

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041366**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.10.17

(21) Номер заявки
201890423

(22) Дата подачи заявки
2016.08.03

(51) Int. Cl. *A61P 7/04* (2006.01)
A61K 38/36 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 47/42 (2017.01)
A61L 15/32 (2006.01)

(54) СЛИТЫЕ БЕЛКИ ФАКТОРА IX, СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/200,590; 62/281,993

(32) 2015.08.03; 2016.01.22

(33) US

(43) 2018.07.31

(86) PCT/US2016/045401

(87) WO 2017/024060 2017.02.09

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

(72) Изобретатель:
**Лю Чжицянь, Ван Дер Флайер
Арджан, Лайт Дэвид Р., Чхабра Экта
Сет, Лю Тунгуао, Петерс Роберт Т.,
Кулман Джон, Исмаил Айман (US)**

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

(56) US-A1-20110046060

US-A1-20120178691

(VENKATESWARLU, D) Structural Insights into the Interaction of Blood Coagulation Co-factor Villa with Factor IXa: A Computational Protein-Protein Docking and Molecular Dynamics Refinement Study. Biochemical and Biophysical Research Communications. 23 August, 2014; Vol. 452, No. 3; pages 1-16; whole document; Genbank Supplement pages 1-5.

(57) В данном изобретении предложены слитые белки фактора IX (FIX), содержащие по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, такой как XTEN. В данном изобретении дополнительно описаны способы получения и применения слитых белков FIX.

B1**041366****041366****B1**

Содержание представленного в электронном виде перечня последовательностей в текстовом файле ASCII (Name: 2159_466PC03_SeqListing_ST25.txt; Размер: 688 154 байта; и дата создания: 2 августа 2016 года), поданного с заявкой, включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Уровень техники

Гемофилия В (также известная как болезнь Кристмаса) является одним из наиболее распространенных наследственных нарушений свертывания крови в мире. Вследствие этого заболевания нарушается свертывание крови *in vivo* и *in vitro*, что требует тщательного медицинского наблюдения на протяжении всей жизни индивидуума с гемофилией В. Без надлежащего лечения, индивидуум с гемофилией В будет страдать от спонтанного кровотечения в суставах, что вызывает сильную боль и инвалидизирующую неподвижность; кровотечение в мышцы может обуславливать накопление крови в этих тканях; спонтанное кровотечение в области горла и шеи в отсутствие неотложной помощи может вызвать удушье; кроме того, часто может наблюдаться почечное кровотечение; сильное кровотечение после оперативного вмешательства, незначительных случайных травм или удаления зубов.

Нормальный процесс коагуляции крови *in vivo*, как минимум, требует факторов II (протромбин), VII, IX, X и XI (растворимые белки плазмы) сериновых протеаз; кофакторов, включая тканевой фактор трансмембранного белка, факторов V и VIII белков плазмы; фибриногена, фактора XIII трансклутамины, фосфолипиды (включая активированные тромбоциты), а также кальция. Дополнительные белки, включая калликреин, высокомолекулярный кининоген и фактор XII, необходимы для некоторых тестов свертывания крови *in vitro* и могут играть роль при патологических состояниях *in vivo*.

При гемофилии свертывание крови нарушается из-за отсутствия определенных факторов свертывания крови в плазме крови. Гемофилия В вызвана дефицитом фактора IX (FIX), который может быть результатом либо снижения синтеза, либо отсутствия белка FIX или дефектной молекулы с пониженной активностью. Принцип лечения гемофилии заключается в замещении отсутствующего фактора свертывания экзогенными концентратами факторов, сильно обогащенными FIX. Однако получение такого концентрата из крови зачастую сопровождается техническими трудностями, как описано ниже.

В результате очистки FIX от плазмы (плазменный производный FIX, pdFIX) получают почти исключительно полностью-γ-карбоксилированный FIX. Однако такая очистка FIX из плазмы является очень сложной, потому что в плазме FIX присутствует только в низкой концентрации (5 мкг/мл). Andersson, Thrombosis Research 7: 451 459 (1975). Кроме того, очистка от крови требует удаления или инактивации инфекционных агентов, таких как ВИЧ и ВГС. Также pdFIX имеет короткий период полувыведения и поэтому требует частого введения. Также доступен рекомбинантный фактор IX (rFIX), но применение его также неудобно из-за такого же короткого периода полувыведения и необходимости частого введения (например, 2-3 раза в неделю для профилактики) в виде pdFIX.

Снижение смертности, предотвращение поражения суставов и улучшение качества жизни были важными достижениями благодаря разработке плазменного и рекомбинантного FIX. Длительная защита от кровотечения будет представлять собой еще один ключевое достижение в лечении субъектов с гемофилией В. Поэтому остается потребность в улучшенном рекомбинантном FIX, который имеет более длительный период полувыведения, при сохранении эффективной активности.

Краткое описание сущности изобретения

Описаны специфические слитые белки фактора IX, которые включают в себя по меньшей мере один XTEN. В одном аспекте данного изобретения предлагается слитый белок фактора IX (FIX), содержащий полипептид FIX и по меньшей мере один XTEN, который встраивают в полипептид FIX на участке встраивания, соответствующем аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аминокислоты 103 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 105 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 142 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 149 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 162 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 166 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 174 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 224 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 226 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 228 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 413 SEQ ID NO: 2 и любой их комбинации, и при этом слитый белок FIX проявляет прокоагулянтную активность.

В данном изобретении также предлагается слитый белок FIX, содержащий полипептид FIX, и гетерологичный фрагмент, содержащий XTEN, при этом XTEN слит с С-концом полипептида FIX и содержит аминокислотную последовательность длиннее чем 42 аминокислоты и короче чем 144 аминокислоты в длину.

Слитые белки FIX по данному изобретению имеют несколько применений, включая предоставление способа профилактики, лечения, облегчения или контроля заболевания или патологического состояния, связанного с нарушением свертывания крови у пациента, имеющего для этого показание. В одном варианте осуществления данного изобретения способ включает в себя этап введения эффективного количества слитого белка FIX, описанного в данном документе (например, путем подкожного введения). В данном изобретении также предлагается способ продления периода полувыведения полипептида FIX, содержащего встраивание XTEN в полипептид FIX на участке встраивания, соответствующем аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аминокислоты 103 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 105 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 142 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 149 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 162 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 166 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 174 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 224 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 226 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 228 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 413 SEQ ID NO: 2 и любой их комбинации, и при этом слитый белок FIX проявляет прокоагулянтную активность.

NO: 2, аминокислоты 226 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 228 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 413 SEQ ID NO: 2 и любой их комбинации, тем самым конструируя слитый белок FIX, при этом белок FIX проявляет прокоагулянтную активность.

Дополнительные варианты осуществления данного изобретения будут очевидны из последующего описания и графических материалов.

Включение посредством ссылки.

Все публикации, патенты и патентные заявки, описанные в данном документе, включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка была специально и индивидуально указаны для включения посредством ссылки.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлен график, изображающий активность слитых белков FIX, содержащих XTEN из 42 аминокислот (например, AE42), встроенных в различных участках встраивания (например, аминокислота 52, аминокислота 59, аминокислота 66, аминокислота 80, аминокислота 85, аминокислота 89, аминокислота 103, аминокислота 105, аминокислота 113, аминокислота 129, аминокислота 142, аминокислота 149, аминокислота 162, аминокислота 166, аминокислота 174, аминокислота 188, аминокислота 202, аминокислота 224, аминокислота 226, аминокислота 228, аминокислота 230, аминокислота 240, аминокислота 257, аминокислота 265, аминокислота 277, аминокислота 283, аминокислота 292, аминокислота 316, аминокислота 341, аминокислота 354, аминокислота 392, аминокислота 403 и аминокислота 413, соответствующая аминокислотам SEQ ID NO: 2) или слитых с С-концом (С-конец) полипептида FIX. С-концевые последовательности слитого XTEN содержат участок расщепления тромбина между FIX и С-концевым слиянием. Ось Y демонстрирует активность FIX в процентах от активности базовой конструкции (FIX-R338L) в кондиционированных средах, оцененную с помощью хромогенного анализа. Ось X демонстрирует специфические участки встраивания в виде номера аминокислоты (соответствующей SEQ ID NO: 2) с однобуквенной аббревиатурой аминокислоты. Соответствующие домены (например, GLA, EGF1, EGF2, линкер, AP и каталитический домен), линкерные области и С-конец ("С-конец") FIX указаны ниже оси X.

На фиг. 2 представлен график, изображающий активность слитых белков FIX, содержащих XTEN из 42 аминокислот (AE42), 72 аминокислот (AE72), 144 аминокислот (AE144), 288 аминокислот (AE288) и 864 аминокислот (AE864), встроенных в различных участках встраивания (например, аминокислота 103, аминокислота 105, аминокислота 142, аминокислота 149, аминокислота 162, аминокислота 166, аминокислота 174, аминокислота 224 и аминокислота 413, соответствующие аминокислотам SEQ ID NO: 2) или слитых с С-концом (С-конец, аминокислота 415) полипептида FIX. Ось Y демонстрирует активность FIX в процентах от активности базовой конструкции (FIX-R338L) в кондиционированных средах, оцениваемую с помощью хромогенного анализа. Ось X демонстрирует домен (например, EGF2, AP и каталитические домены) или область (например, линкер и С-конец) каждого участка встраивания и специфических участков встраивания в виде номера аминокислоты (соответствующей SEQ ID NO: 2). Стрелки указывают на участки встраивания, выбранные для дальнейших экспериментов (см. фиг. 3А-3В).

На фиг. 3А представлено схематическое изображение областей и доменов варианта R338L FIX. Специфические аминокислотные остатки (например, N105, D166 и E224) и С-конец выделены как потенциальные гетерологичные фрагменты, например участки встраивания XTEN.

На фиг. 3В представлены изображения трехмерной структуры свиного FIX (PDB: 1PFX) с трех разных углов. Помечены участки встраивания N105, D166 и E224, С-конец и местоположение мутации R338L (например, в варианте R338L FIX).

На фиг. 4 обобщены результаты анализа показателей относительной активности слитых белков FIX, содержащих один или два XTEN (например, XTEN из 42, 72, 144 и 288 аминокислот), или содержащих один XTEN и один Fc-домен или FIXFc. Ось Y демонстрирует активность FIX в процентах от активности базовой конструкции (FIX-R338L) в кондиционированных средах, оцениваемую с помощью хромогенного анализа. Ось X демонстрирует номер конструкции, а таблица ниже оси X демонстрирует состав XTEN и Fc для каждой анализируемой конструкции. EGF2 (105), AP (166), петля 60 (224), С-конец XTEN или Fc указывают положение, в котором встроен или слит XTEN или Fc. Цифры (например, 42, 72, 144 и 288, указывающие размер XTEN) и "Fc" в каждой ячейке таблицы ниже оси X, указывают, какой фрагмент был встроен внутрь С-конца полипептида FIX или слит с ним.

На фиг. 5А представлен график, изображающий процентиль показателей активности свертывания плазмы при введении доз FIX относительно времени для различных слитых белков FIX с тромбин-расщепляемыми С-концевыми слияниями XTEN различной длины (например, FIX-СТ. 288 (XTEN из 288 аминокислот, например AE288) и FIX-СТ. 864 (XTEN из 864 аминокислот, например AE864)) по сравнению с rFIX и rFIXFc, что измеряли после однократного внутривенного введения болюсной дозы у мышей с гемофилией В.

На фиг. 5В представлен график, изображающий плазменный процентиль активности свертывания при введении доз FIX относительно времени для различных слитых белков FIX со слияниями XTEN различной длины, встраиваемых в домен активационного пептида (AP) (например, FIX-AP.144, FIX-AP.72 и

FIX-AP.42) по сравнению с rFIX и rFIXFc, что измеряли после однократного внутривенного введения болюсной дозы у мышей с гемофилией В.

На фиг. 5C представлен графическую компиляцию вычисленных фармакокинетических параметров однократной внутривенной болюсной дозы слитого белка FIX, изображенного на фиг. 5A и 5B. На оси Y указан процентиль восстановления активности плазмы для каждой из указанных молекул. Ось X демонстрирует рассчитанное среднее время удержания (CBU, в часах), а площадь точек представляет собой относительную вычисленную площадь под кривой на дозу (AUC/D, в ч/кг/мл).

На фиг. 6A представлен график, изображающий плазменный процентиль активности свертывания при введении доз FIX относительно времени для различных слитых белков FIX со слияниями XTEN различной длины, встраиваемых в домен активационного пептида (AP) (например, FIXFc-AP.72 и FIXFc-AP.42) или домен EGF2 (например, FIXFc-EGF.42) по сравнению с rFIX и rFIXFc, что измеряли после однократного внутривенного введения болюсной дозы мышам с гемофилией В.

На фиг. 6B представлена графическая компиляция вычисленных фармакокинетических параметров однократной внутривенной болюсной дозы слитого белка FIX, изображенного на фиг. 6A. На оси Y указан процентиль восстановления активности плазмы для каждой из указанных молекул. Ось X демонстрирует рассчитанное среднее время удержания (CBU, в часах). Площадь точек представляет собой относительную вычисленную площадь под кривой на дозу (AUC/D, в ч/кг/мл).

На фиг. 7A представлен график, изображающий плазменный процентиль показателей активности свертывания при введении FIX относительно времени: для слитого белка FIX, содержащего тромбин-расщепляемый XTEN из 288 аминокислот, слитых с С-концом полипептида FIX (rFIX-CT.288); слитого белка FIX, содержащего XTEN из 72 аминокислот, встроенных в AP-домен полипептида FIX (rFIXFc-AP.72), и слитого белка FIX, содержащего XTEN из 42 аминокислот, встроенных в EGF2-домен полипептида FIX (rFIXFc-EGF.42), по сравнению с rFIX и rFIXFc, что измеряли после однократного внутривенного введения болюсной дозы мышам с гемофилией В.

На фиг. 7B представлена графическую компиляцию вычисленных фармакокинетических параметров однократной подкожной болюсной дозы слитого белка FIX, изображенного на фиг. 7A. На оси Y указан процентиль биодоступности для каждой из указанных молекул. Ось X демонстрирует рассчитанное среднее время удержания (CBU, в часах). Площадь точек представляет собой относительную вычисленную площадь под кривой на дозу (AUC/D, в ч/кг/мл).

На фиг. 8A представлено графическое изображение времени свертывания в секундах, измеренное с помощью вращательной тромбоэластометрии (ROTEM) rFIXFc и слитого белка FIX, содержащего XTEN из 72 аминокислот, встроенных в AP-домен FIX (например, rFIXFc-AP-XTEN.72), в крови человека с гемофилией В.

На фиг. 8B представлено графическое изображение альфа-угла в градусах rFIXFc и слитого белка FIX (например, rFIXFc-AP-XTEN.72) в крови человека с гемофилией В.

Фиг. 8C представляет собой графическое изображение максимальной плотности тромба (MCF) в мм rFIXFc и слитого белка FIX (например, rFIXFc-AP-XTEN.72) в крови человека с гемофилией В.

На фиг. 9 представлен график, демонстрирующий раннюю эффективность rFIXFc-AP.72 по сравнению с rFIXFc в модели кровотечения при рассечении хвостовой вены. Представленные результаты представляют собой индивидуальную и среднюю потерю крови (мкл) через 5 мин после введения дозы, по истечению 30 мин после получения лечения и введения дозы, как указано. Звездочки указывают на достоверные значения p для несущей среды по сравнению со всеми другими видами лечения. Данные указывают на аналогичную или более высокую эффективность у мышей, которым вводили rFIXFc-AP.72, по сравнению с rFIXFc.

На фиг. 10 представлен график, демонстрирующий процент выживших мышей HemB (ось Y), значения которого нанесено в зависимости от времени, прошедшего после рассечения хвостовой вены (ось X). Всем мышам за 72 ч до рассечения хвостовой вены предварительно внутривенно вводили FIXFc (пунктирные линии) или подкожно -FIXFc-AP.72 в указанных дозах в МЕ/кг (FIXFc-AP.72: 100 МЕ/кг (сплошной черный круг), 50 МЕ/кг (сплошной серый треугольник) и 15 МЕ/кг (сплошной перевернутый серый треугольник); rFIXFc: 100 МЕ/кг (незаштрихованный круг), 50 МЕ/кг (незаштрихованный треугольник) и 15 МЕ/кг (незаштрихованный перевернутый треугольник); и несущую среду (сплошной серый круг). Графики выживания мышей, которым вводили либо rFIXFc, либо FIXFc-AP.72, достоверно отличались от графиков выживания мышей, получавших несущую среду ($p < 0,0001$, логарифмический ранговый критерий (критерий Кокса-Мантеля)).

На фиг. 11A представлен график, демонстрирующий уровни активности FX в плазме, измеренные с помощью одноэтапного анализа плазмы в зависимости от времени у мышей с гемофилией В, которым вводили однократную болюсную дозу (200 МЕ/кг) rFIX (серый цвет) или слитого белка rFIXFc-AP.72 (черный цвет), либо посредством внутривенной (пунктирные линии), либо подкожной инъекции (сплошные линии).

На фиг. 11B представлены фармакокинетические параметры, определенные с помощью некомпартментного анализа (NCA) с применением программного обеспечения Phoenix WinNonLin 6.2.1 (Pharsight, Certara).

На фиг. 12A представлено схематическое изображение, иллюстрирующее доменную структуру rFIXFc-AP.72 одноцепочечного Fc.

На фиг. 12B представлено схематическое изображение, иллюстрирующее доменную структуру rFIXFc-AP.72 двухцепочечного Fc. "FIX HC" означает тяжелую цепь FIX; "FIX LC" означает легкую цепь FIX, которая включает в себя EGF- и GLA-домены FIX; а "AP" означает активационный пептид FIX.

На фиг. 13 представлена таблица, обобщающая конструкции FIX-XTEN, применяемые в примерах, с идентификационным номером соответствующей последовательности, описанием и кодом плазмиды.

Подробное описание сущности изобретения

В данном изобретении предлагается слитый белок FIX, содержащий полипептид FIX и по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, способы его получения и применения. В некоторых аспектах слитый белок FIX содержит по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, встроенный в полипептид FIX, слитый с С-концом полипептида FIX, или и то и другое, при этом слитый белок FIX проявляет про-коагулянтную активность. В конкретном аспекте гетерологичный фрагмент представляет собой XTEN.

I. Определения.

По тексту всего этого описания термин, обозначающий объект в единственном числе, относятся к одному или большему количеству указанных объектов; например, термин "полинуклеотид" означает один или большее количество полинуклеотидов. Таким образом, термины в единственном числе, "один или большее количество" и "по меньшей мере один" в данном документе могут применяться взаимозаменяемо.

