttg gcaacttgaa acaaagaact cctgatgca agacagggat
gctgcctctg ccagggcatg gcccaagatg cacactgtga atggctatgt gaacagatca
ctgcctggac tcattggctg ccacaggaaa totgtctact ggcattgtgt tggcatgggg
acaacccctg aagtgcactc cattttcctg gagggacaca ccttcctggt caggaaccac
agacaagcct ctctggagat ctctcccacc accttcctca ctgcacagac actgctgatg
gaccttggac agttcctgct gttctgccac atctcttccc accagcatga tggcatggaa
gcctatgtca aggtggaact atgcctgag gaaccacagc tcaggatgaa gaacaatgag
gaggctgagg actatgatga tgacctgact gactctgaga tggatgtggt cagatttgat
gatgacaact ctccatcctt cattcagatc aggtctgtgg caaagaaaca cccaagaca
tggtgtgact acattgctgc tgaggaagag gactgggact atgcaccact ggtcctggcc
cctgatgaca ggagctacaa gtctcagtac ctcaacaatg gccacaaag aattggaaga
aagtacaaga aagtcagatt catggcctac actgatgaaa ccttcaagac aagagaagcc
attcagcatg agtctggcat tctgggacca ctctgtatg gggaagtgg agacaccctg
ctcatcatct tcaagaacca ggccctccagg ccctacaaca tctaccaca tggcatcact
gatgtcaggc cctgtacag caggagactg ccaaaagggg tgaaacacct caaggacttc
cccattctgc ctggagagat cttcaagtac aagtggactg tcaactgtga ggatggacca
acaaagtctg accccagggt cctcaccaga tactactcct cttttgtgaa catggagaga
gacctggcat ctggactgat tggaccactg ctcatctgct acaaggagtc tgtggaccag
agaggcaacc agatcatgtc tgacaagaga aatgtgattc tgttctctgt ctttgatgag
aacagatcat ggtacctgac tgagaacatt cagagattcc tgcccaaccc tgctgggggtg
caactggaag accctgagtt ccaggcaagc aacatcatgc actccatcaa tggctatgtg
tttgactctc tccagctttc tgtctgcctg catgaggtgg cctactggta cattctttct
attggggcac aaactgactt cttttctgtc ttcttctctg gatacacctt caagcacaaag
atgggtgatg aggacacct gacactcttc ccattctctg gggaaactgt gttcatgagc
atggagaacc ctggactgtg gattctggga tgccacaact ctgacttcag aaacagggga
atgactgcac tgctcaaagt ctctcctgt gacaagaaca ctggggacta ctatgaggac
tcttatgagg acatctctgc ctacctgtc agcaagaaca atgccattga gcccaaga
(SEQ ID NO:24)

```

Фиг. 26

CS01-LC-NA

```

                                g agatcaccag gacaaccctc
cagtctgacc aggaagagat tgactatgat gacaccattt ctgtggagat gaagaaggag
gactttgaca tctatgatga ggacgagaac cagtctccaa gatcattcca gaagaagaca
agacactact tcattgctgc tgtggaaaaga ctgtgggact atggcatgtc ttcctctccc
catgtcctca ggaacagggc acagtctggc tctgtgccac agttcaagaa agtggctctc
caggagtcca ctgatggctc attcaccag cccctgtaca gaggggaact gaatgagcac
ctgggactcc tgggaccata catcagggct gaggtggaag acaacatcat ggtgacattc
agaaaccagg cctccaggcc ctacagcttc tactcttccc tcatcagcta tgaggaagac
cagagacaag gggctgagcc aagaaagaac tttgtgaaac ccaatgaaac caagacctac
ttctggaaag tccagcacca catggcacc accaaggatg agtttgactg caaggcctgg
gcatacttct ctgatgtgga cctggagaaa gatgtgcact ctggcctgat tggcccactc
ctggctctgcc acaccaacac cctgaaccct gcacatggaa ggcaagtgc tgtgcaggag
tttgccctct tcttcaccat ctttgatgaa accaagtcac ggtacttcac tgagaacatg
gagagaaact gcagagcacc atgcaacatt cagatggaag accccacctt caaggagaac
tacagggttc atgccatcaa tggtacatc atggacacc tgctgggct tgtcatggca
caggaccaga gaatcagatg gtacctgctt tctatgggat ccaatgagaa cttcactcc
atocacttct ctgggcatgt ctccactgtg agaaagaagg aggaatacaa gatggccctg
tacaacctct accctggggc ctttgagact gtggagatgc tggcctccaa agctggcatc
tggaggggtg aatgcctcat tggggagcac ctgcatgctg gcattgtcaac cctgttctctg
gtctacagca acaagtgcc aacacccctg ggaatggcct ctggccacat cagggacttc
cagatcactg cctctggcca gtatggccag tgggcacca aactggccag gctccactac
tctggctcca tcaatgcatg gtcaaccaag gagccattct cttggatcaa ggtggacctg
ctggcaccca tgatcattca tggcatcaag acacaggggg caagacagaa attctcctct