Кроме того, в данном контексте "и/или" следует рассматривать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, термин "и/или", применяемый во фразе данного документа, такой как "А и/или В", предназначен для включения "А и В", "А или В", "А" (отдельно) и "В" (отдельно). Аналогично, термин "и/или", применяемый во фразе, такой как "А, В и/или С", предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно); и С (отдельно). Подразумевается, что везде, где в данном документе аспекты описаны с термином "содержащий", в других случаях также предусмотрены аналогичные аспекты, описанные с применением терминов "состоящий из" и/или "состоящий, по существу, из". Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые в данном документе, имеют то же значение, что и общедоступное обычному специалисту в данной области техники, к которой относится данное изобретение, например, в Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, можно найти общие значения многих терминов, применяемых в данном описании.

Единицы, префиксы и символы обозначаются в их общепринятой форме Systeme International de Unites (SI). Числовые диапазоны включают в себя числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, аминокислотные последовательности записываются слева направо в аминокислотной ориентации. Заголовки, представленные в данном документе, не являются ограничениями различных аспектов изобретения, которые могут быть осуществлены со ссылкой на спецификацию в целом.

Соответственно, термины, определенные ниже, более полно определяются ссылкой на спецификацию в целом.

В данном контексте термин "около" применяется для обозначения примерно, приблизительно, вокруг, или в области. Когда термин "около" применяется в сочетании с числовым диапазоном, он изменяет этот диапазон, расширяя границы выше и ниже установленных числовых значений. В общем, термин "около" может изменить числовое значение выше и ниже указанного значения с помощью дисперсии, например 10% вверх или вниз (выше или ниже).

Термин "полинуклеотид" или "нуклеотид" предназначен для охвата отдельной нуклеиновой кислоты, а также множества нуклеиновых кислот, и относится к выделенной молекуле или конструкции нуклеиновой кислоты, например матричной РНК (мРНК) или плазмидной ДНК (пДНК). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полинуклеотид содержит обычную фосфодиэфирную связь или альтернативную связь (например, амидную связь, такую как обнаруженная в пептидных нуклеиновых кислотах (ПНК)). Термин "нуклеиновая кислота" относится к любому одному или большему количеству сегментов нуклеиновой кислоты, например фрагментов ДНК или РНК, присутствующих в полинуклеотиде. Под термином "выделенная" нуклеиновая кислота или полинуклеотид подразумевается молекула нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, которая была удалена из ее нативной среды, например рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий полипептид FIX, содержащийся в векторе, считается выделенным для целей данного изобретения. Другие примеры выделенного полинуклеотида включают в себя рекомбинантные полинуклеотиды, которые содержатся в гетерологичных клетках-хозяевах или очищены (частично или по существу) от других полинуклеотидов в растворе. Выделенные молекулы РНК включают в себя РНК-транскрипты полинуклеотидов *in vivo* или *in vitro* по данному изобретению. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты согласно данному изобретению дополнительно включают в себя такие молекулы, которые получены синтетически. Кроме того, полинуклеотид или нуклеиновая кислота могут включать в себя регуляторные элементы, такие как промоторы, энхансеры, участки связывания рибосом или сигналы терминации транскрипции.

В данном контексте термин "кодирующая область" или "кодирующая последовательность" представляет собой часть полинуклеотида, которая состоит из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Несмотря на то, что "стоп-кодон" (TAG, TGA или TAA) обычно не транслируется в аминокислоту, его можно рассматривать как часть кодирующей области, но любые фланкирующие последовательности, например промоторы, участки связывания рибосом, терминаторы транскрипции, интроны и тому подобное, не являются частью кодирующей области. Границы кодирующей области обычно определяются стартовым кодоном на 5'-конце, кодирующим аминоконец результирующего полипептида и трансляционным стоп-кодоном на 3'-конце, кодирующим карбоксильный конец полученного полипептида. Две или большее количество кодирующих областей по данному изобретению могут присутствовать в одной полинуклеотидной конструкции, например на одном векторе или в отдельных полинуклеотидных конструкциях, например на отдельных (разных) векторах. Из этого следует, что один вектор может содержать только одну кодирующую область или содержать две или большее количество кодирующих областей, например, один вектор может отдельно кодировать связывающий домен-А и связывающий домен-В, как описано ниже. Кроме того, вектор, полинуклеотид или нуклеиновая кислота по данному изобретению могут кодировать гетерологичные кодирующие области, либо слитые, либо неслитые с нуклеиновой кислотой, кодирующей связывающий домен по данному изобретению. Гетерологичные кодирующие области включают в себя без ограничения специализированные элементы или мотивы, такие как секреторный сигнальный пептид или гетерологичный функциональный домен.

Определенные белки, секретируемые клетками млекопитающих, ассоциированы с секреторным сигнальным пептидом, который отщепляется от зрелого белка сразу после начала экспорта растущей белковой цепи через гранулярный эндоплазматический ретикулум. Специалистам в данной области техники известно, что сигнальные пептиды обычно являются слиты с N-концом полипептида и отщепляются от полного или "полноразмерного" полипептида с получением секретируемой или "зрелой" формы полипептида. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения нативный сигнальный пептид или функциональное производное этой последовательности, которое сохраняет способность направлять секрецию полипептида, является функционально связанным с ним. В альтернативном варианте можно применять гетерологичный сигнальный пептид млекопитающих, например, тканевой активатор плазминогена человека (ТРА) или сигнальный пептид β -глюкуронидазы мыши или его функциональное производное.

Термин "по ходу транскрипции" относится к нуклеотидной последовательности, которая расположена в положении 3' к эталонной нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения нуклеотидные последовательности, расположенные по ходу транскрипции, относятся к последовательностям, которые следуют за начальной точкой транскрипции, например, кодон инициации трансляции гена расположен по ходу направления транскрипции от ее начального участка. Расположение "по ходу транскрипции" также может относиться к пептидной последовательности, которая расположена С-терминально к эталонной пептидной последовательности.

Термин "против хода транскрипции" относится к нуклеотидной последовательности, которая расположена в положении 5' к эталонной нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения вышеописанные нуклеотидные последовательности относятся к последовательностям, которые расположены на 5'-стороне кодирующей области или начальной точки транскрипции, например, большинство промоторов расположены в обратном направлении транскрипции от ее начального участка. Расположение "против хода транскрипции" также может относиться к пептидной последовательности, которая расположена N-терминально к эталонной пептидной последовательности.

В данном контексте термин "регуляторная область" относится к нуклеотидным последовательностям, расположенным против хода транскрипции (5' некодирующие последовательности), внутри или по ходу транскрипции (3' некодирующие последовательности) кодирующей области и которые влияют на транскрипцию, процессинг РНК, стабильность или трансляцию соответствующей кодирующей области. Регуляторные области могут включать в себя промоторы, трансляционные лидерные последовательности, интроны, последовательности распознавания полиаденилирования, участки процессинга РНК, участки эффекторного связывания и структуры "петля-на-стебле". Если кодирующая область предназначена для экспрессии в эукариотической клетке, сигнал полиаденилирования и последовательность терминации транскрипции обычно будут располагаться в положении 3' к кодирующей последовательности.

Полинуклеотид, который кодирует генный продукт, например полипептид, может включать в себя промотор и/или другие элементы управления транскрипцией или трансляцией, функционально связанные с одной или большим количеством кодирующих областей. В функциональной связи кодирующая область для генного продукта, например полипептида, ассоциирована с одной или большим количеством регуляторных областей таким образом, чтобы экспрессировать генный продукт под влиянием или контролем регуляторной области (областей), например, кодирующая область и промотор являются "функционально связанными", если индукция промоторной функции приводит к транскрипции мРНК, кодирующей генный продукт, кодируемый кодирующей областью, и если природа связи между промотором и кодирующей областью не нарушает способности промотора направлять экспрессию генного продукта или не нарушает способности ДНК-матрицы транскрибироваться. Другие элементы контроля транскрип-

ции, помимо промотора, например энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминции транскрипции, также могут быть функционально связаны с кодирующей областью для прямой экспрессии генных продуктов.

Специалистам в данной области техники известно множество областей для контроля транскрипции. Такие области включают в себя, без ограничения, области контроля транскрипции, которые функционируют в клетках позвоночных, такие как, но не ограничиваясь ими, сегменты промотора и энхансера из цитомегаловирусов (непосредственный ранний промотор в сочетании с интроном-А), вируса обезьян 40 (ранний промотор) и ретровирусов (такого как вирус саркомы Рауса). Другие области контроля транскрипции включают в себя такие области, которые получены из генов позвоночных, такие как актин, белок теплового шока, гормон роста крупного рогатого скота и Р-глобин кролика, а также другие последовательности, способные контролировать экспрессию генов в эукариотических клетках. Дополнительные пригодные области контроля транскрипции включают тканеспецифические промоторы и энхансеры, а также промоторы, индуцируемые лимфокинами (например, промоторы, индуцируемые интерферонами или интерлейкинами).

Аналогично, специалистам в данной области техники известно множество элементов контроля трансляции. Такие элементы включают в себя, но не ограничиваются ими, участки связывания рибосомы, кодоны инициации и терминции трансляции, а также элементы, полученные из пикорнавирусов (в частности, участок внутренней посадки рибосомы или IRES, также называемый последовательностью CITE).

В данном контексте термин "экспрессия" относится к способу, посредством которого полинуклеотид продуцирует генный продукт, например РНК или полипептид. Этот термин включает в себя, без ограничения, транскрипцию полинуклеотида в матричную РНК (мРНК), транспортную РНК (тРНК), малую шпильчатую РНК (shРНК), малую интерферирующую РНК (siРНК) или любой другой продукт РНК, а также трансляцию мРНК в полипептид. В результате экспрессии получают "генный продукт". В данном контексте генный продукт может быть либо нуклеиновой кислотой, например матричной РНК, продуцируемой транскрипцией гена, либо полипептидом, который транслируется из транскрипта. Генные продукты, описанные в данном документе, дополнительно включают в себя нуклеиновые кислоты с посттранскрипционными модификациями, например полиаденилированием или сплайсингом, или полипептиды с посттрансляционными модификациями, например метилированием, гликозилированием, добавлением липидов, связью с другими белковыми субъединицами или протеолитическим расщеплением.

"Вектор" относится к любому носителю для клонирования и/или переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Вектор может быть репликоном, к которому может быть присоединен другой сегмент нуклеиновой кислоты, чтобы вызвать репликацию прикрепленного сегмента. Термин "репликон" относится к любому генетическому элементу (например, плазмиде, фагу, космиде, хромосоме, вирусу), которая функционирует как автономная единица репликации *in vivo*, т.е. способна к репликации под своим собственным контролем. Термин "вектор" включает в себя как вирусные, так и невирусные носители для введения нуклеиновой кислоты в клетку *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В данной области техники известно и применяется большое количество векторов, включая, например, плазмиды, модифицированные эукариотические вирусы или модифицированные бактериальные вирусы. Встраивание полинуклеотида в пригодный вектор можно осуществить путем лигирования соответствующих полинуклеотидных фрагментов в выбранный вектор, который имеет комплементарные "липкие" концы. Векторы можно сконструировать для кодирования селективируемых маркеров или репортеров, которые обеспечивают выбор или идентификацию клеток, которые включены в вектор. Экспрессия селективируемых маркеров или репортеров позволяет идентифицировать и/или выбирать клетки-хозяева, которые включают и экспрессируют другие кодирующие области, содержащиеся на векторе. Примеры селективируемых маркерных генов, известных и применяемых в данной области техники, включают в себя: гены, обеспечивающие резистентность к ампициллину, стрептомицину, гентамицину, канамицину, гигромицину, неомицину, пурамицину, гербициду бифлафос, сульфонамиду и тому подобным препаратам; и гены, которые применяются в качестве фенотипических маркеров, т.е. антоцианиновые регуляторные гены, ген изопентанилтрансферазы и тому подобное. Примеры репортеров, известных и применяемых в данной области техники, включают в себя: люциферазу (Люк), зеленый флуоресцентный белок (GFP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), -галактозидазу (LacZ), -глюкуронидазу (Gus) и тому подобное. Селективируемые маркеры также могут рассматриваться в качестве репортеров.

Термин "плаزمид" относится к внехромосомному элементу, часто несущему ген, который не является частью центрального метаболизма клетки и обычно представляет собой круглые двухцепочечные молекулы ДНК. Такие элементы могут быть автономно реплицирующимися последовательностями, последовательностями интеграции генома, фаговыми или нуклеотидными последовательностями, линейной, круговой или суперспиральной, одно- или двухцепочечной ДНК или РНК, полученной из любого источника, в котором ряд нуклеотидных последовательностей соединенный или рекомбинированный в уникальную конструкцию, которая способна вводить фрагмент промотора и последовательность ДНК для выбранного генного продукта вместе с соответствующей 3'-нетранслируемой последовательностью в клетку. Эукариотические вирусные векторы, которые можно применять, включают в себя, но не ограничиваются ими, векторы аденовируса, векторы ретровируса, векторы адено-ассоциированного вируса и

поксвируса, например векторы вируса осповакцины, векторы бакуловируса или векторы вируса герпеса. Невирусные векторы включают в себя плазмиды, липосомы, электрически заряженные липиды (цитофектины), ДНК-белковые комплексы и биополимеры.

Термин "клонировующий вектор" относится к "репликону", который представляет собой единицу длины нуклеиновой кислоты, которая последовательно реплицируется и содержит источник репликации, такой как плазида, фаг или космида, к которым может быть присоединен другой сегмент нуклеиновой кислоты с целью обеспечения репликации прикрепленного сегмента. Определенные векторы клонирования способны к репликации в одном типе клеток, например в бактериях, а к экспрессии - в другом, например в эукариотических клетках. Как правило, клонирующие векторы обычно содержат одну или большее количество последовательностей, которые можно применять для отбора клеток, содержащих вектор, и/или один или большее количество множественных участков клонирования для введения последовательностей нуклеиновых кислот, представляющих интерес.

Термин "экспрессионный вектор" относится к носителю, предназначенному для осуществления экспрессии встроенной последовательности нуклеиновой кислоты после встраивания в клетку-хозяина. Встроенную последовательность нуклеиновой кислоты приводят в функциональную связь с регуляторными областями, как описано выше. Векторы вводят в клетки-хозяева с помощью способов, хорошо известных в данной области техники, например трансфекции, электропорации, микроинъекции, трансдукции, слияния клеток, осаждения фосфатом кальция, декстраном DEAE, липофекции (лизосомального слияния), применения генной пушки или транспортера вектора ДНК.

В данном контексте термины "культура", "культивировать" и "культивирование" означают инкубацию клеток в условиях *in vitro*, которые обеспечивают рост или деление клеток, или поддерживают клетки в живом состоянии. В данном контексте термин "культивируемые клетки" означает клетки, которые размножаются *in vitro*.

В данном контексте термин "полипептид" предназначен для охвата отдельного "полипептида", а также множества "полипептидов", и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" относится к любой цепи или цепям из двух или большего количества аминокислот и не относится к определенной длине продукта. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, "белок", "аминокислотная цепь" или любой другой термин, применяемый для обозначения цепи или цепей из двух или большего количества аминокислот, включены в определение "полипептид" и термин "полипептид" может применяться вместо или взаимозаменяемо с любым из этих терминов. Термин "полипептид" также относится к продуктам пост-экспрессионных модификаций полипептида, включая без ограничения гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию известными защищающими/блокирующими группами, протеолитическое расщепление или модификацию не встречающихся в природе аминокислот. Полипептид может быть производным от природного биологического источника или может быть получен посредством рекомбинантной технологии, но не обязательно транслирован из обозначенной последовательности нуклеиновой кислоты. Полипептид может генерироваться любым способом, в том числе путем химического синтеза. Термин "выделенный" полипептид или его фрагмент, вариант или его производное относится к полипептиду, который не находится в его естественной среде. Особого уровня очистки для этого не требуется, например, выделенный полипептид можно просто удалить из его нативной или естественной среды. Рекомбинантно продуцируемые полипептиды и белки, экспрессированные в клетках-хозяевах, считаются выделенными для целей изобретения, а также являются нативными или рекомбинантными полипептидами, которые были разделены, фракционированы или частично или, по существу, очищены любым пригодным способом.

В данном контексте термин "клетка-хозяин" относится к клетке или популяции клеток, содержащих или способных содержать рекомбинантную нуклеиновую кислоту. Клетки-хозяева могут быть прокариотическими клетками (например, *E. coli*), или, в альтернативном варианте, клетки-хозяева могут быть эукариотическими, например, грибковыми клетками (например, дрожжевыми клетками, такими как *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, или *Schizosaccharomyces pombe*) и различными клетками животных, такими как клетки насекомых (например, Sf-9) или клетками млекопитающих (например, HEK293F, CHO, COS-7, NIH-3T3).

Также в данное изобретение включены фрагменты или варианты полипептидов и любая их комбинация. Термин "фрагмент" или "вариант", когда речь идет о полипептидных связывающих доменах или связывающих молекулах по данному изобретению, включает любые полипептиды, которые сохраняют, по меньшей мере, некоторые из свойств (например, аффинность связывания FcRn для FcRn-связывающего домена или Fc-варианта, или активность коагуляции для варианта FIX) эталонного полипептида. Фрагменты полипептидов включают в себя протеолитические фрагменты, а также фрагменты делеции в дополнение к специфическим фрагментам антител, которые обсуждаются в данном документе в другом месте, но не включают в себя встречающийся в природе полноразмерный полипептид (или зрелый полипептид). Варианты полипептидных связывающих доменов или связывающих молекул по данному изобретению включают в себя фрагменты, как описано выше, а также полипептиды с измененными аминокислотными последовательностями из-за аминокислотных замещений, делеций или вставок. Вари-

анты могут быть природными или не встречающимися в природе. Не встречающиеся в природе варианты можно получить с помощью известных в данной области техники методов мутагенеза. Вариантные полипептиды могут содержать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, делеции или добавления. Один конкретный вариант FIX, описанный в данном документе, представляет собой вариант R338L FIX (Padua) (SEQ ID NO: 2). См., например, публикацию Simioni, P., et al., "X-Linked Thrombophilia with a Mutant Factor IX (Factor IX Padua)," *NEJM* 361: 1671-75 (October 2009), которая включена в данный документ посредством ссылки в полном объеме. "Консервативная замена аминокислот" представляет собой "консервативную аминокислотную замену", в которой один аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком, имеющим аналогичную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, если аминокислоту в полипептиде заменяют другой аминокислотой из аналогичного семейства боковой цепи, замена считается консервативной. В другом варианте осуществления данного изобретения последовательность аминокислот можно консервативно заменить структурно аналогичной последовательностью, которая отличается по порядку и/или составу членов семейства боковой цепи.