ctgtacatct cacagttcat catcatgtac tctctggatg gcaagaagtg gcagacatac
agaggcaact ccactggcac cctcatggc ttctttggca atgtggacag ctctggcatc
aagcacaaca tcttcaacct tccatcatt gccagatata tcaggctgca cccacccac
tactcaatca gatcaaccct caggatggaa ctgatgggat gtgacctgaa ctctgctca
atgcccctgg gaatggagag caaggccatt tctgatgcc agatcactgc atcctcttac
ttcacaaca tgtttgccac ctggtcacca tcaaaagcca ggotgcacct ccagggaaga
agcaatgcct ggagaccca ggtcaacaac ccaaaggaaat ggotgcaagt ggacttccag
aagacaatga aagtcactgg ggtgacaacc caggggggtca agtctctgct caactcaatg
tatgtgaagg agttcctgat ctcttctca caggatggcc accagtggac actcttctc
cagaatggca aagtcaaggt gttccagggc aaccaggact ctttcacacc tgtggtgaac
tcactggacc cccctctct gacaagatac ctgagaattc accccagtc ttgggtccac
cagattgccc tgagaatgga agtctggga tgtgaggcac aagacctgta c
(SEQ ID NO:25)

```

Фиг. 27

CS01A(760-1667) - CS01-SC1-NA

ATGCAGATTGAGCTGCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTGCTGAGATTCTGCTTCTCTGCCACCAGGAGATAC
 TACCTGGGGGCTGTGGAACCTTTCTTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGAGAGCTGCCTGTGGATGCCAGG
 TTCCCACCCAGAGTGCCCAAGTCCTTCCCATTCACACCTCTGTGGTCTACAAGAAGACACTCTTTGTGGAA
 TTCACTGACCACCTGTTCAACATTGCAAAAACCCAGACCACCTGGATGGGACTCCTGGGACCCACCATTACAG
 GCTGAGGTGTATGACACTGTGGTCATCACCCCTCAAGAACATGGCATCCACCCCTGTGTCTCTGCATGCTGTG
 GGAGTCTCATACTGGAAAGCCTCTGAAGGGGCTGAGTATGATGACCAGACATCCCAGAGAGAGAAAGAGGAT
 GACAAGGTGTTCCCTGGGGGATCTCACACCTATGTGTGGCAAGTCCTCAAGGAGAATGGACCCATGGCATCT
 GACCCACTCTGCCTGACATACTCCTACCTTTCTCATGTGGACCTGGTCAAGGACCTCAACTCTGGACTGATT
 GGGGCACTGCTGGTGTGCAGGGAAGGATCCCTGGCCAAAGGAGAAAACCCAGACACTGCACAAGTTCATTCTC
 CTGTTTGCTGTCTTTGATGAGGGCAAGTCTTGGCACTCTGAAACAAAGAACTCCCTGATGCAAGACAGGGAT
 GCTGCCTCTGCCAGGGCATGGCCCAAGATGCACACTGTGAATGGCTATGTGAACAGATCACTGCCTGGACTC
 ATTGGCTGCCACAGGAAATCTGTCTACTGGCATGTGATTGGCATGGGGACACCCCTGAAGTGCATCCATT
 TTCCTGGAGGGACACACCTTCCTGGTCAGGAACCACAGACAAGCCTCTCTGGAGATCTCTCCCATCACCTTC
 CTCACTGACACAGACACTGCTGATGGACCTTGGACAGTTCTGCTGTCTGCCACATCTCTTCCACCAGCAT
 GATGGCATGGAAGCCTATGTCAAGGTGGACTCATGCCCTGAGGAACCACAGCTCAGGATGAAGAACAATGAG
 GAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGACTCTGAGATGGATGTGGTCAGATTTGATGATGACAACCTCT
 CCATCCTTCATTGAGATCAGGTCTGTGGCAAAGAAACACCCCAAGACATGGGTGCATACATTGCTGCTGAG
 GAAGAGGACTGGGACTATGCACCACTGGTCCTGGCCCTGATGACAGGAGCTACAAGTCTCAGTACCTCAAC
 AATGGCCCAAAAGAATTGGAAGAAAGTACAAGAAAGTCAAGATTCATGGCTTACACTGATGAAACCTTCAAG
 ACAAGAGAAGCCATTTCAGCATGAGTCTGGCATTCTGGGACCACTCCTGTATGGGGAAGTGGGAGACACCTG
 CTCATCATCTTCAAGAACCAGGCCTCCAGGCCCTACAACATCTACCCACATGGCATCACTGATGTGAGGCC
 CTGTACAGCAGGAGACTGCCAAAAGGGGTGAAACACCTCAAGGACTTCCCCATTCTGCCTGGAGAGATCTTC
 AAGTACAAGTGGACTGTCACTGTGGAGGATGGACCAACAAGTCTGACCCCAAGGTGCCTCACCAGATACTAC
 TCCTCTTTTGGAACATGGAGAGAGACCTGGCATCTGGACTGATTGGACCACTGCTCATCTGCTACAAGGAG
 TCTGTGGACCAGAGAGAGGCAACCAGATCATGTCTGACAAGAGAAATGTGATTCTGTCTTTGATGAG
 AACAGATCATGGTACCTGACTGAGAACATTCAGAGATTCTGCCCAACCCTGCTGGGGTGCAACTGGAAGAC
 CCTGAGTTCCAGGCAAGCAACATCATGCACTCCATCAATGGCTATGTGTTTACTCTCTCCAGCTTTCTGTCT
 TGCCTGCATGAGGTGGCTACTGGTACATTCCTTTCTATTGGGGCACAACCTGACTTCCTTTCTGTCTTCTTC
 TCTGGATACACCTTCAAGCACAGATGGTGTATGAGGACACCCCTGACACTCTTCCCATTTCTCTGGGAAACT
 GTGTTGATGAGCATGGAGAACCCTGGACTGTGGATTCTGGGATGCCACAACCTTGACTTCAGAAACAGGGGA
 ATGACTGCACTGCTCAAAGTCTCCTCCTGTGACAAGAACACTGGGGACTACTATGAGGACTCTTATGAGGAC
 ATCTCTGCCTACCTGCTCAGCAAGAACAATGCCATTGAGCCAGAGAGATCACCAGGACAACCCCTCCAGTCT