Термин "процент идентичности последовательности" между двумя полинуклеотидными или полипептидными последовательностями относится к числу идентичных совпадающих положений, общих для последовательностей в окне сравнения, с учетом дополнений или делеции (т.е. гэпов), которые должны быть введены для оптимального выравнивания двух последовательностей. Совпадающее положение представляет собой любое положение, в котором идентичный нуклеотид или аминокислота представлена как в целевой, так и в эталонной последовательностях. Гэпы, представленные в целевой последовательности, не учитывают, поскольку гэпы не являются нуклеотидами или аминокислотами. Аналогичным образом, не учитывают гэпы, представленные в эталонной последовательности, поскольку подсчитывают целевые нуклеотидные или аминокислотные последовательности, а не нуклеотиды или аминокислоты из эталонной последовательности.

Процент идентичности последовательности вычисляют путем определения количества положений, в которых идентичный аминокислотный остаток или основание нуклеиновой кислоты встречается в обеих последовательностях, для получения числа совпадающих положений, путем деления количества совпадающих положений на общее количество положений в окне сравнения и умножения результата на 100 для получения процента идентичности последовательности. Сравнение последовательностей и определение идентичности процентной последовательности между двумя последовательностями можно выполнить с помощью общедоступного программного обеспечения как для онлайн-применения, так и требующего загрузки. Пригодные программные продукты доступны из различных источников, для выравнивания как белковых, так и нуклеотидных последовательностей. Одной из пригодных программ для определения процента идентичности последовательности является *bl2seq*, часть пакета программ *BLAST*, доступных на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации *BLAST* правительства США (blast.ncbi.nlm.nih.gov). *Bl2seq* выполняет сравнение между двумя последовательностями, применяя либо алгоритм *BLASTN*, либо *BLASTP*. *BLASTN* применяют для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, тогда как *BLASTP* применяют для сравнения аминокислотных последовательностей. Другие пригодные программы представляют собой, например, *Needle*, *Stretcher*, *Water*, или *Matcher*, часть пакета биоинформационных программ *EMBOSS*, и доступны на сайте Европейского института биоинформатики (EBI) по адресу: www.ebi.ac.uk/Tools/psa.

Различные области в пределах одной целевой полинуклеотидной или полипептидной последовательности, которая выравнивается с полинуклеотидной или полипептидной эталонной последовательностью, могут иметь свой собственный процент идентичности последовательности. Следует отметить, что процент идентичности последовательности округляется до ближайшей десятой, например 80,11, 80,12, 80,13 и 80,14 округляется до 80,1, а 80,15, 80,16, 80,17, 80,18 и 80,19 округляется до 80,2. Также отмечается, что значение длины всегда будет целым числом.

Специалисту в данной области техники будет понятно, что генерация выравнивания последовательности для вычисления процента идентичности последовательности не ограничивается бинарными сравнениями "последовательность-последовательность", исключительно управляемыми данными первичной последовательности. Выравнивания последовательностей можно получить из множественных выравниваний последовательностей. Одной из пригодных программ для генерации множественных выравниваний последовательностей является *ClustalW2*, доступная по адресу: www.clustal.org. Другой пригодной программой является *MUSCLE*, доступная по адресу: www.drive5.com/muscle/ClustalW2 и *MUSCLE* являются альтернативно доступными, например, в EBI.

Также будет понятно, что выравнивания последовательностей можно получить путем интеграции

данных последовательности с данными из гетерогенных источников, таких как структурные данные (например, кристаллографические белковые структуры), функциональные данные (например, расположение мутаций) или филогенетические данные. Пригодной программой, которая интегрирует гетерогенные данные для генерации множественного выравнивания последовательностей, является программа T-Coffee, доступная по адресу: www.tcoffee.org, и, альтернативно, например, в EBI. Также будет понятно, что окончательное выравнивание, применяемое для вычисления процента идентичности последовательности, можно отобразить либо автоматически, либо вручную.

В данном контексте термин "аминокислота, соответствующая", "участок, соответствующий" или "эквивалентная аминокислота" в последовательности белка фактора IX, идентифицируется путем выравнивания с целью максимизации идентичности или сходства между первой последовательностью FIX и второй последовательностью FIX. Номер, применяемый для идентификации эквивалентной аминокислоты во второй последовательности FIX, основывается на номере, применяемом для идентификации соответствующей аминокислоты в первой последовательности FIX.

В данном контексте термин "участок встраивания" относится к номеру аминокислотных остатков в полипептиде aFIX (обычно это зрелый полипептид FIX) или его фрагменте, варианте или его производном, который непосредственно расположен против хода транскрипции от положения, в которое можно встроить гетерологичный фрагмент. "Участок встраивания" указывается как номер, причем этот номер представляет собой номер аминокислоты в варианте R338L FIX (Padua) (SEQ ID NO: 2), которому соответствует участок встраивания, который непосредственно расположен N-терминально относительно положения, где осуществляется встраивание, например, фраза "домен EGF2 содержит XTEN на участке встраивания, который соответствует аминокислоте 105 SEQ ID NO: 2" означает, что гетерологичный фрагмент расположен между двумя аминокислотами, соответствующим аминокислоте 105 и аминокислоте 106 SEQ ID NO: 2. Однако специалист в данной области техники легко сможет идентифицировать соответствующее положение в любом варианте FIX, при этом данное изобретение не ограничивается встраиваниями, выполненными исключительно в варианте R338L FIX (Padua). Скорее, описанные в данном документе встраивания можно осуществить в любом варианте FIX или его фрагменте, имеющем прокоагулянтную активность, в положении, соответствующем положению варианта R338L FIX.

В данном контексте фраза "непосредственно по ходу транскрипции от аминокислоты" относится к положению рядом с концевой карбоксильной группой аминокислоты. Аналогично, фраза "непосредственно против хода транскрипции от аминокислоты" относится к положению рядом с концевой аминокислотной группой аминокислоты. Поэтому, в данном контексте фраза "между двумя аминокислотами участка встраивания" относится к положению, в котором XTEN или любой другой полипептид встроен между двумя смежными аминокислотами.

В данном контексте термины "встроенный", "встроен", "встроен в" или грамматически связанные с ними термины, относятся к положению XTEN в слитом полипептиде по сравнению с аналогичным положением в варианте R338L FIX (Padua) (SEQ ID NO: 2). Специалистам в данной области техники будет понятно, как идентифицировать соответствующие положения встраивания в отношении других полипептидных последовательностей FIX, таких как показанные как SEQ ID NO: 1. В данном контексте указанные термины относятся к характеристикам рекомбинантного полипептида FIX по сравнению с вариантом R338L FIX (Padua) и не указывают, не подразумевают или не предполагают любые способы или процесс, с помощью которых получают слитый полипептид, например, в отношении представленного в данном документе слитого полипептида фраза "XTEN встраивают в домен EGF2 непосредственно по ходу транскрипции после остатка 105 полипептида FIX" означает, что слитый полипептид содержит XTEN непосредственно по ходу транскрипции после аминокислоты, которая соответствует аминокислоте 105 в варианте R338L FIX (SEQ ID NO: 2), например ограниченные аминокислотами, соответствующими аминокислотам 105 и 106 варианта R338L FIX.

"Слитый" или "химерный" белок содержит первую аминокислотную последовательность, связанную со второй аминокислотной последовательностью, с которой она не связана естественным образом. Аминокислотные последовательности, которые обычно существуют в отдельных белках, могут быть объединены в слитый полипептид, или аминокислотные последовательности, которые обычно существуют в одном и том же белке, могут быть помещены в новое расположение в слитом полипептиде, например, слияние домена FIX по данному изобретению с Fc-доменом Ig. Слитый белок получают, например, с помощью химического синтеза или путем создания и трансляции полинуклеотида, в котором пептидные области кодируются в желаемом соотношении. Слитый белок может дополнительно содержать вторую аминокислотную последовательность, связанную с первой аминокислотной последовательностью, с помощью ковалентной, непептидной связи или нековалентной связи.

Термины "гетерологичный" и "гетерологичный фрагмент" означают, что полинуклеотид, полипептид или другой фрагмент получают от объекта, отличного от объекта, с которым он сравнивается, например, гетерологичный полипептид может быть синтетическим или получен от другого вида, другого типа клеток индивидуума или того же или другого типа клеток различных индивидуумов. В одном аспекте гетерологичный фрагмент представляет собой полипептид, слитый с другим полипептидом, с образованием слитого полипептида или белка. В другом аспекте гетерологичный фрагмент представляет собой неполипептид,

такой как ПЭГ, конъюгированный с полипептидом или белком. В данном контексте термин "период полувыведения" относится к биологическому периоду полураспада конкретного полипептида *in vivo*. Период полувыведения может быть представлен временем, требуемым для выведения из кровообращения и/или других тканей животного половины вводимого субъекту количества вещества. Если кривая клиренса данного полипептида строится как функция времени, кривая является обычно двухфазной с быстрой α -фазой и более длинной β -фазой. Как правило, α -фаза представляет собой уравнивание вводимого полипептида между внутри- и внесосудистым пространством и частично определяется размером полипептида. Как правило, β -фаза представляет катаболизм полипептида во внутрисосудистом пространстве. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения FIX и слитые белки, содержащие FIX, являются монофазными и, таким образом, не имеют α -фазы, а имеют только одну β -фазу. Поэтому в некоторых вариантах осуществления данного изобретения термин "период полувыведения", применяемый в данном документе, относится к периоду полувыведения полипептида в β -фазе. Типичный период полувыведения β -фазы антигена человека у человека составляет 21 день. В данном контексте термины "связанный" и "слитый" относятся к первой аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, ковалентно или нековалентно присоединенной ко второй аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, соответственно. Первая аминокислотная или нуклеотидная последовательность может быть непосредственно соединена или сопоставлена со второй аминокислотной или нуклеотидной последовательностью или, альтернативно, промежуточная последовательность может ковалентно соединять первую последовательность со второй последовательностью. Термин "связанный" означает не только слияние первой аминокислотной последовательности со второй аминокислотной последовательностью на С-конце или N-конце, но также включает в себя встраивание всей первой аминокислотной последовательности (или второй аминокислотной последовательности) в любые две аминокислоты во второй аминокислотной последовательности (или первой аминокислотной последовательности, соответственно). В одном варианте осуществления данного изобретения первая аминокислотная последовательность связана со второй аминокислотной последовательностью посредством пептидной связи или линкера. Первая нуклеотидная последовательность может быть связана со второй нуклеотидной последовательностью посредством фосфодиэфирной связи или линкера. Линкер может представлять собой пептид или полипептид (для полипептидных цепей) или нуклеотидную или нуклеотидную цепь (для нуклеотидных цепей) или любой химический фрагмент (как для полипептидных, так и для полинуклеотидных цепей). Термин "связанный" также обозначается дефисом (-). В данном контексте термин "связанный посредством" относится к ковалентной или нековалентной связи, образованной между первой аминокислотной цепью и второй аминокислотной цепью. В одном варианте осуществления данного изобретения термин "связанный посредством" означает ковалентную, непептидную связь или нековалентную связь. Эта связь может быть обозначена двоеточием, т.е. (:). В другом варианте осуществления данного изобретения это обозначение означает ковалентную связь, за исключением пептидной связи, например, аминокислотный цистеин включает тиольную группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик с тиольной группой на втором остатке цистеина. В большинстве встречающихся в природе молекул IgG, области CH1 и CL связаны посредством дисульфидной связи, при этом две тяжелые цепи связаны посредством двух дисульфидных связей в положениях, соответствующих 239 и 242, с применением системы нумерации Kabat (позиция 226 или 229, система нумерации EU). Примеры ковалентных связей включают в себя, но не ограничиваются ими, пептидную связь, металлическую связь, водородную связь, дисульфидную связь, сигма-связь, пи-связь, дельта-связь, гликозидную связь, агностическую связь, изогнутую связь, дипольную связь, обратную связь P_i , двойную связь, тройную связь, четверную связь, пятерную связь, шестерную связь, конъюгацию, гиперконъюгацию, ароматичность, гаптическую связь или антисвязь. Неограничивающие примеры нековалентной связи включают в себя ионную связь (например, катион-пи-связь или солевая связь), металлическую связь, водородную связь (например, диводородная связь, диводородный комплекс, низкобарьерная водородная связь или симметричная водородная связь), силу Ван-дер-Уоллса, лондоновскую дисперсионную силу, механическую связь, галогенную связь, ауофильность, интеркаляцию, стэкинг-связь, энтропийную силу или химическую полярность. В данном контексте термин "участок расщепления" или "участок ферментативного расщепления" относится к участку, распознаваемому ферментом. Некоторые участки ферментативного расщепления содержат участок внутриклеточного процессинга. В одном варианте осуществления данного изобретения полипептид имеет участок ферментативного расщепления, расщепляемый ферментом, который активируется во время каскада свертывания крови, в результате чего расщепление таких участков происходит в месте образования сгустка. Примеры таких участков включают в себя, например, те участки, которые распознаются тромбином, фактором XIa или фактором Xa. Примеры участков расщепления FXIa включают в себя, например, TQSFNDFTR (SEQ ID NO: 166) и SVSQTSLKTR (SEQ ID NO: 167). Примеры участков расщепления тромбина включают в себя, например, DFLAEGGGVR (SEQ ID NO: 168), TTKIKPR (SEQ ID NO: 169), LVPRG (SEQ ID NO: 170) и ALRPR (SEQ ID NO: 171). В данной области техники известны также и другие участки ферментативного расщепления.

В данном контексте термин "участок процессинга" или "участок внутриклеточного процессинга" относится к типу участка ферментативного расщепления в полипептиде, который является мишенью для

ферментов, которые функционируют после трансляции полипептида. В одном варианте осуществления данного изобретения такие ферменты функционируют во время транспортировки из просвета Гольджи в отсек транс-Гольджи. Ферменты внутриклеточного процессинга расщепляют полипептиды перед секрецией белка из клетки. Примеры таких участков процессинга включают в себя, например, те участки, на которые нацелено семейство эндопептидаз PACE/фурин (где PACE представляет собой аббревиатуру для термина "фермент, расщепляющий белок в месте спаренных основных аминокислот" (Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme)). Эти ферменты локализуются на мембране Гольджи и расщепляют белки на карбокситерминальной стороне мотива последовательности Arg-[любой остаток]-(Lys или Arg)-Arg. В данном контексте термин "семейство ферментов-фуринов" включает в себя, например, PCSK1 (также известный как PC1/PC3), PCSK2 (также известный как PC2), PCSK3 (также известный как фурин или PACE), PCSK4 (также известный как PC4), PCSK5 (также известный как PC5 или PC6), PCSK6 (также известный как PACE4) или PCSK7 (также известный как PC7/LPC, PC8 или SPC7). В данной области техники известны и другие участки процессинга. В данном контексте термин "пригодный для процессинга линкер" означает линкер, содержащий участок внутриклеточного процессинга. Следует понимать, что в конструкциях, которые включают в себя более одного участка процессинга или расщепления, такие участки могут быть одинаковыми или разными.

В данном контексте термин "пригодный для процессинга линкер" относится к линкеру, содержащему по меньшей мере один участок внутриклеточного процессинга, который описан в другом месте данного документа.

В данном контексте термин "исходный уровень" означает самый низкий измеренный уровень FIX в плазме у субъекта до введения дозы. Уровни FIX в плазме можно измерять в двух моментах времени до введения дозы: на скрининговом визите и непосредственно перед введением дозы. В альтернативном варианте, (a) исходный уровень у субъектов, активность FIX у которых до лечения составляет <1%, при этом у них не определяется антиген FIX, и они имеют нонсенс-генотипы, которые могут быть определены как 0%, (b) исходный уровень у субъектов, активность FIX у которых до лечения составляет <1%, и которые имеют антиген FIX, определяемый на уровне 0,5%, (c) исходный уровень у субъектов, активность FIX у которых до лечения составляет от 1 до 2%, и является C_{min} (самая низкая активность во всем исследовании ФК) и (d) исходный уровень у субъектов, активность FIX у которых до лечения составляет $\geq 2\%$ и может быть установлена на уровне 2%.

В данном контексте термин "субъект" означает человека. В данном контексте термин "субъект" включает в себя индивидуума, который, как известно, имел по меньшей мере один эпизод неконтролируемого кровотечения; у индивидуума диагностировано какое-либо заболевание или нарушение, ассоциированное с эпизодами неконтролируемого кровотечения, например, заболевание или нарушение, ассоциированное с кровотечением, например гемофилия В; индивидуум восприимчив к эпизодам неконтролируемого кровотечения, например гемофилии; или индивидуум имеет любую комбинацию описанных признаков. Субъект могут также включать в себя индивидуума, которому угрожает один или большее количество эпизодов неконтролируемого кровотечения до осуществления определенной активности, например хирургической операции, спортивной деятельности или любых физических нагрузок. Субъект может иметь активность FIX на исходном уровне менее чем 1, менее чем 0,5, менее чем 2, менее чем 2,5, менее чем 3 или менее чем 4%. Субъекты также включают в себя детей. Субъекты-дети представляют собой индивидуумов от рождения до 20 лет, предпочтительно от рождения до 18 лет, от рождения до 16 лет, от рождения до 15 лет, от рождения до 12 лет, от рождения до 11 лет, от рождения до 6 лет, от рождения до 5 лет, от рождения до 2 лет, и от 2 до 11 лет.

В данном контексте термины "лечение", "лечить", "воздействие" относятся, например, к снижению тяжести заболевания или патологического состояния; сокращению продолжительности течения заболевания; облегчение одного или большего количества симптомов, ассоциированных с заболеванием или патологическим состоянием; обеспечение положительного эффекта для субъекта с заболеванием или патологическим состоянием, без полного выздоровления при заболевании или патологическом состоянии, или профилактики одного или большего количества симптомов, ассоциированных с заболеванием или патологическим состоянием. В одном из вариантов осуществления данного изобретения термин "лечение" или "воздействие" означает поддержание уровня FIX у субъекта по меньшей мере около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 МЕ/дл посредством введения слитого белка по данному изобретению. В другом варианте осуществления данного изобретения "лечение" или "воздействие" означает поддержание уровня FIX у субъекта по меньшей мере между около 1 и около 20 МЕ/дл, около 2 и около 20 МЕ/дл, около 3 и около 20 МЕ/дл, около 4 и около 20 МЕ/дл, около 5 и около 20 МЕ/дл, около 6 и около 20 МЕ/дл, около 7 и около 20 МЕ/дл, около 8 и около 20 МЕ/дл, около 9 и около 20 МЕ/дл, или около 10 и около 20 МЕ/дл. Термин "воздействие" или "лечение" заболевания или патологического состояния может также включать в себя поддержание активности FIX у субъекта на уровне, сравнимом по меньшей мере с около 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% активностью FIX у субъекта без гемофилии. Минимальный остаточный уровень, необходимый для лечения, можно измерить с помощью одного или большего количества известных способов и можно скорректировать (увеличить или уменьшить) для каждого человека.

В данном контексте термин "нарушение гемостаза" означает генетически унаследованное или приобретенное патологическое состояние, характеризующееся тенденцией к кровотечениям, либо спонтанным, либо в результате травмы, из-за нарушения способности или невозможности образования фибринового сгустка. Примеры таких нарушений включают в себя различные формы гемофилии. Три основные формы гемофилии представляют собой: гемофилию А (дефицит фактора VIII), гемофилию В (дефицит фактора IX или "болезнь Кристмаса") и гемофилию С (дефицит фактора XI, умеренная склонность к кровотечениям). Другие нарушения гемостаза включают в себя, например, Болезнь фон Виллебранда, дефицит фактора XI (дефицит РТА), дефицит фактора XII, дефицит или структурные аномалии в фибриногене, протромбине, факторе V, факторе VII, факторе X или факторе XIII, синдром Бернара-Сулье, который является дефектом или дефицитом GPIb. GPIb, рецептор для VWF, может быть дефектным и приводить к неполноценному образованию первичного сгустка (первичный гемостаз) и повышенной склонности к кровотечениям и тромбастении Гланцмана и Негели (тромбастения Гланцмана). При печеночной недостаточности (острой и хронической формах) отмечается недостаточная продукция факторов коагуляции в печени, что может повысить риск кровотечения.

В данном контексте термин "острое кровотечение" относится к эпизоду кровотечения, независимо от основной причины, например, у субъекта могут быть травмы, уремия, наследственное нарушение свертывания крови (например, дефицит фактора VII), нарушение активности тромбоцитов или резистентность вследствие образования антител к факторам свертывания крови.

II. Слитые белки FIX.

Данное изобретение относится к слитому белку FIX, содержащему полипептид FIX и по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, встроенный в полипептид FIX, слитый с С-концом полипептида FIX, или и то, и другое. Слитый белок FIX после встраивания или слияния с гетерологичным фрагментом может сохранять одну или большее количество активностей FIX. В одном варианте осуществления данного изобретения активность FIX представляет собой прокоагулянтную активность. Термин "прокоагулянтная активность" означает способность белка FIX по данному изобретению участвовать в каскаде свертывания крови, путем замещения нативного FIX, например, рекомбинантный белок FIX по данному изобретению обладает прокоагулянтной активностью, когда он может преобразовывать фактор X (FX) в активированный фактор X (FXa) в присутствии фактора VIII (FVIII), что оценивается, например, в хромогенном анализе. В другом варианте осуществления данного изобретения активность FIX представляет собой способность генерировать комплекс теназы. В других вариантах осуществления данного изобретения активность FIX представляет собой способность генерировать тромбин (или сгусток).

Рекомбинантный белок FIX по данному изобретению не должен обладать 100% прокоагулянтной активности нативного зрелого FIX человека. Фактически, в некоторых аспектах гетерологичный фрагмент, встроенный в полипептид FIX по данному изобретению, может значительно увеличить период полувыведения или стабильность белка, в результате чего более низкая активность является совершенно приемлемой. Таким образом, в определенных аспектах слитый белок FIX по данному изобретению обладает по меньшей мере около 10, около 20, около 30, около 40, около 50, около 60, около 70, около 80, около 90 или около 100% прокоагулянтной активности нативного FIX. Однако в некоторых вариантах осуществления данного изобретения рекомбинантный белок FIX по данному изобретению может обладать более 100% активности нативного FIX для белков, содержащих высокоактивный вариант FIX Padua R338L, например по меньшей мере около 105, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200% или более указанной активности.

Прокоагулянтную активность можно измерить с помощью любого пригодного анализа *in vitro* или *in vivo*. Активность FIX может быть измерена либо посредством тестов, анализирующих процессы, происходящие после каскада коагуляции, путем мониторинга генерации сгустка (анализы свертывания крови), либо посредством тестов, анализирующих процессы, происходящие до каскада коагуляции, путем непосредственного измерения ферментативной активности FX после активации комплексом FVIII-FIX (хромогенные анализы) (см., например, Barrowcliffe et al., *Semin. Thromb. Haemost.* 28: 247-56 (2002); Lee et al., *Thromb. Haemost.* 82: 1644-47 (1999); Lippi et al., *Clin. Chem. Lab. Med.* 45: 2-12 (2007); Matsumoto et al., *J. Thromb. Haemost.* 4: 377-84 (2006)). Таким образом, прокоагулянтную активность можно измерить с помощью анализа с применением хромогенного субстрата, анализа свертывания крови (например, одноэтапного или двухэтапного анализа свертывания крови) или и того, и другого. Механизм анализа с применением хромогенного субстрата основан на принципах каскада коагуляции крови, в котором активированный FIX преобразует FX в FXa в присутствии FVIII, фосфолипидов и ионов кальция. Активность FXa оценивают путем гидролиза субстрата р-нитроанилида (pNA), специфического для FXa. Начальная скорость высвобождения р-нитроанилина, измеренная при 405 нМ, является прямо пропорциональной активности FXa и, следовательно, активности FIX в образце.

Хромогенный анализ рекомендуется подкомитетом, изучающим фактор VIII и фактор IX, в составе Комитета по науке и стандартизации (SSC) Международного общества по изучению тромбоза и гемостаза (ISTH).

Другие пригодные анализы, применяемые для определения активности коагулянтов, включают в

себя описанные, например, в публикации заявки на патент США № 2010/0022445 для Scheifflinger и Dockal, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

В некоторых аспектах прокоагулянтная активность рекомбинантного белка FIX по данному изобретению является сравнимой с активностью природного зрелого FIX, в некоторых аспектах она сравнима с международным стандартом.

По меньшей мере один гетерологичный фрагмент, как описано более подробно ниже, может содержать любой гетерологичный фрагмент или может быть фрагментом, который может обеспечить улучшенное свойство белка FIX. Например, в одном аспекте гетерологичный фрагмент, пригодный для данного изобретения, может представлять собой фрагмент, который способен продлевать период полувыведения белка FIX или фрагмента, который способен улучшать стабильность белка FIX. Слитый белок FIX по данному изобретению может содержать более одного гетерологичного фрагмента, введенного или слитого с полипептидом FIX. В одном варианте осуществления данного изобретения более чем один гетерологичный фрагмент является идентичным. В других вариантах осуществления данного изобретения более чем один гетерологичный фрагмент является отличающимся. В других вариантах осуществления данного изобретения гетерологичный фрагмент выбирают из группы, состоящей из XTEN, альбумина, альбуминсвязывающего пептида, малой альбуминсвязывающей молекулы, домена Fc, партнера по связыванию FcRn, PAS, CTP, PEG, HES, PSA или любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения по меньшей мере один гетерологичный фрагмент встраивают внутрь домена полипептида FIX, но не между доменами. Полипептид FIX содержит множество доменов, например домен (γ)-карбоксиглутаминовой кислоты (GLA), домен, подобный эпидермальному фактору роста-1 (EGF1), домен, подобный эпидермальному фактору роста-2 (EGF2), домен активационного пептида (AP), линкер между доменом EGF2 и доменом AP и каталитический домен (например, домен сериновой протеазы). Зимоген FIX включает в себя 461 аминокислоту: аминокислоты 1-28 (соответствующие SEQ ID NO: 3) представляют собой сигнальный пептид; аминокислоты 29-46 (соответствующие SEQ ID NO: 3) представляют собой пропептид; после чего следует белковая последовательность FIX из 415 аминокислот. Этот процессированный FIX из 415 аминокислот содержит: аминокислоты 1-145 (соответствующие SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2), которые представляют собой легкую цепь FIX; аминокислоты 146-180, которые представляют собой активационный пептид; и аминокислоты от 181 до 415 (соответствующие SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2) которые представляют собой каталитическую тяжелую цепь FIX. В легкой и тяжелой цепях домен GLA соответствует аминокислотам от 1 до 46 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2; домен EGF1 соответствует аминокислотам от 47 до 84 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2; домен EGF2 соответствует аминокислотам с 85 по 127 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2; линкер между доменом EGF2 и доменом AP соответствует аминокислотам от 128 до 145 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2; домен AP соответствует аминокислотам от 146 до 180 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2; а каталитический домен соответствует аминокислотам от 181 до 415 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения по меньшей мере один гетерологичный фрагмент встраивают в один или большее количество доменов полипептида FIX. Например, по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, например, XTEN, можно встроить в домен, выбранный из группы, состоящей из домена GLA, домена EGF1, домена EGF2, домена AP, линкера между доменом EGF2 и доменом AP, каталитическим доменом и любой их комбинации. В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, например, XTEN, встраивают в домен GLA, например, аминокислоты от 1 до 46 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, например, XTEN, встраивают в домен EGF1, например, аминокислоты от 47 до 83 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, например, XTEN, встраивают в домен EGF2, например, аминокислоты от 84 до 125 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, например, XTEN, встраивают в линкер между доменом EGF2 и доменом AP, например, аминокислоты от 132 до 145 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, например, XTEN, встраивают в домен AP, например, аминокислоты от 146 до 180 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, например, XTEN, встраивают в каталитический домен, например, аминокислоты от 181 до 415 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения один или большее количество гетерологичных фрагментов можно встроить в различные участки встраивания. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения встраивания по меньшей мере одного гетерологичного фрагмента, например, XTEN, в один или большем количеством из этих участков встраивания не приводит к потере активности FIX и/или индуцирует улучшенное свойство белка FIX. Например, по меньшей мере один гетерологичный фрагмент можно встроить в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аминокислоты 103 SEQ ID NO: 2 (т.е. непосредственно по ходу транскрипции от аминокислоты, соответствующей аминокислоте 103 SEQ ID NO: 2), аминокис-

лоты 105 SEQ ID NO: 2 (т.е. непосредственно по ходу транскрипции от аминокислоты, соответствующей аминокислоте 105 SEQ ID NO: 2), аминокислоты 142 SEQ ID NO: 2 (т.е. непосредственно по ходу транскрипции от аминокислоты, соответствующей аминокислоте 142 SEQ ID NO: 2), аминокислоты 149 SEQ ID NO: 2 (т.е. непосредственно по ходу транскрипции от аминокислоты, соответствующей аминокислоте 149 SEQ ID NO: 2), аминокислоты 162 SEQ ID NO: 2 (т.е. непосредственно по ходу транскрипции от аминокислоты, соответствующей аминокислоте 162 SEQ ID NO: 2), аминокислоты 166 SEQ ID NO: 2 (т.е. непосредственно по ходу транскрипции от аминокислоты, соответствующей аминокислоте 166 SEQ ID NO: 2), аминокислоты 174 SEQ ID NO: 2 (т.е. непосредственно по ходу транскрипции от аминокислоты, соответствующей аминокислоте 174 SEQ ID NO: 2), аминокислоты 224 SEQ ID NO: 2 (т.е. непосредственно по ходу транскрипции от аминокислоты, соответствующей аминокислоте 224 SEQ ID NO: 2), аминокислоты 226 SEQ ID NO: 2 (т.е. непосредственно по ходу транскрипции от аминокислоты, соответствующей аминокислоте 226 SEQ ID NO: 2), аминокислоты 228 SEQ ID NO: 2 (т.е. непосредственно по ходу транскрипции от аминокислоты, соответствующей аминокислоте 228 SEQ ID NO: 2), аминокислоты 413 SEQ ID NO: 2 (т.е. непосредственно по ходу транскрипции от аминокислоты, соответствующей аминокислоте 413 SEQ ID NO: 2) и любой их комбинации, при этом слитый белок FIX проявляет прокоагулянтную активность.

В одном варианте осуществления данного изобретения гетерологичный фрагмент, например, XTEN, встраивают в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аминокислоты 149 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, аминокислоты 162 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, аминокислоты 166 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, аминокислоты 174 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2 и любой их комбинации. В другом варианте осуществления данного изобретения гетерологичный фрагмент, например, XTEN, встраивают в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аминокислоты 224 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, аминокислоты 226 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, аминокислоты 228 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, аминокислоты 413 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и любой их комбинации. В других вариантах осуществления данного изобретения гетерологичный фрагмент, например, XTEN, встраивают в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аминокислоты 103 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, аминокислоты 105 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2, и обеих. В другом варианте осуществления данного изобретения гетерологичный фрагмент, например, XTEN, встраивают в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте 142 SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2.

Как описано более подробно ниже, гетерологичный фрагмент может представлять собой XTEN, который может иметь разную длину, например, XTEN может содержать по меньшей мере около 42 аминокислот, по меньшей мере около 72 аминокислот, по меньшей мере около 144 аминокислот, по меньшей мере около 288 аминокислот или по меньшей мере около 864 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения XTEN выбирают из группы, состоящей из AE42, AG42, AE72, AG72, AE144, AG144, AE288, AG288, AE864 и AG864. Неограничивающие примеры XTEN, которые можно встроить или слить с полипептидом FIX, описаны в другом месте данного документа.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения XTEN, содержащий 42 аминокислоты, например, AE42 или AG42, встраивают в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аминокислоты 103 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 105 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 142 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 149 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 162 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 166 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 174 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 224 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 226 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 228 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 413 SEQ ID NO: 1 или 2 и любой их комбинации, при этом слитый белок FIX проявляет прокоагулянтную активность.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения XTEN, содержащий 72 аминокислоты, например, AE72 или AG72, встраивают в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аминокислоты 149 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 162 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 166 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 174 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 224 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 226 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 228 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 413 SEQ ID NO: 1 или 2 и любой их комбинации, или XTEN сливают с С-концом, при этом слитый белок FIX проявляет прокоагулянтную активность.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения XTEN, содержащий 144 аминокислоты, например, AE144 или AG144, встраивают в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аминокислоты 149 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 162 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 166 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 174 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 224 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 226 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 228 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 413 SEQ ID NO: 1 или 2 и любой их комбинации, при этом слитый белок FIX проявляет прокоагулянтную активность. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения XTEN, содержащий 288 аминокислоты, например, AE288 или AG288, встраивают в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из

аминокислоты 149 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 162 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 166 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 174 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 224 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 226 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 228 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 413 SEQ ID NO: 1 или 2 и любой их комбинации, при этом слитый белок FIX проявляет прокоагулянтную активность. В других вариантах осуществления данного изобретения XTEN, содержащий 864 аминокислоты, например AE864 или AG8648, встраивают в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аминокислоты 149 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 162 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 166 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 174 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 224 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 226 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 228 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 413 SEQ ID NO: 1 или 2 и любой их комбинации, при этом слитый белок FIX проявляет прокоагулянтную активность.

Слитый белок FIX по данному изобретению может дополнительно содержать второй гетерологичный фрагмент, например, второй XTEN, встроенный в FIX, слитый с С-концом FIX, или и то и другое. Второй гетерологичный фрагмент можно встроить в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аминокислоты 103 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 105 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 142 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 149 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 162 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 166 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 174 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 224 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 226 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 228 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 413 SEQ ID NO: 1 или 2, и любой их комбинации, или когда второй XTEN слит с С-концом полипептида FIX. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения первый XTEN и второй XTEN встраивают внутрь полипептида FIX в участках встраивания, соответствующих аминокислоте SEQ ID NO: 1 или 2, и/или сливают с С-концом полипептида FIX, выбранным из группы, состоящей из аминокислоты 105 SEQ ID NO: 1 или 2, и аминокислоты 166 SEQ ID NO: 1 или 2; аминокислоты 105 SEQ ID NO: 1 или 2, и аминокислоты 224 SEQ ID NO: 1 или 2; аминокислоты 105 SEQ ID NO: 1 или 2 и сливают с С-концом; аминокислоты 166 SEQ ID NO: 1 или 2, и аминокислоты 224 SEQ ID NO: 1 или 2; аминокислоты 166 SEQ ID NO: 1 или 2 и сливают с С-концом; и аминокислоты 224 SEQ ID NO: 1 или 2 и сливают с С-концом, соответственно. В одном варианте осуществления данного изобретения XTEN встраивают в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте 166 SEQ ID NO: 1 или 2, а второй XTEN сливают с С-концом полипептида FIX.

Второй XTEN может содержать по меньшей мере около 6 аминокислот, по меньшей мере около 12 аминокислот, по меньшей мере около 36 аминокислот, по меньшей мере около 42 аминокислот, по меньшей мере около 72 аминокислот, по меньшей мере около 144 аминокислот или по меньшей мере около 288 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения второй XTEN содержит 6 аминокислот, 12 аминокислот, 36 аминокислот, 42 аминокислоты, 72 аминокислоты, 144 аминокислоты или 288 аминокислот. Второй XTEN можно выбрать из группы, состоящей из AE42, AE72, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288, AG144 и любой их комбинации. В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения второй XTEN представляет собой AE72 или AE144.

В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения второй XTEN содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения слитый белок FIX дополнительно содержит третий, четвертый, пятый и/или шестой XTEN. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения слитый белок FIX содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54 до SEQ ID NO: 153 без сигнального пептида и пропептидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения слитый белок FIX содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54 до SEQ ID NO: 153 без сигнального пептида и пропептидной последовательности. В одном варианте осуществления данного изобретения слитый белок FIX содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на около 100% с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 119, 120, 121 и 123 без сигнального пептида и пропептидной последовательности. В другом варианте осуществления данного изобретения слитый белок FIX содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID

NO: 119, 120, 123, 121 и 226 или 122 без сигнального пептида и пропептидной последовательности. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения слитый белок FIX выбирают из группы, состоящей из FIX-AP. 72, FIX-AP. 144, FIX-CT. 72, FIX-CT. 144, FIX-AP. 288 и FIX-CT. 288 без сигнального пептида и пропептидной последовательности.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения слитый белок FIX содержит два разных типа гетерологичных фрагментов. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения слитый белок FIX содержит полипептид FIX, XTEN и домен Fc (или партнер по связыванию FcRn) или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения XTEN встраивают в FIX, а домен Fc (или партнер по связыванию FcRn) или его фрагмент сливают с С-концом FIX. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения XTEN встраивают в полипептид FIX в одном или большем количестве участков встраивания, выбранных из участков встраивания, перечисленных в табл. 3. В одном варианте осуществления данного изобретения XTEN встраивают в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аминокислоты 103 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 105 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 142 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 149 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 162 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 166 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 174 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 224 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 226 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 228 SEQ ID NO: 1 или 2, и аминокислоты 413 SEQ ID NO: 1 или 2; а домен Fc (или партнер по связыванию FcRn) или его фрагмент сливают с С-концом FIX. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения XTEN встраивают в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аминокислоты 105 SEQ ID NO: 1 или 2, аминокислоты 166 SEQ ID NO: 1 или 2, и аминокислоты 224 SEQ ID NO: 1 или 2; а домен Fc (или партнер по связыванию FcRn) или его фрагмент сливают с С-концом FIX. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения XTEN выбирают из AE42, AE72 и AE144.