 GACCAGGAAGAGATTGACTATGATGACACCATTTCTGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTTGACATCTATGAT
 GAGGACGAGAACAGTCTCCAAGATCATTCAGAGAAGACAAGACACTACTTCATTGCTGCTGTGGAAAGA
 CTGTGGGACTATGGCATGTCTTCTCTCTCCCATGTCTCAGGAACAGGGGCACAGTCTGGCTCTGTGCCACAG
 TTCAGAAGAGTGGTCTTCCAGGAGTTCACTGATGGCTCATTCACCCAGCCCTGTACAGAGGGGAACCTGAAT
 GAGCACCTGGGACTCCTGGGACCATACATCAGGGCTGAGGTGGAAGACAACATCATGGTGACATTGAGAAAC
 CAGGCCCTCCAGGCCCTACAGCTTCTACTCTTCCCTCATCAGCTATGAGGAAGACCAGAGACAAGGGGCTGAG
 CCAAGAAAGAACTTTGTGAACCCAATGAAACCAAGACCTACTTCTGGAAAGTCCAGACCCACATGGCACCC

(Продолжение)

Фиг. 28А

ACCAAGGATGAGTTTGACTGCAAGGCCTGGGCATACTTCTCTGATGTGGACCTGGAGAAAGATGTGCACTCT
GGCCTGATTGGCCCACTCCTGGTCTGCCACACCAACACCTGAACCTGCACATGGAAGGCAAGTGACTGTG
CAGGAGTTTGCCCTCTCTTCACCATCTTTGATGAAACCAAGTCATGGTACTTCACTGAGAACATGGAGAGA
AACTGCAGAGCACCATGCAACATTCAGATGGAAGACCCACCTTCAAGGAGAACTACAGGTTCCATGCCATC
AATGGCTACATCATGGACACCTGCCTGGGCTTGTCTATGGCACAGGACCAGAGAATCAGATGGTACCTGCTT
TCTATGGGATCCAATGAGAACATTCCTCCATCCACTTCTCTGGGCATGTCTTCACTGTGAGAAAGAAGGAG
GAATACAAGATGGCCCTGTACAACCTCTACCCCTGGGGTCTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCCTCCAAAGCT
GGCATCTGGAGGGTGGAATGCCTCATTTGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGTCAACCTGTTCCTGGTCTAC
AGCAACAAGTGCCAGACACCCCTGGGAATGGCCTCTGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGC
CAGTATGGCCAGTGGGCACCCAACTGGCCAGGCTCCACTACTCTGGCTCCATCAATGCATGGTCAACCAAG
GAGCCATTCTCTTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCACCCATGATCATTCATGGCATCAAGACACAGGGGGCA
AGACAGAAATTCTCTCTCTGTACATCTCACAGTTCATCATCATGTACTCTCTGGATGGCAAGAAGTGGCAG
ACATACAGAGGCAACTCCACTGGCACCCCTCATGGTCTTCTTTGGCAATGTGGACAGCTCTGGCATCAAGCAC
AACATCTTCAACCCCTCCCATCATTTGCCAGATACATCAGGCTGCACCCACCCACTACTCAATCAGATCAACC
CTCAGGATGGAATGATGGGATGTGAACCTGAACCTCTGCTCAATGCCCTGGGAATGGAGAGCAAGGCCATT
TCTGATGCCCAGATCACTGCATCCTCTTACTTCAACCAACATGTTTGGCACCTGGTCACCATCAAAAGCCAGG
CTGCCACTCCAGGGAAGAAGCAATGCCTGGAGACCCAGGTCAACAACCCAAAGGAATGGCTGCAAGTGGAC
TTCCAGAAGACAATGAAAGTCACTGGGGTGACAACCCAGGGGGTCAAGTCTCTGCTCACCTCAATGTATGTG
AAGGAGTTCTTGATCTCTTCTCACAGGATGGCCACCACTGGACACTCTTCTTCCAGAATGGCAAAGTCAAG
GTGTTCCAGGGCAACCAGGACTCTTTCACACCTGTGGTGAACCTCACTGGACCCCCCTCCTGACAAGATAC
CTGAGAATTCAACCCAGTCTTGGGTCCACCAGATTGCCCTGAGAATGGAAGTCTCTGGGATGTGAGGCACAA
GACCTGTACTGA (SEQ ID NO:26)

Фиг. 28В

CS01Δ(772-1667) - CS01-SC2-NA

ATGCAGATTGAGCTGTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTGCTGAGATTCTGCTTCTCTGCCACCAGG
 AGATACTACCTGGGGGCTGTGGAACCTTTCTTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGAGAGCTGCCT
 CTGGATGCCAGGTTCCCACCCAGAGTGCCCAAGTCCTTCCCATTCAACACCTCTGTGGTCTACAAG
 AAGACACTCTTTGTGGAATTCAGTACCACCTGTTCAACATTGCAAAACCCAGACCACCCTGGATG
 GGAATCCTGGGACCCACCATTCAAGGCTGAGGTGTATGACACTGTGGTCAATCACCTCAAGACATG
 GCATCCCACCTGTGTCTCTGCATGCTGTGGGAGTCTCATACTGGAAAGCCTCTGAAGGGGCTGAG
 TATGATGACCAGACATCCCAGAGAGAGAAAGAGGATGACAAGGTGTTCCCTGGGGGATCTCACACC
 TATGTGTGGCAAGTCCTCAAGGAGAATGGACCCATGGCATCTGACCCACTCTGCCTGACATACTCC
 TACCTTTCTCATGTGTGGACCTGGTCAAGGACCTCAACTCTGGACTGATTGGGGCACTGCTGGTGTGC
 AGGGAAGGATCCCTGGCCAAAGGAGAGAAACCCAGACACTGCACAAGTTCAATCTCTGTTTGTGTCT
 TTTGATGAGGGCAAGTCTTGGCACTCTGAAACAAAGAATCCCTGATGCAAGACAGGGATGCTGCC
 TCTGCCAGGGCATGGCCCAAGATGCACACTGTGAATGGCTATGTGAACAGATCACTGCCTGGACTC
 ATTGGCTGCCACAGGAAATCTGTCTACTGGCATGTGATTGGCATGGGGACAACCCCTGAAGTGCAC
 TCCATTTTCTGGAGGGACACACCTTCTGGTCAAGAACACAGACAAGCCTCTCTGGAGATCTCT
 CCCATCACCTTCTCTACTGCACAGACACTGCTGATGGACCTTGGACAGTTCTCTGCTGTTCTGCCAC
 ATCTCTTCCCACCAGCATGATGGCATGGAAGCCTATGTCAAGGTGGACTCATGCCCTGAGGAACCA
 CAGCTCAGGATGAAGAACAATGAGGAGGCTGAGGACTATGATGATGACCTGACTGACTCTGAGATG
 GATGTGGTCAGATTTGATGATGACAACCTTCCATCCTTCATTCAGATCAGGTCTGTGGCAAGAGAA
 CACCCCAAGACATGGGTGCACTACATTGCTGCTGAGGAAGAGGACTGGGACTATGCACCACTGGTC
 CTGGCCCTGATGACAGGAGCTACAAGTCTCAGTACCTCAACAATGGCCCAAGAAATFGGAAGA
 AAGTACAAGAAAGTCAGATTCATGGCCTACACTGATGAAACCTTCAAGACAAGAGAAGCCATTAG
 CATGAGTCTGGCATTCTGGGACCACTCCTGTATGGGGAAGTGGGAGACACCCTGCTCATCATCTTC
 AAGAACCAGGCCTCCAGGCCCTACAACATCTACCCACATGGCATCACTGATGTGAGGCCCTGTAC
 AGCAGGAGACTGCCAAAAGGGGTGAAACACCTCAAGGACTTCCCCATTCTGCCTGAGAGATCTTC
 AAGTACAAGTGGACTGTCACTGTGGAGGATGGACCAACAAAGTCTGACCCCAAGGTGCCTCACCAGA
 TACTACTCCTCTTTTGTGAACATGGAGAGAGACCTGGCATCTGGACTGATTGGACCACTGCTCATC
 TGCTACAAGGAGTCTGTGGACCAGAGAGGCAACCAGATCATGTCTGACAAGAGAAATGTGATTCTG
 TTCTCTGTCTTTGATGAGAACAGATCATGGTACCTGACTGAGAACATTCAAGAGATTCTGCCCCAAC
 CCTGCTGGGGTGCAACTGGAAGACCCTGAGTTCCAGGCAAGCAACATCATGCACTCCATCAATGGC
 TATGTGTTTGAATCTCTCCAGCTTTCTGTCTGCCTGCATGAGGTGGCCTACTGGTACATTCTTTCT
 ATTGGGGCACAACTGACTTCCTTTCTGTCTTCTTCTCTGGATACACCTTCAAGCACAGATGGTG
 TATGAGGACACCCTGACACTCTTCCCATTCTCTGGGGAACTGTGTTTATGAGCATGGAGAACCTT
 GGACTGTGGATTCTGGGATGCCACAACCTGACTTCAGAAACAGGGGAATGACTGCACTGCTCAAA
 GTCTCCTCTGTGACAAGAACAATGCCATTGAGCCCAAGCTTCTCTCAGAATCCAGACACCCAGCACC
 AGGGAGATCACCAGGACACCCCTCCAGTCTGACCAGGAAGAGATTGACTATGATGACACCAATTTCT
 GTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTTGACATCTATGATGAGGACGAGAACCAGTCTCCAAGATCATTC

(Продолжение)

Фиг. 29А

CAGAAGAAGACAAGACACTACTTCATTGCTGCTGTGGAAAGACTGTGGGACTATGGCATGTCTTCC
TCTCCCCATGTCTCAGGAACAGGGCACAGTCTGGCTCTGTGCCACAGTTCAAGAAAGTGGTCTTC
CAGGAGTTCACTGATGGCTCATTACCCAGCCCCCTGTACAGAGGGGAACGAATGAGCACCTGGGA
CTCCTGGGACCATAACATCAGGGCTGAGGTGGAAGACAACATCATGGTGACATTGAGAAACCAGGCC
TCCAGGCCCTACAGCTTCTACTCTTCCCTCATCAGCTATGAGGAAGACCAGAGACAAGGGGCTGAG
CCAAGAAAGAACTTTGTGAAACCAATGAAACCAAGACCTACTTCTGGAAAGTCCAGCACCATG
GCACCCACCAAGGATGAGTTTGAATGCAAGGCCTGGGCATACTTCTCTGATGTGGACCTGGAGAAA
GATGTGCACTCTGGCCTGATTGGCCCACTCCTGGTCTGCCACACCAACACCCTGAACCTGACAT
GGAAGGCAAGTGACTGTGCAGGAGTTTGGCCTCTTCTTCACCATCTTTGATGAAACCAAGTCATGG
TACTTCACTGAGAACATGGAGAGAACTGCAGAGCACCATGCAACATTGAGATGGAAGACCCACCC
TTCAAGGAGAACTACAGGTTCATGCCATCAATGGCTACATCATGGACACCCTGCCTGGGCTTGTCT
ATGGCACAGGACCAGAGAATCAGATGGTACCTGCTTTCTATGGGATCCAATGAGAACATTCACCTCC
ATCCACTTCTCTGGGCATGTCTTCACTGTGAGAAAGAAGGAGGAATACAAGATGGCCCTGTACAAC
CTCTACCCTGGGGTCTTTGAGACTGTGGAGATGCTGCCCTCCAAAGCTGGCATCTGGAGGTGGAA
TGCCTCATTTGGGGAGCACCTGCATGCTGGCATGTCAACCTGTTCTCTGGTCTACAGCAACAAGTGC
CAGACACCCCTGGGAATGGCCTCTGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACTGCCTCTGGCCAGTAT
GGCCAGTGGGCACCCAACTGGCCAGGCTCCACTACTCTGGCTCCATCAATGCATGGTCAACCAAG
GAGCCATTCTCTTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCACCCTGATCATTGATGGCATCAAGACACAG
GGGGCAAGACAGAAATTCTCCTCTCTGTACATCTCACAGTTCATCATCATGTACTCTCTGGATGGC
AAGAAGTGGCAGACATACAGAGGCAACTCCACTGGCACCCTCATGGTCTTCTTTGGCAATGTGGAC
AGCTCTGGCATCAAGCACACATCTTCAACCCCTCCCATCATTTGCCAGATACATCAGGCTGCACCCC
ACCCACTACTCAATCAGATCAACCCCTCAGGATGGAAGTGTGGGATGTGACCTGAACTCCTGCTCA
ATGCCCTGGGAATGGAGAGCAAGGCCATTTCTGATGCCAGATCACTGCATCCTCTTACTTCACC
AACATGTTTGGCACCTGGTCACCATCAAAAGCCAGGCTGCACCTCCAGGGAAGAAGCAATGCCTGG