В некоторых аспектах данного изобретения слитый белок FIX содержит одну или две полипептидные цепи. В одном варианте осуществления данного изобретения слитый белок FIX содержит две полипептидные цепи, при этом первая полипептидная цепь содержит полипептид FIX, слитый с доменом Fc (или партнером по связыванию FcRn), а вторая полипептидная цепь содержит второй домен Fc, при этом первый Fc домен (или партнер по связыванию FcRn) и второй домен Fc (или партнер по связыванию FcRn) связаны ковалентной связью.

В другом варианте осуществления данного изобретения слитый белок FIX содержит единственную полипептидную цепь, содержащую полипептид FIX и домен Fc (или партнер по связыванию FcRn). В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения слитый белок FIX дополнительно содержит линкер, который связывает полипептид FIX и домен Fc (или партнер по связыванию FcRn). В другом варианте осуществления данного изобретения слитый белок FIX содержит полипептид FIX, домен Fc и второй домен Fc (или партнер по связыванию FcRn). В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения слитый белок FIX дополнительно содержит линкер, который связывает домен Fc (или партнер по связыванию FcRn) и второй домен Fc (или партнер по связыванию FcRn). В другом варианте осуществления данного изобретения слитый белок FIX содержит полипептид FIX, домен Fc (или партнер по связыванию FcRn), и второй домен Fc (или партнер по связыванию FcRn), при этом полипептид FIX связан с доменом Fc (или партнером по связыванию FcRn) с помощью линкера. В другом варианте осуществления данного изобретения слитый белок FIX содержит полипептид FIX, домен Fc (или партнер по связыванию FcRn), и второй домен Fc (или партнер по связыванию FcRn), при этом полипептид FIX связан с доменом Fc (или партнером по связыванию FcRn) с помощью первого линкера, и при этом домен Fc (или партнер по связыванию FcRn) связан со вторым доменом Fc (или партнером по связыванию FcRn) с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения слитый белок FIX содержит формулу, выбранную из группы, состоящей из:

- (i) FIX(X)-F1;
- (ii) FIX(X)-L1-F1;
- (iii) FIX(X)-F1-F2;
- (iv) FIX(X)-L1-F1-F2;
- (v) FIX(X)-L1-F1-L2-F2;
- (vi) FIX(X)-F1-L1-F2;
- (vii) FIX(X)-F1:F2;
- (viii) FIX(X)-L1-F1: F2; а также
- (ix) любой их комбинации,

где FIX (X) представляет собой полипептид FIX, имеющий XTEN, встроенный в одном или большем количестве участков встраивания, описанных в данном документе;

каждый из L1 и L2 представляют собой линкеры;

F1 представляет собой домен Fc или партнер по связыванию FcRn;

F2 представляет собой второй домен Fc или второй партнер по связыванию FcRn;

(-) представляет собой пептидную связь или одну или большее количество аминокислот; и

(:) представляет собой ковалентную связь, например дисульфидную связь.

Линкеры (L1 и L2) могут быть одинаковыми или разными. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым, а также линкер может содержать один или большее количество участков внутриклеточного процессинга. Неограничивающие примеры линкеров описаны в другом месте данного документа. Любой из клинкеров можно применять для объединения FIX с гетерологичным фрагментом (например, XTEN или Fc) или первого гетерологичного фрагмента (например, первого Fc) со вторым гетерологичным фрагментом (например, вторым Fc).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения линкер содержит участок расщепления тромбина. В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения участок расщепления тромбина включает XVPR, где X представляет собой любую алифатическую аминокислоту (например, глицин, аланин, валин, лейцин или изолейцин). В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения участок расщепления тромбина включает в себя LVPR. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения линкер содержит мотив взаимодействия наружного домена PAR1, который включает в себя SFLLRN (SEQ ID NO: 190). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мотив взаимодействия наружного домена PAR1 дополнительно содержит аминокислотную последовательность, выбранную из P, PN, PND, PNDK (SEQ ID NO: 191), PNDKY (SEQ ID NO: 192), PNDKYE (SEQ ID NO: 193), PNDKYEP (SEQ ID NO: 194), PNDKYEPF (SEQ ID NO: 195), PNDKYEPFW (SEQ ID NO: 196), PNDKYEPFWE (SEQ ID NO: 197), PNDKYEPFWED (SEQ ID NO: 198), PNDKYEPFWEDE (SEQ ID NO: 199), PNDKYEPFWEDEE (SEQ ID NO: 200), PNDKYEPFWEDEES (SEQ ID NO: 201) или любую их комбинацию. В других вариантах осуществления данного изобретения линкер содержит FXIa участок расщепления LDPR.

В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения слитый белок FIX содержит полипептид FIX и гетерологичный фрагмент, который содержит XTEN, при этом XTEN слит с С-концом полипептида FIX посредством линкера или без него, который может быть расщепляемым или нерасщепляемым, и содержит аминокислотную последовательность длиннее чем 42 аминокислоты и короче чем 864 аминокислоты в длину, предпочтительно короче чем 144 аминокислоты в длину. XTEN может содержать аминокислотную последовательность длиной более чем 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70 или 71 аминокислоты и короче чем 140, 139, 138, 137, 136, 135, 134, 133, 132, 131, 130, 129, 128, 127, 126, 125, 124, 123, 122, 121, 120, 119, 118, 117, 116, 115, 114, 113, 112, 111, 110, 109, 108, 107, 106, 105, 104, 103, 102, 101, 100, 99, 98, 97, 96, 95, 94, 93, 92, 91, 90, 89, 88, 87, 86, 85, 84, 83, 82, 81, 80, 79, 78, 76, 75, 74 или 73 и т.д., аминокислоты или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения XTEN составляет 72 аминокислоты в длину. В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения XTEN представляет собой AE72. В другом варианте осуществления данного изобретения XTEN содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 85%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99% или на 100% последовательности SEQ ID NO: 35.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения слитый белок FIX содержит полипептид FIX, который содержит по меньшей мере одну встроенную последовательность XTEN и гетерологичный фрагмент, содержащий XTEN, при этом XTEN слит с С-концом полипептида FIX посредством линкера или без него, который может быть расщепляемым или нерасщепляемым. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения XTEN составляет менее чем 864 аминокислоты в длину, предпочтительно менее чем 144 аминокислоты в длину. В других вариантах осуществления данного изобретения XTEN содержит аминокислотную последовательность менее чем 244, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80 или 75 аминокислот в длину.

В других вариантах осуществления данного изобретения слитый белок FIX содержит формулу, выбранную из группы, состоящей из:

- (i) FIX-X;
- (ii) FIX-L1-X;
- (iii) FIX(X)-X;
- (iv) FIX(X)-L1-X;
- (v) FIX(X)-L1:X;
- (vi) любой их комбинации,

где FIX представляет собой полипептид FIX;

FIX (X) представляет собой полипептид FIX, имеющий по меньшей мере один XTEN, встроенный в один или большее количество участков встраивания, описанных в данном документе;

(X) представляет собой XTEN, который длиннее чем 42 аминокислоты и короче чем 144 аминокислоты;

X представляет собой XTEN, который длиннее чем 42 аминокислоты и короче чем 864 аминокислоты, например 288 аминокислот, предпочтительно короче чем 144 аминокислоты (например, XTEN, содержащий 72 аминокислоты);

L1 представляют собой линкер;

(-) представляет собой пептидную связь или одну или большее количество аминокислот; и

(:) представляет собой ковалентная связь, например дисульфидную связь.

Линкер (L1) может быть одним и тем же или разным. Линкер может быть расщепляемым или нерасщепляемым в случае необходимости, а также линкер может содержать один или большее количество участков внутриклеточного процессинга. Неограничивающие примеры линкеров описаны в другом месте данного документа. Любой из линкеров можно применять для объединения FIX с гетерологичным фрагментом (например, XTEN или Fc). Ниже приведены неограничивающие примеры линкеров, которые пригодны для многих вариантов осуществления данного изобретения:

- a) GPEGPSKLTRAETGAGSPGAETAEQKLISEEDLSPATGHHHHHHHHH (SEQ ID NO: 219, тромбин);
- b) GAGSPGAETALVPRGAGSPGAETAG (SEQ ID NO: 220, тромбин-PAR1);
- c) GAGSPGAETALVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEESGAGSPGAETA (SEQ ID NO: 221);
- d) GPEGPSKLTRAETGAGSPGAETA (SEQ ID NO: 222);
- e) GGGGALPRVVGAGSPGAETA (SEQ ID NO: 223);
- f) GGGGTLDPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEEKGGAGSPGAETA (SEQ ID NO: 224);
- g) GGAGSPGAETA (SEQ ID NO: 225).

В некоторых других вариантах осуществления данного изобретения линкер содержит участок расщепления тромбина. В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения участок расщепления тромбина включает XVPR, где X представляет собой любую алифатическую аминокислоту (например, глицин, аланин, валин, лейцин или изолейцин). В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения участок расщепления тромбина включает в себя LVPR. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения линкер содержит мотив взаимодействия наружного домена PAR1, который включает в себя SFLLRN (SEQ ID NO: 190). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения мотив взаимодействия наружного домена PAR1 дополнительно содержит аминокислотную последовательность, выбранную из P, PN, PND, PNDK (SEQ ID NO: 191), PNDKY (SEQ ID NO: 192), PNDKYE (SEQ ID NO: 193), PNDKYEP (SEQ ID NO: 194), PNDKYEPF (SEQ ID NO: 195), PNDKYEPFW (SEQ ID NO: 196), PNDKYEPFWE (SEQ ID NO: 197), PNDKYEPFWED (SEQ ID NO: 198), PNDKYEPFWEDE (SEQ ID NO: 199), PNDKYEPFWEDEE (SEQ ID NO: 200), PNDKYEPFWEDEES (SEQ ID NO: 201) или любую их комбинацию. В некотором другом варианте осуществления данного изобретения линкер содержит участок расщепления FXIa, содержащий LDPR, который может быть объединен с мотивом взаимодействия наружного домена PAR1. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полипептид FIX, слитый с XTEN на С-конце, может дополнительно содержать второй XTEN. Второй XTEN может быть слит или встроен в любую часть слитого белка FIX, включая, но не ограничиваясь ими, участки встраивания, описанные в данном документе. Слитый белок FIX может дополнительно содержать третий XTEN, четвертый XTEN, пятый XTEN или шестой XTEN.

Слитый белок FIX по данному изобретению поддерживает уровень активности по сравнению с нативным FIX. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения слитый белок FIX имеет по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или 100% прокоагулянтной активности нативного FIX. Прокоагулянтную активность можно измерить с помощью любого способа, известного в данной области техники, включая, но не ограничиваясь этим, анализ с применением хромогенного субстрата, одноэтапный анализ свертывания крови или и того, и другого.

II. А. Фактор IX.

Фактор IX человека (FIX) представляет собой сериновую протеазу, которая является важным компонентом внутреннего пути каскада свертывания крови. В данном контексте термин "фактор IX" или "FIX" относится к белку фактора коагуляции, а также к его видам и его вариантам и включает в себя, но не ограничивается ими, 461 одноцепочечную аминокислотную последовательность полипептида предшественника FIX человека ("препро"), 415 одноцепочечная аминокислотная последовательность зрелого FIX человека (SEQ ID NO: 1), и вариант R338L FIX (Padua) (SEQ ID NO: 2). FIX включает в себя любую форму молекулы FIX с типовыми характеристиками коагуляции крови FIX. В данном контексте термины "фактор IX" и "FIX" предназначены для охвата полипептидов, которые содержат домены Gla (область, содержащая остатки γ -карбоксиглутаминовой кислоты), EGF1 и EGF2 (области, содержащие последовательности, гомологичные эпидермальному фактору роста человека), активационный пептид ("AP", образованный остатками R136-R180 зрелого FIX) и С-концевой протеазный домен ("Pro"), или синонимов этих доменов, известных в данной области техники, или могут быть усеченным фрагментом или вариантом последовательности, который сохраняет, по меньшей мере, часть биологической активности нативного белка. Варианты FIX или последовательности клонировали, как описано в патентах США № 4770999 и 7700734, а кДНК, кодирующая фактор IX человека, была выделена, охарактеризована и клонирована в экспрессионные векторы (см., например, Choo et al., Nature 299: 178-180 (1982); Fair et al., Blood 64: 194-204 (1984); и Kurachi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 79: 6461-6464 (1982)). Один конкретный вариант FIX, вариант R338L FIX (Padua) (SEQ ID NO: 2), охарактеризован Simioni et al., 2009, содержит мутацию с приобретением функции, которая коррелирует с почти 8-кратным увеличением ак-

тивности варианта Падуи относительно нативного FIX (табл. 1). Варианты FIX могут также включать в себя любой полипептид FIX, имеющий одну или большее количество консервативных аминокислотных замен, которые не влияют на активность FIX полипептида FIX.

Таблица 1. Типовые последовательности FIX

SEQ ID NO: 1 (зрелый полипептид FIX)	
1:	<u>YNSGKLEEFV QGNLERECME EKCSFEEARE VFENTERTE FWKQYVDGDQ CESNPCLNGG</u>
61:	<u>SKDDINSYE CWCDFGFEGK NCELDVTCNI KNGRCEQFCK NSADNKVVCS CTGYRLAEN</u>
121:	<u>QKSCEPAVPF PCGRVSVSQT SKLTRAETVF PDVDYVNSTE AETILDNITQ STQSFNDFTR</u>
181:	<u>VVGGEDAKPG QFPWQVVLNG KVDAFCGCSI VNEKWIVTAA HCVETGVKIT VVAGEHNIEE</u>
241:	<u>TEHTEQKRNVI IRIIPHHNYN AAINKYNHDI ALLELDEPLV LNSYVTPICI ADKEYTNIFL</u>
301:	<u>KFGSGYVSGW GRVFNHGRSA LVLQYLRVPL VDRATCLRST KFTIYNMFC AGFHGGGRDS</u>
361:	<u>CQGDGGGPHV TEVEGTSFLT GIISWGECA MKGKYGIYTK VSRVYNWIKI KTKLT</u>
SEQ ID NO: 2 (зрелый полипептид FIX Padua (R338L))	
1:	<u>YNSGKLEEFV QGNLERECME EKCSFEEARE VFENTERTE FWKQYVDGDQ CESNPCLNGG</u>
61:	<u>SKDDINSYE CWCDFGFEGK NCELDVTCNI KNGRCEQFCK NSADNKVVCS CTGYRLAEN</u>
121:	<u>QKSCEPAVPF PCGRVSVSQT SKLTRAETVF PDVDYVNSTE AETILDNITQ STQSFNDFTR</u>
181:	<u>VVGGEDAKPG QFPWQVVLNG KVDAFCGCSI VNEKWIVTAA HCVETGVKIT VVAGEHNIEE</u>
241:	<u>TEHTEQKRNVI IRIIPHHNYN AAINKYNHDI ALLELDEPLV LNSYVTPICI ADKEYTNIFL</u>
301:	<u>KFGSGYVSGW GRVFNHGRSA LVLQYLRVPL VDRATCLRST KFTIYNMFC AGFHGGGRDS</u>
361:	<u>CQGDGGGPHV TEVEGTSFLT GIISWGECA MKGKYGIYTK VSRVYNWIKI KTKLT</u>
SEQ ID NO: 3 (сигнальный полипептид FIX и пропептид)	
1:	<u>MQRVNIMAE SPGLITICLL GYLISAECTV FLDHENANKI LNRPKR</u>

Полипептид FIX составляет 55 кДа, синтезированный как препрополипептидная цепь (SEQ ID NO: 1) состоит из трех областей: сигнальный пептид из 28 аминокислот (аминокислоты от 1 до 28 SEQ ID NO: 3), пропептид из 18 аминокислот (аминокислоты от 29 до 46), который необходим для гамма-карбоксилирования остатков глутаминовой кислоты, и зрелый фактор IX из 415 аминокислот (SEQ ID NO: 1 или 2). Пропептид представляет собой последовательность из 18 аминокислотных остатков от N-конца до гамма-карбоксиглутаматного домена. Пропептид связывает витамин-К-зависимую гамма-карбоксилазу и затем отщепляется от полипептида-предшественника FIX с помощью эндогенной протеазы, наиболее вероятно PACE (фермент, расщепляющий белок в месте спаренных основных аминокислот), также известного как фурин или PCSK3. Без гамма-карбоксилирования домен Gla не может связывать кальций, и, соответственно, не может принять правильную конформацию, необходимую для закрепления белка на отрицательно заряженные поверхности фосфолипидов, тем самым обуславливая нефункциональность фактора IX. Даже если домен Gla карбоксилирован, он также зависит от расщепления пропептида для надлежащего функционирования, поскольку сохраненный пропептид препятствует конформационным изменениям домена Gla, необходимым для оптимального связывания с кальцием и фосфолипидом. У людей полученный зрелый фактор IX секретируется клетками печени в кровотоке в виде неактивного зимогена, одноцепочечного белка из 415 аминокислотных остатков, который содержит около 17% углеводов по весу (Schmidt, A. E., et al. (2003) Trends Cardiovasc Med, 13: 39). Зрелый FIX состоит из нескольких доменов, которые в конфигурации от N-до C-конца представляют собой: домен GLA, домен EGF1, домен EGF2, домен активационного пептида (AP) и протеазный (или каталитический) домен. Короткий линкер связывает домен EGF2 с доменом AP. FIX содержит два активационных пептида, образованных посредством R145-A146 и R180-V181, соответственно. После активации одноцепочечный FIX становится 2-цепочечной молекулой, в которой две цепи связаны дисульфидной связью. Факторы свертывания могут быть сконструированы путем замены их активирующих пептидов, что приводит к измененной специфичности активации. У млекопитающих зрелый FIX необходимо активировать активированным фактором XI, чтобы получить фактор IXa. При активации FIX до FIXa, протеазный домен обеспечивает каталитическую активность FIX. Активированный фактор VIII (FVIIIa) является специфическим кофактором для полной экспрессии активности FIXa. В других вариантах осуществления данного изобретения полипептид FIX содержит аллельную форму Thr148 плазменного фактора IX и имеет структурные и функциональные характеристики, сходные с эндогенным фактором IX. Известно множество функциональных вариантов FIX. В международной публикации под номером WO 02/040544 A3, на стр. 4, строки 9-30 и стр. 15, строки 6-31, описаны мутанты, которые проявляют повышенную устойчивость к ингибированию гепарином. В международной публикации под номером WO 03/020764 A2, в табл. 2 и 3 (на стр. 14-24) и на стр. 12, строки 1-27, описаны мутанты FIX со сниженной иммуногенностью Т-клеток. В международной публикации под номером WO 2007/149406 A2, от стр. 4, строка 1 до стр. 19, строка 11, описаны функциональные мутантные молекулы FIX, которые характеризуются повышенной стабильностью белка, увеличенным периодом полувыведения *in vivo* и *in vitro*, а также повышенную устойчивость к протеазам. В WO 2007/149406 A2, от стр. 19, строка 12 до стр. 20, строка 9, также описаны химерные и

другие варианты молекул FIX. В международной публикации под номером WO 08/118507 A2, от стр. 5, строка 14 до стр. 6, строка 5, описаны мутанты FIX, которые характеризуются повышенной активностью свертывания крови. В международной публикации под номером WO 09/051717 A2, от стр. 9, строка 11 до стр. 20, строка 2, описаны мутанты FIX, имеющие повышенное количество N-связанных и/или O-связанных участков гликозилирования, что приводит к увеличению периода полувыведения и/или восстановления. В международной публикации под номером WO 09/137254 A2, от стр. 2, параграф [006] до стр. 5, параграф [011] и от стр. 16, параграф [044] до стр. 24, параграф [057], также описаны мутанты фактора IX с повышенным количеством участков гликозилирования. В международной публикации под номером WO 09/130198 A2, от стр. 4, строка 26 до страницы 12, строка 6, описаны функциональные мутантные молекулы FIX, которые имеют повышенное количество участков гликозилирования, что приводит к увеличению периода полувыведения. В международной публикации под номером WO 09/140015 A2, от стр. 11, параграф [0043] до стр. 13, параграф [0053], описаны функциональные мутанты FIX, которые содержат повышенное количество остатков Cys, которые можно применять для конъюгации полимера (например, PEG). Полипептиды FIX, описанные в международной заявке №PCT/US2011/043569, поданной 11 июля 2011 года и опубликованной как WO 2012/006624 от 12 января 2012 года, также включены в данное описание посредством ссылки в полном объеме.