AGACCCAGGTCAACAACCCAAAGGAATGGCTGCAAGTGGACTTCCAGAAGACAATGAAAGTCACT
GGGGTGACAACCCAGGGGGTCAAGTCTCTGCTCACCTCAATGTATGTGAAGGAGTTCTGATCTCT
TCCTCACAGGATGGCCACCAGTGGACACTCTTCTTCCAGAATGGCAAAGTCAAGGTGTTCCAGGGC
AACCAGGACTCTTTCACACCTGTGGTGAATCACTGGACCCCCCTCCTGACAAGATACCTGAGA
ATTACCCCCAGTCTTGGGTCCACCAGATTGCCCTGAGAATGGAAGTCTGGGATGTGAGGCACAA
GACCTGTACTGA (SEQ ID NO:27)

Фиг. 29В

CS23A(760-1667) - CS23-SC1-NA

ATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCTGCTGCTGAGGTTCTGCTTCTCTGCCACCAGGAGATAC
 TACCTGGGCGCCGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGCGAGCTGCCTGTGGACGCCAGG
 TTCCCCCCCAGAGTGCCCCAAGAGCTTCCCTTCAACACCTCAGTGGTGTACAGAAGACCCTGTTCTGTGGAG
 TTCACCGACCACCTGTTCAACATCGCCAAAGCCAGGCCCCCCCTGGATGGGCTGCTGGGCCCCACCATCCAG
 GCCGAGGTGTACGACACCGTGGTGATCACCTGAAGAACATGGCCAGCCACCCCGTGAGCCTGCACGCCGTG
 GGCCTGAGCTACTGGAAGGCCCTCTGAGGGCGCCGAGTATGACGACCAGACCAGCCAGAGGGAGAAGGAGGAC
 GACAAGGTGTTCCCCGGCGGCGAGCCACACCTACGTGTGGCAGGTGCTGAAGGAGAAGGCCCCCATGGCCAGC
 GACCCCTGTGCTGACCTACAGCTACCTGAGCCACGTGGACCTGGTGAAGGACCTGAACCTGTGCTGATC
 GGCCTGCTGCTGGTGTGTCAGGGAGGGCAGCCTGGCCAAGGAGAAGACCCAGACCCTGCACAAGTTCATCCTG
 CTGTTTCGCCGTGTTTCGATGAGGGCAAGAGCTGGCACAGCGAGACCAAGAAGCCCTGATGCAGGACAGGGAT
 GCCGCTCTTGCCAGGGCTTGGCCCAAGATGACACCCGTGAACGGCTACGTGAACAGGAGCCTGCCCGGCTG
 ATCGGCTGCCACAGGAAGTCTGTGTACTGGCACGTGATCGGCATGGGCACCCACCCCGAGGTGCACAGCATC
 TTCTTGGAGGGCCACACCTTCTTGGTGGAGAACACAGGCAGGCCAGCCTGGAGATCAGCCCCATCACCTTC
 CTGACCGCCAGACCCTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTCCTGCTGTTCTGCCACATCAGCAGGCCACCAGCAC
 GACGGCATGGAGGCCCTACGTGAAGGTGGACAGCTGCCCGAGGAGCCCCAGCTGAGGATGAAGAACAACGAG
 GAGGCCGAGGACTATGATGATGACCTGACCGACTCTGAGATGGACGTGGTGGGTTTGGATGATGACAACAGC
 CCCAGCTTCATCCAGATCAGGTCTGTGGCCAAGAAGCACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATCGCCGCCGAG
 GAGGAGGACTGGGACTACGCCCCCTGGTGTGGCCCCGACGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAAC
 AACGCCCCCCAGAGGATCGGCAGGAAGTACAAGAAGGTACAGATTCTATGGCTACACCGACGAGACCTTCAAG
 ACCAGGGAGGCCATCCAGCACGAGTCTGGCATCTGGGCCCTGCTGTACGGCGAGGTGGGCGACACCTTG
 CTGATCATCTTCAAGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCCAAGGCATCACCGATGTGAGGCC
 CTGTACAGCAGGAGGCTGCCCAAGGGCTGAAGCAOCTGAAGGACTTCCCATCTCTGCCCGGCGAGATCTTC
 AAGTACAAGTGGACCGTGACCGTGGAGGATGGCCCCACCAAGTCTGACCCAGGTGCTGACCAGGTACTAC
 AGCAGCTTCGTGAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATCGGCCCTGCTGATCTGTACAAGGAG
 AGCGTGGACAGAGGGGCAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAACGTGATCCTGTTCTCTGTGTTCTGATGAG
 AACAGGAGCTGGTATCTGACCGAGAACATCCAGAGGTTCTTGCCCAACCCCGCCGCTGCAGCTGGAGGAC
 CCCGAGTTCCAGGCCAGCAACATCATGCACAGCATCAACGGCTACGTGTTGACAGCCTGCAGCTGTCTGTG
 TGCCTGCACGAGGTGGCTACTGGTACATCCTGAGCATCGGCCGCCAGACCGACTTCTGTCTGTGTTCTTC
 TCTGGCTACACCTTCAAGCACAGATGGTGTACGAGGACACCCCTGACCCTGTTCCCTTCAGCGGCGAGACC
 GTGTTTCATGAGCATGGAGAACCCCGGCTGTGGATCCTGGGCTGCCACAACAGCGACTTCAGGAACAGGGGC
 ATGACCGCCCTGCTGAAAGTCAGCAGCTGCGACAAGAACACCGGCGACTACTACGAGGACAGCTACGAGGAC
 ATCAGCGCTACCTGCTGAGCAAGAACAACGCCATCGAGCCAGGGAGATCACAGGACCACCTGCAGAGC
 GACCAGGAGGAGATCGACTATGATGACACCATCAGCGTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTCGACATCTACGAC
 GAGGACGAGAACCAGAGCCCCAGGAGCTTCCAGAAGAAGACAGGCACTACTTCATCGCCGCCCTGGAGAGG
 CTGTGGGACTATGGCATGAGCAGCAGCCCCACGTGCTGAGGAACAGGGCCCAGAGCGGCAGCGTGCCCCAG
 TTCAAGAAGGTGGTGTCCAGGAGTTCACCGACGGCAGCTTCACCCAGCCCTGTACAGAGGCGAGCTGAAC
 GAGCACTGGGCTGCTGGGCCCTACATCAGGGCCGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCAGGAAC
 CAGGCCAGCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCAGCTGATCAGCTACGAGGAGGACCAGAGGCAGGGCGCCGAG

(Продолжение)

Фиг. 30А

CCCAGGAAGAAGTTCGTGAAGCCCAACGAGACCAAGACCTACTTCTGGAAGGTGCAGCACACATGGCCCCC
ACCAAGGACGAGTTCGACTGCAAGGCCCTGGGCCCTACTTCTCTGATGTGGACCTGGAGAAGGACGTGCACAGC
GGCCTGATCGCCCCCTGTCTGGTGTGCCACACCAACACCCCTGAACCCCGCCACGGCAGGCAGGTGACCGTG
CAGGAGTTCGCCCTGTCTTCACCATCTTCGACGAGACCAAGAGCTGGTACTTCACCGAGAACATGGAGAGG
AACTGCAGGGCCCCCTGCAACATCCAGATGGAGGACCCACCTTCAAGGAGAACTACAGGTTCCACGCCATC
AACGGCTACATCATGGACACCCTGCCCGGCCCTGGTGATGGCCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTATCTGCTG
AGCATGGGCAGCAACGAGAACATCCACAGCATCCACTTCAGCGGCCACGTGTTACCCGTGAGGAAGAAGGAG
GAGTACAAGATGGCCCTGTACAACCTGTACCCCGGCCGTGTTCGAGACCGTGGAGATGCTGCCCAGCAAGGCC
GGCATCTGGAGGGTGGAGTGCCTGATCGGCGAGCACCTGCACGCCGGCATGAGCACCTGTTCTTGGTGTAC
AGCAACAAGTGCCAGACCCCCCTGGGCATGGCCAGCGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACCGCCTCTGGC
CAGTACGGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGGCTGCACTACAGCGGCAGCATCAACGCCTGGAGCACCAAG
GAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCCCCCATGATCATCCACGGCATCAAGACCCAGGGCGCC
AGGCAGAAGTTCAGCAGCCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGACGGCAAGAAGTGGCAG
ACCTACAGGGGCAACAGCACCGGCACCCCTGATGGTGTCTTCGGCAACGTGGACAGCAGCGGCATCAAGCAC
AACATCTTCAACCCCCCATCATCGCCAGGTACATCAGGCTGCACCCACCCACTACAGCATCAGGAGCACC
CTGCGGATGGAACFGATGGGCTGCGACCTGAACAGCTGCAGCATGCCCCCTGGGCATGGAGAGCAAGGCCATC
TCTGACGCCCCAGATCACCGCCAGCAGCTACTTCACCAACATGTTTCGCCACCTGGAGCCCCAGCAAGGCCAGG
CTGCACCTGCAGGGCAGGAGCAACGCCTGGAGGCCCCAGGTGAACAACCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGGAC
TTCCAGAAGACCATGAAGGTGACCGGCGTGACCCACCCAGGGCGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTACGTG
AAGGAGTTCTGATCAGCAGCAGCCAGGACGGCCACAGTGGACCTTGTCTTCCAGAACGGCAAGTGAAG
GTGTTCCAGGGCAACCAGGACAGCTTCACCCCGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCTGCTGACCAGGTAT
CTGAGGATCCACCCCAAGAGCTGGGTGCACCATCGCCCTGAGAATGGAAGTGTGGGATGCGAGGCCACAG
GACCTGTACTGA (SEQ ID NO:28)

CS23Δ(772-1667) - CS23-SC2-NA

ATGCAGATTGAGCTGAGCACCTGCTTCTTCTGCTGCTGCTGAGGTTCTGCTTCTCTGCCACCAGG
 AGATACTACCTGGGCGCCGTGGAGCTGAGCTGGGACTACATGCAGTCTGACCTGGGCGAGCTGCCT
 GTGGACGCCAGGTTCCCCCCCAGAGTGCCCAAGAGCTTCCCCTTCAACACCTCAGTGGTGTACAAG
 AAGACCCTGTTCTGAGGTTACCGACCACCTGTTCAACATCGCCAAGCCCAGGCCCCCTGGATG
 GGCCTGCTGGGCCCCACCATCCAGGCCGAGGTGTACGACACCGTGGTGATCACCTGAAGAACATG
 GCCAGCCACCCCGTGAGCCTGCACGCCGTGGGCGTGAGCTACTGGAAGGCCCTCTGAGGGCGCCGAG
 TATGACGACCAGACCAGCCAGAGGGAGAAGGAGGACGACAAGGTGTTCCCGGCGGCAGCCACACC
 TACGTGTGGCAGGTGCTGAAGGAGAACGGCCCCATGGCCAGCGACCCCCCTGTGCCTGACCTACAGC
 TACCTGAGCCACGTGGACCTGGTGAAGGACCTGAACTCTGGCCTGATCGGCGCCCTGCTGGTGTGC
 AGGGAGGGCAGCCTGGCCAAAGGAGAAGACCCAGACCCTGCACAAGTTTCATCCTGCTGTTCCGCGTG
 TTCGATGAGGGCAAGAGCTGGCACAGCGAGACCAAGAACAGCCTGATGCAGGACAGGGATGCCGCC
 TCTGCCAGGGCCTGGCCCAAGATGCACACCGTGAACGGCTACGTGAACAGGAGCCTGCCCGGCTG
 ATCGGCTGCCACAGGAAGTCTGTGTACTGGCACGTGATCGGCATGGGCACCAACCCCGAGGTGCAC
 AGCATCTTCTGGAGGGCCACACCTTCTGGTGAGGAACCACAGGCAGGCCAGCCTGGAGATCAGC
 CCCATCACCTTCTGACCGCCAGACCCTGCTGATGGACCTGGGCCAGTTCTGCTGTTCTGCCAC
 ATCAGCAGCCACCAGCACGACGGCATGGAGGCCCTACGTGAAGGTGGACAGCTGCCCGGAGGAGCCC
 CAGCTGAGGATGAAGAACAACGAGGAGGCCGAGGACTATGATGATGACCTGACCGACTCTGAGATG