Кроме того, у субъектов с гемофилией были идентифицированы сотни нефункциональных мутаций в FIX, многие из которых описаны в табл. 5 на страницах 11-14 международной публикации под номером WO 09/137254 A2. Такие нефункциональные мутации не включены в данное изобретение, но обеспечивают дополнительные указания, согласно которым в результате мутаций с большей или меньшей вероятностью получают функциональный полипептид FIX.

В одном варианте осуществления данного изобретения полипептид FIX (или часть фактора IX слитого полипептида) содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96 %, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1 или 2 (аминокислоты от 1 до 415 SEQ ID NO: 1 или 2), или, альтернативно, с пропептидной последовательностью или с пропептидом и сигнальной последовательностью (полноразмерный FIX). В другом варианте осуществления данного изобретения полипептид FIX содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96 %, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98%, по меньшей мере на 99% или на 100% последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2.

Коагулянтную активность фактора IX выражают в Международной(ых) единице(ах) (МЕ). Одна МЕ активности FIX приблизительно соответствует количеству FIX в одном миллилитре нормальной плазмы человека. Существует несколько анализов для измерения активности фактора IX, включая одноэтапный анализ свертывания крови (активированное частичное тромбопластиновое время, аЧТВ), время генерации тромбина (TGA) и вращательная тромбоэластометрия (ROTEM®). В данном изобретении описаны последовательности, которые имеют гомологию с последовательностями FIX, фрагментами последовательностей, являющихся природными, такими как последовательности человека, нечеловекообразных приматов, млекопитающих (включая домашних животных) и неприродные варианты последовательностей, которые сохраняют, по меньшей мере, часть биологической активности или биологической функции FIX и/или которые пригодны для профилактики, лечения, опосредования или ослабления заболевания, дефицита, нарушения или патологического состояния, связанного с коагуляционным фактором (например, эпизоды кровотечения, связанные с травмой, хирургическим вмешательством, дефицитом коагуляционного фактора). Последовательности с гомологией FIX человека можно обнаружить с помощью стандартных методов поиска гомологии, таких как NCBI BLAST.

II. В. Гетерологичные фрагменты.

Слитый белок FIX по данному изобретению может содержать по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, встроенный в один или большее количество участков внутри полипептида FIX, слитый с С-концом, или и то и другое, при этом слитый белок FIX обладает прокоагулянтной активностью и может быть экспрессирован в клетке-хозяине *in vivo* или *in vitro*. "Гетерологичный фрагмент" может включать в себя гетерологичный полипептид, или неполипептидные фрагменты, или и то и другое. В конкретном аспекте гетерологичный фрагмент представляет собой XTEN. В некоторых аспектах слитый белок FIX по данному изобретению содержит по меньшей мере один XTEN, встроенный в один или большее количество участков внутри полипептида FIX. В других аспектах слитый белок FIX содержит по меньшей мере один гетерологичный фрагмент, встроенный в один или большее количество участков внутри полипептида FIX, при этом гетерологичный фрагмент представляет собой фрагмент, удлиняющий период полувыведения (например, фрагмент, удлиняющий период полувыведения *in vivo*).

Считается, что обнаружение участков встраивания, в которых FIX сохраняет, по меньшей мере, часть своей прокоагулянтной активности, также позволит встраивать другие пептиды и полипептиды либо с неструктурированными, либо структурированными свойствами, которые ассоциируются с продлением периода полувыведения при слиянии с белком FIX в одном или большем количестве одних и

тех же участков. Неограничивающие примеры гетерологичных фрагментов (например, фрагмента, удлиняющего период полувыведения) включают в себя альбумин, фрагменты альбумина, Fc-фрагменты иммуноглобулинов, партнеры по связыванию FcRn, C-концевой пептид (СТР) β -субъединицы хорионического гонадотропина человека, последовательность НАР, трансферрин, полипептиды PAS согласно заявке на патент США №20100292130, полиглициновые линкеры, полисериновые линкеры, пептиды и короткие полипептиды из 6-40 аминокислот двух типов аминокислот, выбранных из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P) с различной степенью вторичной структуры от менее чем 50 до более чем 50%, в частности, пригодны для встраивания в идентифицированные активные участки встраивания FIX.

В некоторых аспектах гетерологичный фрагмент увеличивает период полувыведения слитого белка FIX *in vivo* или *in vitro*. В других аспектах гетерологичный фрагмент облегчает визуализацию или определение местонахождения слитого белка FIX. Визуализация и/или определение местонахождения слитого белка FIX может осуществляться *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo*, или в их комбинации. В других аспектах гетерологичный фрагмент повышает стабильность слитого белка FIX. В данном контексте термин "стабильность" относится к признанной в данной области техники степени сохранения одного или большего количества физических свойств слитого белка FIX в ответ на состояние окружающей среды (например, повышение или понижение температуры). В некоторых аспектах физическое свойство представляет собой сохранение ковалентной структуры слитого белка FIX (например, отсутствие протеолитического расщепления, нежелательное окисление или дезамидирование). В других аспектах физическое свойство также может представлять собой наличие слитого белка FIX в правильно сложенном состоянии (например, отсутствие растворимых или нерастворимых агрегатов или осадков). В одном аспекте стабильность слитого белка FIX измеряют с помощью анализа биофизического свойства слитого белка FIX, например термической стабильности, pH профиля разворачивания, стабильного удаления гликанов, растворимости, биохимической функции (например, способности связываться с другим белком) и т.д. и/или их комбинаций. В другом аспекте биохимическая функция демонстрируется аффинностью связывания взаимодействия. В одном аспекте критерием стабильности белка является термическая стабильность, т.е. устойчивость к термическому воздействию. Стабильность можно измерить с помощью способов, известных в данной области техники, таких как ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография), ЭХ (эксклюзионная хроматография), ДРС (динамическое рассеяние света) и т.д. Методы измерения термической стабильности включают в себя, но не ограничиваются ими, дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК), дифференциальную сканирующую флуорометрию (ДСФ), круговой дихроизм (КД) и тест на термическое воздействие.

В конкретном аспекте гетерологичный фрагмент, встроенный в один или большее количество участков в слитом белке FIX, сохраняет биохимическую активность слитого белка FIX. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения гетерологичный фрагмент представляет собой XTEN. В одном варианте осуществления данного изобретения биохимическая активность представляет собой активность FIX, которая может быть измерена с помощью хромогенного анализа.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения по меньшей мере один гетерологичный фрагмент опосредовано встраивают в участок встраивания с помощью линкеров, расположенных на N-конце, C-конце, или как на N-конце, так и на C-конце гетерологичного фрагмента. Линкеры на N-конце и C-конце гетерологичного фрагмента могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения несколько линкеров могут примыкать к одному или обоим концам гетерологичного фрагмента в tandem. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения линкер представляет собой "Gly-Ser-пептидный линкер". Термин "Gly-Ser пептидный линкер" относится к пептиду, который содержит глициновые и сериновые остатки.

Типовой Gly/Ser пептидный линкер включает в себя, но не ограничивается этим, аминокислотную последовательность $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ (SEQ ID NO: 161), где n представляет собой целое число, которое является равным или больше чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 46, 50, 55, 60, 70, 80, 90 или 100. В одном варианте осуществления данного изобретения $n=1$, т.е. линкер представляет собой (Gly_4Ser) (SEQ ID NO: 161). В одном варианте осуществления данного изобретения $n=2$, т.е. линкер представляет собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_2$ (SEQ ID NO: 162). В другом варианте осуществления данного изобретения $n=3$, т.е. линкер представляет собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ (SEQ ID NO: 172). В другом варианте осуществления данного изобретения $n=4$, т.е. линкер представляет собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_4$ (SEQ ID NO: 173). В другом варианте осуществления данного изобретения $n=5$, т.е. линкер представляет собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_5$ (SEQ ID NO: 174). В еще одном варианте осуществления данного изобретения $n=6$, т.е. линкер представляет собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_6$ (SEQ ID NO: 175). В другом варианте осуществления данного изобретения $n=7$, т.е. линкер представляет собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_7$ (SEQ ID NO: 176). В еще одном варианте осуществления данного изобретения $n=8$, т.е. линкер представляет собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_8$ (SEQ ID NO: 177). В другом варианте осуществления данного изобретения $n=9$, т.е. линкер представляет собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_9$ (SEQ ID NO: 178). В еще одном варианте осуществления данного изобретения $n=10$, т.е. линкер представляет собой $(\text{Gly}_4\text{Ser})_{10}$ (SEQ ID NO: 179).

Другой типовой Gly/Ser пептидный линкер содержит аминокислотную последовательность $\text{Ser}(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ (SEQ ID NO: 180), где n представляет собой целое число, которое является равным или больше

чем 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 46, 50, 55, 60, 70, 80, 90 или 100. В одном варианте осуществления данного изобретения $n=1$, т.е. линкер представляет собой Ser(Gly₄Ser) (SEQ ID NO: 180). В одном варианте осуществления данного изобретения $n=2$, т.е. линкер представляет собой Ser(Gly₄Ser)₂ (SEQ ID NO: 181). В другом варианте осуществления данного изобретения $n=3$, т.е. линкер представляет собой Ser(Gly₄Ser)₃ (SEQ ID NO: 182). В другом варианте осуществления данного изобретения $n=4$, т.е. линкер представляет собой Ser(Gly₄Ser)₄ (SEQ ID NO: 183). В другом варианте осуществления данного изобретения $n=5$, т.е. линкер представляет собой Ser(Gly₄Ser)₅ (SEQ ID NO: 184). В еще одном варианте осуществления данного изобретения $n=6$, т.е. линкер представляет собой Ser(Gly₄Ser)₆ (SEQ ID NO: 185). В другом варианте осуществления данного изобретения $n=7$, т.е. линкер представляет собой Ser(Gly₄Ser)₇ (SEQ ID NO: 186). В еще одном варианте осуществления данного изобретения $n=8$, т.е. линкер представляет собой Ser(Gly₄Ser)₈ (SEQ ID NO: 187). В еще одном варианте осуществления данного изобретения $n=9$, т.е. линкер представляет собой Ser(Gly₄Ser)₉ (SEQ ID NO: 188). В еще одном варианте осуществления данного изобретения $n=10$, т.е. линкер представляет собой Ser(Gly₄Ser)₁₀ (SEQ ID NO: 189).

В некоторых аспектах слитый белок FIX содержит один гетерологичный фрагмент, встроенный в участке встраивания, указанном в табл. 7. В других аспектах слитый белок FIX содержит два гетерологичных фрагмента, встроенных в два участка встраивания, перечисленных в табл. 7. В конкретном варианте осуществления данного изобретения два гетерологичных фрагмента встраивают в два участка встраивания, перечисленных в табл. 8. В некоторых аспектах слитый белок FIX содержит три гетерологичных фрагмента, встроенных в три участка встраивания, перечисленных в табл. 7. В некоторых аспектах слитый белок FIX содержит четыре гетерологичных фрагмента, встроенных в четыре участка встраивания, перечисленных в табл. 7. В некоторых аспектах слитый белок FIX содержит пять гетерологичных фрагментов, встроенных в пять участков встраивания, перечисленных в табл. 7. В некоторых аспектах слитый белок FIX содержит шесть гетерологичных фрагментов, встроенных в шесть участков встраивания, перечисленных в табл. 7. В некоторых аспектах все встроенные гетерологичные фрагменты являются идентичными. В других аспектах по меньшей мере один из встроенных гетерологичных фрагментов отличается от остальных встроенных гетерологичных фрагментов.

Слияние полипептида FIX по меньшей мере с одним гетерологичным фрагментом, например, XTEN, может влиять на физические или химические свойства, например фармакокинетику, слитого белка по данному изобретению. В конкретном варианте осуществления данного изобретения гетерологичный фрагмент, связанный с белком FIX, улучшает по меньшей мере одно фармакокинетическое свойство, например увеличивает конечный период полувыведения или увеличивает площадь под кривой (AUC), в результате чего описанный в данном документе слитый белок задерживается *in vivo* в течение более длительного периода времени по сравнению с FIX дикого типа или с соответствующим FIX без гетерологичного фрагмента. В других вариантах осуществления данного изобретения последовательность XTEN, применяемая в данном изобретении, улучшает по меньшей мере одно фармакокинетическое свойство, например, увеличивает период полувыведения, повышает восстановление и/или повышает биодоступность при подкожном введении, увеличивает площадь под кривой (AUC), в результате чего белок FIX задерживается *in vivo* в течение более длительного периода времени по сравнению с FIX дикого типа или с соответствующим FIX без гетерологичного фрагмента. В некоторых аспектах гетерологичный фрагмент, который увеличивает период полувыведения слитого белка FIX по данному изобретению, включает, без ограничения, гетерологичный полипептид, такой как альбумин, Fc-область иммуноглобулина, последовательность XTEN, C-концевой пептид (СТР) β -субъединицы хорионического гонадотропина человека, последовательность PAS, последовательность НАР, трансферрин, связывающие альбумин фрагменты или любые фрагменты, производные, варианты или комбинации этих полипептидов. В определенных аспектах слитый белок FIX по данному изобретению содержит гетерологичный полипептид, который увеличивает период полувыведения, при этом гетерологичный полипептид представляет собой последовательность XTEN. В других взаимосвязанных аспектах гетерологичный фрагмент может включать в себя участок связывания для неполипептидного фрагмента, такого как полиэтиленгликоль (ПЭГ), гидроксипропилкрахмал (ГЭК), полисиаловая кислота или любые производные, варианты или комбинации этих фрагментов.

В других вариантах осуществления данного изобретения слитый белок FIX по данному изобретению конъюгирован с одним или большим количеством полимеров. Полимер может быть водорастворимым или быть нерастворимым в воде. Полимер может быть ковалентно или нековалентно присоединен к FIX или другим фрагментам, конъюгированным с FIX. Неограничивающими примерами полимера могут быть поли(алкиленоксид), поли(винилпирролидон), поли(виниловый спирт), полиоксазоллин или поли(акрилоилморфолин).

В некоторых аспектах слитый белок FIX по данному изобретению содержит одну, две, три или большее количество гетерологичных фрагментов, каждый из которых может быть одинаковой или различными молекулами. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения слитый белок FIX содержит один или большее количество XTEN. В других вариантах осуществления данного изобретения слитый белок FIX содержит один или большее количество XTEN и один или большее количество доменов Fc. В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения слитый белок FIX может содержать XTEN, встроенный в FIX, и Fc, слитый с C-концом FIX. Слитые белки FIX по данному изобретению могут иметь увели-

ченный период полувыведения *in vivo* по сравнению с нативными FIX, rFIXFc или FIX R338L. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения слитый белок FIX может характеризоваться периодом полувыведения *in vivo* по меньшей мере в около 1,5 раза, по меньшей мере в около 2 раза, по меньшей мере в около 3 раза или по меньшей мере в около 4 раза больше по сравнению с нативным FIX без гетерологичного фрагмента или по сравнению с FIX R338L без гетерологичного фрагмента. В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения слитый белок FIX характеризуется периодом полувыведения *in vivo* более чем в 2 раза больше, чем полипептид FIX без гетерологичного фрагмента.

В других вариантах осуществления данного изобретения слитый белок FIX может характеризоваться периодом полувыведения *in vivo*, который по меньшей мере на около 5 ч, по меньшей мере на около 6 ч, по меньшей мере на около 7 ч, по меньшей мере на около 8 ч, по меньшей мере, около 9 ч, по меньшей мере на около 10 ч, по меньшей мере на около 11 ч, по меньшей мере на около 12 ч, по меньшей мере на около 13 ч, по меньшей мере на около 14 ч, по меньшей мере на около 15 ч, по меньшей мере на около 16 ч, по меньшей мере на около 17 ч, по меньшей мере на около 18 ч, по меньшей мере на около 19 ч, по меньшей мере на около 20 ч, по меньшей мере на около 21 ч, по меньшей мере на около 22 ч, по меньшей мере на около 23 ч, по меньшей мере на около 24 ч, по меньшей мере на около 25 ч, по меньшей мере на около 26 ч, по меньшей мере на около 27 ч, по меньшей мере на около 28 ч, по меньшей мере на около 29 ч, по меньшей мере на около 30 ч, по меньшей мере на около 31 ч, по меньшей мере на около 32 ч, по меньшей мере на около 33 ч или по меньшей мере на около 34 ч больше, чем период полувыведения *in vivo* полипептида FIX без гетерологичного фрагмента.

II.B.1. XTEN.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения по меньшей мере один гетерологичный фрагмент представляет собой XTEN. В данном контексте термин "последовательность XTEN" относится к полипептидам с удлинённой длиной, имеющих не встречающиеся в природе, по существу, неповторяющиеся последовательности, которые состоят в основном из малых гидрофильных аминокислот, а также последовательности с низкой степенью или отсутствием вторичной или третичной структуры в физиологических условиях. Как партнеры слитого белка, XTEN могут служить в качестве носителя, придавая определенные желательные фармакокинетические, физико-химические и фармацевтические свойства при связывании с последовательностью FIX по данному изобретению для создания слитого белка. Такие желательные свойства включают в себя, но не ограничиваются ими, улучшенные фармакокинетические параметры и характеристики растворимости. В данном контексте термин "XTEN" конкретно исключает антитела или фрагменты антител, такие как одноцепочечные антитела или Fc-фрагменты легкой цепи или тяжелой цепи.

В некоторых аспектах слитый белок FIX по данному изобретению содержит по меньшей мере один XTEN или его фрагмент, вариант или его производное, встроенные в FIX, при этом слитый белок FIX обладает прокоагулянтной активностью и может быть экспрессирован *in vivo* или *in vitro* в клетке-хозяине. В некоторых аспектах два гетерологичных фрагмента представляют собой последовательности XTEN. В некоторых аспектах три гетерологичных фрагмента представляют собой последовательности XTEN. В некоторых аспектах четыре гетерологичных фрагмента представляют собой последовательности XTEN. В некоторых аспектах пять гетерологичных фрагментов представляют собой последовательности XTEN. В некоторых аспектах шесть или большее количество гетерологичных фрагментов представляют собой последовательности XTEN. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения последовательность XTEN, пригодная для применения в данном изобретении, представляет собой пептид или полипептид, имеющий более чем 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 или 2000 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения XTEN представляет собой пептид или полипептид, имеющий от более чем около 20 до около 3000 аминокислотных остатков, от более чем 30 до около 2500 остатков, от более чем 40 до около 2000 остатков, от более чем 50 до около 1500 остатков, от более чем 60 до около 1000 остатков, от более чем 70 до около 900 остатков, от более чем 80 до около 800 остатков, от более чем 90 до около 700 остатков, от более чем 100 до около 600 остатков, от более чем 110 до около 500 остатков или от более чем 120 до около 400 остатков. В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения XTEN содержит аминокислотную последовательность длиннее чем 42 аминокислоты и короче чем 144 аминокислоты в длину.

Последовательность XTEN по данному изобретению может содержать один или большее количество мотивов последовательности, состоящих из 5-14 (например, от 9 до 14) аминокислотных остатков или аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% с мотивом последовательности, при этом мотив содержит, состоит, по существу, из, или состоит из 4-6 типов аминокислот (например, 5 аминокислот), выбранных из группы, состоящей из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P). См. US 2010-0239554 A1.

В некоторых вариантах осуществления XTEN содержит мотивы неперекрывающихся последовательностей, в которых около 80, или по меньшей мере около 85, или по меньшей мере около 90, или около 91, или около 92, или около 93, или около 94, или около 95, или около 96, или около 97, или около 98, или около 99, или около 100% последовательности состоит из множества единиц неперекрывающихся последовательностей, выбранных из одного семейства мотивов, выбранных из табл. 2A, в результате че-

го получают последовательность семейства. В данном контексте термин "семейство" означает, что XTEN имеет мотивы, выбранные только из одной категории мотивов из табл. 2А; т.е. AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC или BD XTEN, и что любые другие аминокислоты в XTEN не из мотива семейства выбраны для получения необходимого свойства, например, для возможности включения участка рестрикции посредством кодирующих нуклеотидов, включения последовательности расщепления, или достижения лучшей связи с FIX. В некоторых вариантах осуществления семейств XTEN, последовательность XTEN включает в себя множество единиц мотивов непересекающихся последовательностей семейства мотивов AD, или семейства мотивов AE, или семейства мотивов AF, или семейства мотивов AG, или семейства мотивов AM, или семейства мотивов AQ, или семейства BC, или семейства BD, с получением XTEN, демонстрирующим диапазон гомологии, описанный выше. В других вариантах осуществления данного изобретения XTEN содержит множество единиц мотивов последовательностей из двух или большего количества семейств мотивов из табл. 2А. Эти последовательности могут быть выбраны для достижения желаемых физико-химических характеристик, включая такие свойства, как суммарный заряд, гидрофильность, отсутствие вторичной структуры или отсутствие повторяемости, которые обеспечиваются аминокислотной композицией мотивов, более подробно описанных ниже. В вариантах осуществления данного изобретения, описанных выше в этом параграфе, мотивы, включенные в XTEN, могут быть выбраны и собраны с помощью способов, описанных в данном документе, для получения XTEN длиной от около 36 до около 3000 аминокислотных остатков.

Таблица 2А. Мотивы последовательности XTEN из 12 аминокислот и семейства мотивов

Семейство мотивов*	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ МОТИВА	SEQ ID NO:
AD	GESPGSSGSES	4
AD	GSEGSSGPGESS	5
AD	GSSESGSSEGGP	6
AD	GSGGEPSESGSS	7
AE, AM	GSPAGSPTSTEE	8
AE, AM, AQ	GSEPATSGSETP	9
AE, AM, AQ	GTSESATPESGP	10
AE, AM, AQ	GTSTEPSEGSAP	11
AF, AM	GSTSESPSGTAP	12
AF, AM	GTSTEPESGASP	13
AF, AM	GTSPSGESSTAP	14
AF, AM	GSTSSTAESP GP	15
AG, AM	GTPGSGTASSSP	16
AG, AM	GSSTPSGATGSP	17
AG, AM	GSSPSASTGTGP	18
AG, AM	GASPGTSTGSP	19
AQ	GEPAGSPTSTSE	20
AQ	GTGEPSSTPASE	21
AQ	GSGPSTESAPTE	22
AQ	GSETPSGPSETA	23
AQ	GPSETSTSEPGA	24
AQ	GSPSEPTGTSA	25
BC	GSGASEPTSTEP	26
BC	GSEPATSGTEPS	27
BC	GTSEPSTSEPGA	28
BC	GTSTEPSEPGSA	29
BD	GSTAGSETSTEA	30
BD	GSETATSGSETA	31
BD	GTSESATSESGA	32
BD	GTSTEASEGSAS	33

*Обозначает отдельные последовательности мотивов, которые при совместном применении в различных пермутациях приводят к образованию "последовательности семейства" XTEN может иметь различную длину для встраивания или связывания с FIX.

В одном варианте осуществления данного изобретения длину последовательности(ей) XTEN выбирают на основе свойства или функции, которые необходимо получить для слитого белка. В зависимости от запланированного свойства или функции XTEN может иметь короткую или промежуточную по длине последовательность или более длинную последовательность, которая может служить в качестве носителей. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения XTEN включает в себя короткие сегменты от около 6 до около 99 аминокислотных остатков, сегменты промежуточной длины от около 100 до около 399 аминокислотных остатков и более длинные сегменты от около 400 до около 1000 и до около 3000 аминокислотных остатков. Таким образом, XTEN, встроенный в FIX или связанный с ним, может иметь около 6, около 12, около 36, около 40, около 42, около 72, около 96, около 144, около 288, около 400, около 500, около 576, около 600, около 700, около 800, около 864, около 900, около 1000, около 1500, около 2000, около 2500 или до около 3000 аминокислотных остатков в длину. В других вариантах осуществления данного изобретения последовательности XTEN имеют от около 6 до около 50, от около 50 до около 100, от около 100 до 150, от около 150 до 250, от около 250 до 400, от около 400 до около 500, от около 500 до около 900, около 1500, от около 1500 до 2000, или от около 2000 до около 3000 аминокислотных остатков в длину. Точная длина XTEN, встроенного в FIX или связанного с ним, может изменяться без ослабления активности FIX. В одном варианте осуществления данного изобретения один или большее количество XTEN, применяемых в данном изобретении, имеют 42 аминокислоты, 72 аминокислоты, 144 аминокислоты, 288 аминокислот, 576 аминокислот или 864 аминокислоты в длину и могут быть выбраны из одной или большего количества последовательностей семейства XTEN; т.е. AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC или BD.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения, последовательность XTEN, применяемая в данном изобретении, является по меньшей мере на 60, 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной последовательности, выбранной из группы, состоящей из AE42, AG42, AE48, AM48, AE72, AG72, AE108, AG108, AE144, AF144, AG144, AE180, AG180, AE216, AG216, AE252, AG252, AE288, AG288, AE324, AG324, AE360, AG360, AE396, AG396, AE432, AG432, AE468, AG468, AE504, AG504, AF504, AE540, AG540, AF540, AD576, AE576, AF576, AG576, AE612, AG612, AE624, AE648, AG648, AG684, AE720, AG720, AE756, AG756, AE792, AG792, AE828, AG828, AD836, AE864, AF864, AG864, AM875, AE912, AM923, AM1318, BC864, BD864, AE948, AE1044, AE1140, AE1236, AE1332, AE1428, AE1524, AE1620, AE1716, AE1812, AE1908, AE2004A, AG948, AG1044, AG1140, AG1236, AG1332, AG1428, AG1524, AG1620, AG1716, AG1812, AG1908, AG2004 и любой их комбинации. См. US 2010-0239554 A1. В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения XTEN содержит AE42, AE72, AE144, AE288, AE576, AE864, AG 42, AG72, AG144, AG288, AG576, AG864 или любую их комбинацию.

В одном варианте осуществления данного изобретения последовательность XTEN является по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из AE36 (SEQ ID NO: 217), AE42 (SEQ ID NO: 34), AE72 (SEQ ID NO: 35), AE78 (SEQ ID NO: 218), AE144 (SEQ ID NO: 36), AE1442A (SEQ ID NO: 37), AE1443B (SEQ ID NO: 38), AE1444A (SEQ ID NO: 39), AE1445A (SEQ ID NO: 40), AE1446B (SEQ ID NO: 41), AG144 (SEQ ID NO: 42), AG144A (SEQ ID NO: 43), AG144B (SEQ ID NO: 44), AG144C (SEQ ID NO: 45), AG144F (SEQ ID NO: 46), AE288 (SEQ ID NO: 47), AE2882 (SEQ ID NO: 48), AG288 (SEQ ID NO: 49), AE576 (SEQ ID NO: 50), AG576 (SEQ ID NO: 51), AE864 (SEQ ID NO: 52), AG864 (SEQ ID NO: 53), XTEN_AE72_2A_1 (SEQ ID NO: 202), XTEN_AE72_2A_2 (SEQ ID NO: 203), XTENAE723B1 (SEQ ID NO: 204), XTENAE723B2 (SEQ ID NO: 205), XTEN_AE72_4A_2 (SEQ ID NO: 206), XTEN_AE72_5A_2 (SEQ ID NO: 207), XTENAE726B1 (SEQ ID NO: 208), XTENAE726B2 (SEQ ID NO: 209), XTEN_AE72_1A_1 (SEQ ID NO: 210), XTENAE721A2 (SEQ ID NO: 211), XTENAE1441A (SEQ ID NO: 212), AE150 (SEQ ID NO: 213), AG150 (SEQ ID NO: 214), AE294 (SEQ ID NO: 215), AG294 (SEQ ID NO: 216) и любой их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения менее чем 100% аминокислот XTEN выбраны из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P) или менее чем 100% последовательности состоит из мотивов последовательности из табл. 2A или последовательностей XTEN из табл. 2B. В таких вариантах осуществления данного изобретения оставшиеся аминокислотные остатки XTEN выбирают из любых других 14 природных L-аминокислот, но могут предпочтительно выбирать из гидрофильных аминокислот, в результате чего последовательность XTEN будет содержать по меньшей мере около 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% или по меньшей мере около 99% гидрофильных аминокислот. Содержание гидрофобных аминокислот в XTEN, применяемом в конструкциях конъюгации, может составлять менее чем 5, или менее чем 2, или менее чем 1% содержания гидрофобных аминокислот. Гидрофобные остатки, которые менее предпочтительны в конструкции XTEN, включают в себя триптофан, фенилаланин, тирозин, лейцин, изолейцин, валин и метионин. Кроме того, последовательности XTEN могут содержать менее чем 5, или менее чем 4, или менее чем 3, или менее чем 2, или менее чем 1%, или ни одну из следующих аминокислот: метионин (например, во избежание окисления) или аспарагин и глутамин (во избежание дезамидирования). В другом варианте осуществления данного изобретения последовательность XTEN выбирают из группы, состоящей из AE36 (SEQ ID NO:

217), AE42 (SEQ ID NO: 34), AE72 (SEQ ID NO: 35), AE78 (SEQ ID NO: 218), AE144 (SEQ ID NO: 36), AE1442A (SEQ ID NO: 37), AE1443B (SEQ ID NO: 38), AE1444A (SEQ ID NO: 39), AE1445A (SEQ ID NO: 40), AE1446B (SEQ ID NO: 41), AG144 (SEQ ID NO: 42), AG144A (SEQ ID NO: 43), AG144B (SEQ ID NO: 44), AG144C (SEQ ID NO: 45), AG144F (SEQ ID NO: 46), AE288 (SEQ ID NO: 47), AE2882 (SEQ ID NO: 48), AG288 (SEQ ID NO: 49), AE576 (SEQ ID NO: 50), AG576 (SEQ ID NO: 51), AE864 (SEQ ID NO: 52), AG864 (SEQ ID NO: 53), XTENAE722A1 (SEQ ID NO: 202), XTENAE722A2 (SEQ ID NO: 203), XTENAE723B1 (SEQ ID NO: 204), XTENAE723B2 (SEQ ID NO: 205), XTENAE724A2 (SEQ ID NO: 206), XTENAE725A2 (SEQ ID NO: 207), XTEN_AE72_6B_1 (SEQ ID NO: 208), XTEN_AE72_6B_2 (SEQ ID NO: 209), XTENAE721A1 (SEQ ID NO: 210), XTENAE721A2 (SEQ ID NO: 211), XTENAE1441A (SEQ ID NO: 212), AE150 (SEQ ID NO: 213), AG150 (SEQ ID NO: 214), AE294 (SEQ ID NO: 215), AG294 (SEQ ID NO: 216) и любых их комбинаций. В конкретном варианте осуществления данного изобретения последовательность XTEN выбирают из группы, состоящей из AE72, AE144 и AE288. Аминокислотные последовательности для определенных последовательностей XTEN по данному изобретению приведены в табл. 2B.

Таблица 2B. Последовательности XTEN

XTEN	Аминокислотная последовательность
AE36 SEQ ID NO: 217	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP
AE42 SEQ ID NO: 34	GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS
AE72 SEQ ID NO: 35	GAPTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGASS
AE78 SEQ ID NO: 218	GAPTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGASS

AE144 SEQ ID NO: 36	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSESAPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
AE144_2A SEQ ID NO: 37	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG
AE144_3B SEQ ID NO: 38	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG
AE144_4A SEQ ID NO: 39	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AE144_5A SEQ ID NO: 40	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG
AE144_6B SEQ ID NO: 41	TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPAT GSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AG144 SEQ ID NO: 42	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GSSPSASTGTGPGTSGTASSSPGSSTPSGATGSP
AG144_A SEQ ID NO: 43	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP
AG144_B SEQ ID NO: 44	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP
AG144_C SEQ ID NO: 45	GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGTSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP
AG144_F SEQ ID NO: 46	GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP
AE288 SEQ ID NO: 47	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP

	GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP
AE288_2 SEQ ID NO: 48	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP
AG288 SEQ ID NO: 49	PGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGS
AE576 SEQ ID NO: 50	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG576 SEQ ID NO: 51	PCTPGSGTASSSPCSSTPSCATGSPGSSPSASTCTGPGSSPSASTCTGPGSSSTP SGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGS PGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGSSPS ASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGS PGSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGS PGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSSTGSPGASPGTSSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSSTGS
AE864 SEQ ID NO: 52	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP

	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG864 SEQ ID NO: 53	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP
XTEN_AE72_2 A_1 SEQ ID NO: 202	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPG
XTEN_AE72_2 A_2 SEQ ID NO: 203	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPG
XTEN_AE72_3B _1	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPG

SEQ ID NO: 204	
XTEN_AE72_3B _2 SEQ ID NO: 205	TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPG
XTEN_AE72_4 A_2 SEQ ID NO: 206	TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPG
XTEN_AE72_5 A_2 SEQ ID NO: 207	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEG
XTEN_AE72_6B _1 (SEQ ID NO: 208)	TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPG
XTEN_AE72_6B _2 SEQ ID NO: 209	SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPG
XTEN_AE72_1 A_1 SEQ ID NO: 210	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPG
XTEN_AE72_1 A_2 SEQ ID NO: 211	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPG
XTEN_AE144_1 A SEQ ID NO: 212	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
AE150 SEQ ID NO: 213	GAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPASS
G150 SEQ ID NO: 214	GAPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGSSPSASTGTGPGTSGTASSSPGSSTPSGATGSPASS
AE294 SEQ ID NO: 215	GAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPASS
AG294 SEQ ID NO: 216	GAPPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGT PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGA TGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTS TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGT PGSGTASSSPGSSTPSGATGSASS

В дополнительных вариантах осуществления данного изобретения последовательность XTEN, применяемая в данном изобретении, влияет на физические или химические свойства, например фармакокинетику, слитого белка по данному изобретению. Последовательность XTEN, применяемая в данном изобретении, может обладать одним или большим количеством из следующих преимуществ: конформационная гибкость, повышенная растворимость в воде, высокая степень устойчивости к протеазе, низкая иммуногенность, низкая аффинность связывания с рецепторами млекопитающих или увеличение гидродинамических (или Стоксовских) радиусов. В конкретном варианте осуществления данного изобретения последовательность XTEN, связанная с белком FIX в данном изобретении, улучшает фармакокинетические свойства, например увеличивает конечный период полувыведения, повышает биодоступность или увеличивает площадь под кривой (AUC), в результате чего описанный в данном документе слитый белок задерживается *in vivo* в течение более длительного периода времени по сравнению с FIX дикого типа. В дополнительных вариантах осуществления данного изобретения последовательность XTEN, приме-

няемая в данном изобретении, улучшает фармакокинетические свойства, например увеличивает конечный период полувыведения или увеличивает площадь под кривой (AUC), в результате чего белок FIX задерживается *in vivo* в течение более длительного периода времени по сравнению с FIX дикого типа. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения белок FIX характеризуется периодом полувыведения *in vivo* по меньшей мере в около 1,5 раза, по меньшей мере в около 2 раза, по меньшей мере в около 3 раза или по меньшей мере в около 4 раза больше по сравнению с нативным FIX, rFIXFc, FIX R338L или соответствующим белком FIX, не содержащим XTEN. В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения слитый белок FIX может характеризоваться периодом полувыведения *in vivo* более чем в 2 раза больше, чем полипептид FIX без гетерологичного фрагмента. В других вариантах осуществления данного изобретения слитый белок FIX характеризуется периодом полувыведения *in vivo*, который по меньшей мере на около 5 ч, по меньшей мере на около 6 ч, по меньшей мере на около 7 ч, по меньшей мере на около 8 ч, по меньшей мере на около 9 ч, по меньшей мере на около 10 ч, по меньшей мере на около 11 ч, по меньшей мере на около 12 ч, по меньшей мере на около 13 ч, по меньшей мере на около 14 ч, по меньшей мере на около 15 ч, по меньшей мере на около 16 ч, по меньшей мере на около 17 ч, по меньшей мере на около 18 ч, по меньшей мере на около 19 ч, по меньшей мере на около 20 ч, по меньшей мере на около 21 ч, по меньшей мере на около 22 ч, по меньшей мере на около 23 ч, по меньшей мере на около 24 ч, по меньшей мере на около 25 ч, по меньшей мере на около 26 ч, по меньшей мере на около 27 ч, по меньшей мере на около 28 ч, по меньшей мере на около 29 ч, по меньшей мере на около 30 ч, по меньшей мере на около 31 ч, по меньшей мере на около 32 ч, по меньшей мере на около 33 ч или по меньшей мере на около 34 ч больше, чем период полувыведения *in vivo* полипептида FIX без гетерологичного фрагмента. Для определения физических/химических свойств белков, содержащих последовательность XTEN, можно применять множество способов и анализов. Такие способы включают в себя, но не ограничиваются ими, аналитическое центрифугирование, ЭПР, ионообменную ВЭЖХ, эксклюзионную ВЭЖХ, обращенно-фазовую ВЭЖХ, рассеяние света, капиллярный электрофорез, круговой дихроизм, дифференциальную сканирующую калориметрию, флуоресценцию, ионообменную ВЭЖХ, эксклюзионную ВЭЖХ, ИК, ЯМР, раман-спектроскопию, рефрактометрия и УФ/видимую спектроскопию. Дополнительные способы описаны в публикации Amau et al., *Prot Expr and Purif* 48, 1-13 (2006).