 GACGTGGTGAGGTTTGATGATGACAACAGCCCCAGCTTCATCCAGATCAGGTCTGTGGCCAAAGAAG
 CACCCCAAGACCTGGGTGCACTACATCGCCGCCGAGGAGGAGGACTGGGACTACGCCCCCTGGTG
 CTGGCCCCCGACGACAGGAGCTACAAGAGCCAGTACCTGAACAACGGCCCCCAGAGGATCGGCAGG
 AAGTACAAGAAGGTGAGATTTCATGGCCTACACCGACGAGACCTTCAAGACCAGGGAGGCCATCCAG
 CACGAGTCTGGCATCCTGGGCCCCCTGCTGTACGGCGAGGTGGGCGACACCCTGCTGATCATCTTC
 AAGAACCAGGCCAGCAGGCCCTACAACATCTACCCCCACGGCATCACCGATGTGAGGCCCTGTAC
 AGCAGGAGGCTGCCCAAGGGCGTGAAGCACCTGAAGGACTTCCCCATCTGCCCGCGAGATCTTC
 AAGTACAAGTGGACCGTGACCGTGGAGGATGGCCCCACCAAGTCTGACCCAGGTGCCTGACCAGG
 TACTACAGCAGCTTCTGTAACATGGAGAGGGACCTGGCCTCTGGCCTGATCGGCCCCCTGCTGATC
 TGCTACAAGGAGAGCGTGGACCAGAGGGGCAACCAGATCATGTCTGACAAGAGGAACGTGATCCTG
 TTCTCTGTGTTGATGAGAACAGGAGCTGGTATCTGACCGAGAACATCCAGAGGTTCTTGCCCAAC
 CCGCGCGCGTGCAGCTGGAGGACCCGAGTTCCAGGCCAGCAACATCATGCACAGCATCAACGGC
 TACGTGTTGACAGCCTGCAGCTGTCTGTGTGCCTGCACGAGGTGGCCTACTGGTACATCCTGAGC
 ATCGGCGCCCAGACCGACTTCTGTCTGTGTCTTCTCTGGCTACACCTTCAAGCACAAGATGGTG
 TACGAGGACACCCTGACCTGTTCCTTCCCTTCAGCGGCGAGACCGTGTTCATGAGCATGGAGAACCC
 GGCCTGTGGATCCTGGGCTGCCACAACAGCGACTTCAGGAACAGGGGCATGACCGCCCTGCTGAAA
 GTCAGCAGCTGCGACAAGAACACCGGCGACTACTACGAGGACAGCTACGAGGACATCAGCGCCTAC
 CTGCTGAGCAAGAACAACGCCATCGAGCCAGGAGCTTCAGCCAGAACTCCAGACACCCAGCACC

(Продолжение)

Фиг. 31А

AGGGAGATCACCAGGACCACCCTGCAGAGCGACCAGGAGGAGATCGACTATGATGACACCATCAGC
GTGGAGATGAAGAAGGAGGACTTCGACATCTACGACGAGGACGAGAACCAGAGCCCCAGGAGCTTC
CAGAAGAAGACCAGGCACTACTTCATCGCCGCCGTGGAGAGGCTGTGGGACTATGGCATGAGCAGC
AGCCCCACGTGCTGAGGAACAGGGGCCAGAGCGGCAGCGTGCCCCAGTTCAAGAAGGTGGTGTTC
CAGGAGTTACCGACGGCAGCTTCACCCAGCCCCCTGTACAGAGGCGAGCTGAACGAGCACCTGGGC
CTGCTGGGCCCTTACATCAGGGCCGAGGTGGAGGACAACATCATGGTGACCTTCAGGAACCAGGCC
AGCAGGCCCTACAGCTTCTACAGCAGCCTGATCAGCTACGAGGAGGACCAGAGGCAGGGCGCCGAG
CCCAGGAAGAACTTCGTGAAGCCCCAACGAGACCAAGACCTACTTCTGGAAGGTGCAGCACCATG
GCCCCACCAAGGACGAGTTCGACTGCAAGGCCTGGGCCCTACTTCTCTGATGTGGACCTGGAGAAG
GACGTGCACAGCGGCCCTGATCGGCCCTTCTGCTGGTGTGCCACACCAACACCCTGAACCCCGCCAC
GGCAGGCAGGTGACCGTGCAGGAGTTGCCCTGTTCTTCACCATCTTCGACGAGACCAAGAGCTGG
TACTTCACCGAGAACATGGAGAGGAAGTGCAGGGCCCCCTGCAACATCCAGATGGAGGACCCACCC
TTCAAGGAGAACTACAGGTTCCACGCCATCAACGGCTACATCATGGACACCCTGCCCGGCCCTGGTG
ATGGCCCAGGACCAGAGGATCAGGTGGTATCTGCTGAGCATGGGCAGCAACGAGAACATCCACAGC
ATCCACTTCAGCGGCCACGTGTTACCCGTGAGGAAGAAGGAGGAGTACAAGATGGCCCTGTACAAC
CTGTACCCCGGCGTGTTCGAGACCGTGGAGATGCTGCCCAGCAAGGCCGGCATCTGGAGGGTGGAG
TGCCTGATCGGCGAGCACCTGCACGCCGGCATGAGCACCCCTGTTCTGCTGGGTACAGCAACAAGTGC
CAGACCCCTTGGGCATGGCCAGCGGCCACATCAGGGACTTCCAGATCACCGCCTCTGGCCAGTAC
GGCCAGTGGGCCCCCAAGCTGGCCAGGCTGCACTACAGCGGCAGCATCAACGCCTGGAGCACCAAG
GAGCCCTTCAGCTGGATCAAGGTGGACCTGCTGGCCCCATGATCATCCACGGCATCAAGACCCAG
GGCGCCAGGCAGAAAGTTACGACGCTGTACATCAGCCAGTTCATCATCATGTACAGCCTGGACGGC
AAGAAGTGGCAGACCTACAGGGCAACAGCACCGGCACCCCTGATGGTGTCTTCGGCAACGTGGAC
AGCAGCGGCATCAAGCACAAATCTTCAACCCCCCATCATCGCCAGGTACATCAGGCTGCACCCC
ACCCACTACAGCATCAGGAGCACCTTGCAGGATGGAAGTGTGGGCTGCGACCTGAACAGCTGCAGC
ATGCCCCTGGGCATGGAGAGCAAGGCCATCTCTGACGCCAGATCACCGCCAGCAGCTACTTCACC
AACATGTTTCGCCACCTGGAGCCCCAGCAAGGCCAGGCTGCACCTGCAGGGCAGGAGCAACGCCTGG
AGGCCCCAGGTGAACAACCCCAAGGAGTGGCTGCAGGTGGACTTCCAGAAGACCATGAAGGTGACC
GGCGTGACCACCCAGGGCGTGAAGAGCCTGCTGACCAGCATGTACGTGAAGGAGTTCCTGATCAGC
AGCAGCCAGGACGGCCACCAGTGGACCCCTGTTCTTCCAGAACGGCAAAGTGAAGGTGTTCCAGGGC
AACCAGGACAGCTTCACCCCGTGGTGAACAGCCTGGACCCCCCTGCTGACCAGGTATCTGAGG
ATCCACCCCAAGAGCTGGGTGCACCAGATCGCCCTGAGAATGGAAGTGTGGGATGCGAGGCCAG
GACCTGTACTGA (SEQ ID NO:29)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 8073-5115-WO	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2016/061688	International filing date (<i>day/month/year</i>) 11 November 2016 (11-11-2016)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 13 November 2015 (13-11-2015)
Applicant BAXALTA INCORPORATED		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

☒

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

☒

the international application in the language in which it was filed

☐

a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐

This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☒

With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐

Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐

Unity of invention is lacking (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

☒

the text is approved as submitted by the applicant

☐

the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☒

the text is approved as submitted by the applicant

☐

the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1

☒

as suggested by the applicant

☐

as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure

☐

as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☐

none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/061688

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13~~ter~~.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13~~ter~~.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13~~ter~~.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2016/061688

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K14/755 A61K48/00 C12N15/86
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2015/071883 A1 (COLOSI PETER CAMERON [US]) 12 March 2015 (2015-03-12) abstract; claims 1-14; sequence 45 paragraph [0060] paragraph [0130] -----	8,11,12, 15,18, 19,25, 29,32, 37-47
X	DATABASE Geneseq [Online] 5 December 2013 (2013-12-05), "Human diseases associated protein encoding optimized ORF, SEQ ID 1811.", XP002766199, retrieved from EBI accession no. GSN:BAW43417 Database accession no. BAW43417 sequence -/-	18,19,32



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 January 2017

Date of mailing of the international search report

06/02/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gurdjian, Didier

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/061688

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	& WO 2013/151666 A2 (MODERNA THERAPEUTICS [US]) 10 October 2013 (2013-10-10) abstract; claims 1,2; figure 1; sequence 1811 ----- US 2013/017997 A1 (SCHELLENBERGER VOLKER [US] ET AL) 17 January 2013 (2013-01-17) abstract; claims 1-26; figures 1-9; sequence 939 -----	23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/061688

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2015071883	A1	12-03-2015	AU 2014318890 A1 25-02-2016 CA 2921232 A1 19-03-2015 CN 105636981 A 01-06-2016 EP 3044231 A1 20-07-2016 JP 2016534739 A 10-11-2016 KR 20160049015 A 04-05-2016 SG 11201601932U A 28-04-2016 TW 201546285 A 16-12-2015 US 2015071883 A1 12-03-2015 WO 2015038625 A1 19-03-2015
US 2013017997	A1	17-01-2013	US 2012178691 A1 12-07-2012 US 2013017997 A1 17-01-2013 US 2015038421 A1 05-02-2015 US 2016376344 A1 29-12-2016