Дополнительные примеры последовательностей XTEN, которые можно применять согласно данному изобретению, описаны в публикациях патентов США № 2010/0239554 A1, 2010/0323956 A1, 2011/0046060 A1, 2011/0046061 A1, 2011/0077199 A1 или 2011/0172146 A1, или в международных патентных публикациях № WO 2010091122 A1, WO 2010144502 A2, WO 2010144508 A1, WO 2011028228 A1, WO 2011028229 A1, WO 2011028344 A2, WO 2014/011819 A2 или WO 2015/023891. В некоторых аспектах слитый белок FIX содержит одну или большее количество последовательностей XTEN, встроенных в FIX, слитых с С-концом FIX, или и то и другое. В одном варианте осуществления данного изобретения одна или большее количество последовательностей XTEN являются встроенными в домен GLA. В другом варианте осуществления данного изобретения одна или большее количество последовательностей XTEN являются встроенными в домен EGF1. В других вариантах осуществления данного изобретения одна или большее количество последовательностей XTEN являются встроенными в EGF2. В других вариантах осуществления данного изобретения одна или большее количество последовательностей XTEN являются встроенными в AP. В других вариантах осуществления данного изобретения одна или большее количество последовательностей XTEN являются встроенными в каталитический домен. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения одна или большее количество последовательностей XTEN являются слитыми с С-концом FIX. В некоторых аспектах слитый белок FIX содержит одну последовательность XTEN, встроенную в участке встраивания, указанном в табл. 7. В других аспектах слитый белок FIX содержит две последовательности XTEN, встроенных в два участка встраивания, указанных в табл. 7. В конкретном варианте осуществления данного изобретения две последовательности XTEN встраивают в два участка встраивания, указанных в табл. 8. В некоторых аспектах слитый белок FIX содержит три последовательности XTEN, встроенных в три участка встраивания, указанных в табл. 7. В некоторых аспектах слитый белок FIX содержит четыре последовательности XTEN, встроенных в четыре участка встраивания, указанных в табл. 7. В некоторых аспектах слитый белок FIX содержит пять последовательностей XTEN, встроенных в пять участков встраивания, указанных в табл. 7. В некоторых аспектах слитый белок FIX содержит шесть последовательностей XTEN, встроенных в шесть участков встраивания, указанных в табл. 7. В некоторых аспектах все встроенные последовательности XTEN являются идентичными. В других аспектах по меньшей мере одна из встроенных последовательностей XTEN отличается от остальных встроенных последовательностей XTEN.

В некоторых аспектах слитый белок FIX содержит одну последовательность XTEN, встроенную в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аминокислоты 103 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 105 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 142 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 149 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 162 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 166 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 174 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 224 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 226 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 228 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 413 SEQ ID NO: 2 и любой их комбинации, при этом слитый белок FIX проявляет прокоагулянтную активность. В некоторых аспектах слитый белок FIX

содержит вторую последовательность XTEN, встроенную в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аминокислоты 103 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 105 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 142 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 149 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 162 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 166 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 174 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 224 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 226 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 228 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 413 SEQ ID NO: 2 и любой их комбинации, или когда второй XTEN слит с С-концом полипептида FIX, при этом слитый белок FIX проявляет прокоагулянтную активность. В одном конкретном аспекте слитый белок FIX содержит одну последовательность XTEN, слитую с С-концом FIX, при этом XTEN содержит аминокислотную последовательность длиннее чем 42 аминокислоты и короче чем 144 аминокислоты в длину.

II.B.2. Партнера по связыванию Fc или FcRn.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения по меньшей мере один гетерологичный фрагмент представляет собой область Fc (например, партнер по связыванию FcRn) или ее фрагмент. В некоторых аспектах слитый белок FIX по данному изобретению содержит по меньшей мере одну область Fc (например, партнер по связыванию FcRn), встроенную в FIX, слитую с С-концом FIX, или и то и другое, при этом слитый белок FIX обладает прокоагулянтной активностью и может быть экспрессирован в клетке-хозяине *in vivo* или *in vitro*. В данном контексте термин "Fc" или "область Fc" может означать партнера по связыванию функционального неонатального рецептора Fc (FcRn), содержащего Fc-домен, вариант или его фрагмент, если не указано иное. Партнер по связыванию FcRn представляет собой любую молекулу, которая может быть специфически связана рецептором FcRn с последующим активным транспортом посредством рецептора FcRn партнера по связыванию FcRn, включая, но не ограничиваясь этим, альбумин. Таким образом, термин "Fc" включает в себя любые варианты IgG Fc, которые являются функциональными. Область Fc-части IgG, которая связывается с рецептором FcRn, была описана на основании рентгеновской кристаллографии (Burmeister et al., *Nature* 372: 379 (1994), что включено в данный документ в полном объеме посредством ссылки). Основная площадь контакта Fc с FcRn находится вблизи соединения доменов CH2 и CH3. Контакты "Fc-FcRn" находятся в пределах одной тяжелой цепи Ig. К партнерам по связыванию FcRn относятся, но не ограничиваясь, полный IgG, Fc-фрагмент IgG и другие фрагменты IgG, которые включают в себя полную связывающую область FcRn. Fc может состоять из доменов CH2 и CH3 иммуноглобулина с шарнирной областью иммуноглобулина или без нее. Также включены Fc-фрагменты, варианты или производные, которые поддерживают желаемые свойства области Fc в слитом белке, например увеличение периода полувыведения, например, увеличение периода полувыведения *in vivo*. Бесчисленное множество мутантов, фрагментов, вариантов и производных описаны, например, в публикациях PCT № WO 2011/069164 A2, WO 2012/006623 A2, WO 2012/006635 A2 или WO 2012/006633 A2, все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Один или большее количество доменов Fc могут быть встроены в полипептид FIX, слиты с С-концом полипептида, или и то и другое. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения домен Fc сливают с другим гетерологичным фрагментом, таким как XTEN, который встраивают в FIX или сливают с С-концом XTEN. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения слитый белок FIX включает в себя второй домен Fc. Второй домен Fc может быть связан с первым доменом Fc, например, посредством одной или большего количества ковалентных связей.

II.B.3. Альбумины.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения по меньшей мере один гетерологичный фрагмент представляет собой альбумин, альбуминсвязывающий домен, малую альбуминсвязывающую молекулу, или ее вариант, производный или фрагмент. В некоторых аспектах слитый белок FIX по данному изобретению содержит по меньшей мере один альбуминовый полипептид или его фрагмент, вариант или производное, встроенный в FIX, слитый с С-концом FIX, или и то и другое, при этом слитый белок FIX обладает прокоагулянтной активностью и может быть экспрессирован в клетке-хозяине *in vivo* или *in vitro*. Сывороточный альбумин человека (HSA или HA), белок из 609 аминокислот в полноразмерной форме, ответственен за значительную долю осмотического давления сыворотки, а также функционирует как носитель эндогенных и экзогенных лигандов. В данном контексте термин "альбумин" включает в себя полноразмерный альбумин или его функциональный фрагмент, вариант, производное или аналог. Примеры альбумина или его фрагментов и вариантов описаны в публикациях патентов США № 2008/0194481 A1, 2008/0004206 A1, 2008/0161243 A1, 2008/0261877 A1 или 2008/0153751 A1, или публикациях патентов США № 2008/033413 A2, 2009/058322 A1 или 2007/021494 A2, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Альбуминсвязывающие полипептиды (ABP) могут негативно влиять, без ограничения, на бактериальные альбуминсвязывающие домены, альбуминсвязывающие пептиды или альбуминсвязывающие фрагменты антитела, которые могут связываться с альбумином. Домен 3 из стрептококкового протеина G, как описано в публикации Kraulis et al., *FEBS Lett.* 378: 190-194 (1996) и Linhult et al., *Protein Sci.* 11: 206-213 (2002) является примером бактериального альбуминсвязывающего домена. Примеры альбуминсвязывающих пептидов включают в себя

серию пептидов, имеющих сердцевинную последовательность DICLPRWGCLW (SEQ ID NO: 163). См., например, Dennis et al., J. Biol. Chem. 2002, 277: 35035-35043 (2002). Примеры фрагментов альбуминсвязывающих антител описаны в публикации Muller and Kontermann, Curr. Opin. Mol. Ther. 9: 319-326 (2007); Roovers et al., Cancer Immunol. Immunother. 56: 303-317 (2007), и Holt et al., Prot. Eng. Design Sci., 21: 283-288 (2008), которые включены в данный документ в полном объеме посредством ссылки.

В некоторых аспектах слитый белок FIX по данному изобретению содержит по меньшей мере один участок прикрепления для непептидной малой молекулы, ее варианта или производного, которая может связываться с альбумином (например, малая альбуминсвязывающая молекула), встроенную в FIX, слитую с С-концом FIX или и то и другое, при этом слитый белок FIX обладает прокоагулянтной активностью и может быть экспрессирован в клетке-хозяине *in vivo* или *in vitro*. Например, слитый белок FIX по данному изобретению может включать в себя один или большее количество органических альбуминсвязывающих фрагментов, прикрепленных в одном или большем количестве участков встраивания в FIX, или слитых с С-концом FIX, или и то и другое, при этом слитый белок FIX обладает прокоагулянтной активностью и может быть экспрессирован в клетке-хозяине *in vivo* или *in vitro*. Примером таких альбуминсвязывающих фрагментов является 2-(3-малеимидопропанамидо)-6-(4-(4-иодфенил)бутанамидо)гексаноат (тег "Альбу"), как описано в публикации Trussel et al., Bioconjugate Chem. 20: 2286-2292 (2009). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения последовательность альбуминсвязывающего полипептида фланкирована на С-конце, N-конце или обоих концах посредством последовательности пептидного линкера Gly-Ser. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер Gly-Ser представляет собой Gly₄Ser (SEQ ID NO: 161). В других вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер Gly-Ser представляет собой (Gly₄Ser)₂ (SEQ ID NO: 162).

II.B.4. CTP

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения по меньшей мере один гетерологичный фрагмент представляет собой С-концевой пептид (СТР) β-субъединицы хорионического гонадотропина человека или его фрагмента, варианта или производного. В некоторых аспектах слитый белок FIX по данному изобретению содержит по меньшей мере один СТР или его фрагмент, вариант или производное, встроенный в FIX, слитый с С-концом FIX, или и то и другое, при этом слитый белок FIX обладает прокоагулянтной активностью и может быть экспрессирован в клетке-хозяине *in vivo* или *in vitro*. Известно, что один или большее количество пептидов СТР, встроенных в рекомбинантный белок, увеличивают период полувыведения этого белка. См., например, в патенте США № 5712122, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме. Типовые пептиды СТР включают в себя DPRFQDSSSSKAPPSLPSPSRLPGPSDTPIL (SEQ ID NO: 164) или SSSSKAPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 165). См., например, в публикации заявки на патент США № US 2009/0087411 A1, включенной в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения последовательность СТР фланкирована на С-конце, N-конце или обоих концах посредством последовательности пептидного линкера Gly-Ser. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер Gly-Ser представляет собой Gly₄Ser (SEQ ID NO: 161). В других вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер Gly-Ser представляет собой (Gly₄Ser)₂ (SEQ ID NO: 162).

II.B.5. PAS

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения по меньшей мере один гетерологичный фрагмент представляет собой пептид PAS. В некоторых аспектах слитый белок FIX по данному изобретению содержит по меньшей мере один пептид PAS или его фрагмент, вариант или производное, встроенный в FIX, слитый с С-концом FIX, или и то и другое, при этом слитый белок FIX обладает прокоагулянтной активностью и может быть экспрессирован в клетке-хозяине *in vivo* или *in vitro*. В данном контексте термин "пептид PAS" или "последовательность PAS" означает аминокислотную последовательность, содержащую главным образом аланиновые и сериновые остатки или содержащую главным образом остатки аланина, серина и пролина, аминокислотную последовательность, образующую неупорядоченную конформацию в физиологических условиях. Соответственно, последовательность PAS представляет собой строительный блок, аминокислотный полимер или кассету последовательности, содержащую, состоящую, по существу, из, или состоящую из аланина, серина и пролина, которую можно применять как часть гетерологичного фрагмента в слитом белке. Аминокислотный полимер также может образовывать неупорядоченную конформацию, когда остатки, за исключением аланина, серина и пролина, добавляют в качестве минимальной составляющей в последовательности PAS. Под термином "минимальная составляющая" подразумевается, что аминокислоты, за исключением аланина, серина и пролина, могут быть добавлены в последовательность PAS до определенной степени, например, до около 12%, т.е. около 12 из 100 аминокислот последовательности PAS, до около 10, до около 9, до около 8, около 6, около 5, около 4, около 3%, т.е. около 2 или около 1% аминокислот.

Аминокислоты, за исключением аланина, серина и пролина, могут быть выбраны из группы, состоящей из Arg, Asn, Asp, Cys, Gin, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr и Val. В физиологических условиях пептид PAS образует неупорядоченную конформацию и тем самым может опосредовать

повышение стабильности *in vivo* и/или *in vitro* к рекомбинантному белку по данному изобретению, и при этом имеет прокоагулянтную активность.

Неограничивающие примеры пептидов PAS включают в себя ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO: 154), AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (SEQ ID NO: 155), APSSPSAPSSPSASPSS (SEQ ID NO: 156), APSSPSAPSSPSAPSPS (SEQ ID NO: 157), SSPSAPSSPSAPSSPSA (SEQ ID NO: 158), AAS-PAAPSAPPAASPAAPSAPPA (SEQ ID NO: 159), ASAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO: 160) или любые варианты, производные, фрагменты или их комбинации. Дополнительные примеры последовательностей PAS описаны, например, в публикации патента США № 2010/0292130 A1, публикации патента США № WO 2008/155134 A1 и Европейского патента EP 2173890.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения последовательность PAS фланкирована на С-конце, N-конце или обоих концах посредством последовательности пептидного линкера Gly-Ser. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер Gly-Ser представляет собой Gly₄Ser (SEQ ID NO: 161). В других вариантах осуществления данного изобретения пептидный линкер Gly/Ser представляет собой (Gly₄Ser)₂ (SEQ ID NO: 162).

II.B.6. НАР.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения по меньшей мере один гетерологичный фрагмент представляет собой пептид гомополимера аминокислоты (НАР) или его фрагмент, вариант или производное. В некоторых аспектах слитый белок FIX по данному изобретению содержит по меньшей мере один пептид гомополимера аминокислоты (НАР) или его фрагмент, вариант или производное, встроенный в FIX, слитый с С-концом FIX, или и то и другое, при этом слитый белок FIX обладает прокоагулянтной активностью и может быть экспрессирован в клетке-хозяине *in vivo* или *in vitro*. Пептид НАР может содержать повторяющуюся последовательность глицина, которая содержит по меньшей мере 50 аминокислот, по меньшей мере 100 аминокислот, 120 аминокислот, 140 аминокислот, 160 аминокислот, 180 аминокислот, 200 аминокислот, 250 аминокислот, 300 аминокислот, 350 аминокислот, 400 аминокислот, 450 аминокислот или 500 аминокислот в длину. Последовательность НАР способна продлить период полувыведения фрагмента, слитого или связанного с последовательностью НАР. Неограничивающие примеры последовательности НАР включают в себя, но не ограничиваются ими (Gly)_n, (Gly₄Ser)_n или S(Gly₄Ser)_n, где n равно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В одном варианте осуществления данного изобретения n равно 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40. В другом варианте осуществления данного изобретения n равно 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200. См., например, Schlapschy M et al., Protein Eng. Design Selection, 20: 273-284 (2007).

II.B.7. Органические полимеры.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения по меньшей мере один гетерологичный фрагмент представляет собой органический полимер, например полиэтиленгликоль, полисиаловую кислоту или гидроксипропилкрахмал. В некоторых аспектах слитый белок FIX по данному изобретению содержит по меньшей мере один участок прикрепления для неполипептидной гетерологичной компоненты или фрагмента, его варианта или производного, встроенного в FIX, слитого с С-концом FIX, или и то и другое, при этом слитый белок FIX обладает прокоагулянтной активностью и может быть экспрессирован в клетке-хозяине *in vivo* или *in vitro*, например, слитый белок FIX по данному изобретению может включать в себя один или большее количество молекул полиэтиленгликоля (ПЭГ), прикрепленных к последовательности FIX, или прикрепленных к С-концу FIX, или и то и другое, при этом слитый белок FIX обладает прокоагулянтной активностью и может быть экспрессирован в клетке-хозяине *in vivo* или *in vitro*. Термин "ПЭГилированный FIX" может относиться к конъюгату, образованному между FIX и по меньшей мере одной молекулой полиэтиленгликоля (ПЭГ). ПЭГ является коммерчески доступным в большом разнообразии молекулярных масс и диапазонов средней молекулярной массы. Типичные примеры диапазонов средней молекулярной массы ПЭГ включают в себя, но не ограничиваются ими, около 200, около 300, около 400, около 600, около 1000, около 1300-1600, около 1450, около 2000, около 3000, около 3000-3750, около 3350, около 3000-7000, около 3500-4500, около 5000-7000, около 7000-9000, около 8000, около 10000, около 8500-11500, около 16000-24000, около 35000, около 40000, около 60000 и около 80000 дальтон. Эти средние молекулярные массы представлены только в качестве примеров и никоим образом не предназначены для ограничения.

Слитый белок FIX по данному изобретению может быть ПЭГилирован с включением моно- или поли- (например, 2-4) молекул ПЭГ. ПЭГилирование может быть осуществлено с помощью любой из реакций ПЭГилирования, известных в данной области техники. Способы получения ПЭГилированного белкового продукта обычно включают в себя:

(i) реакцию полипептида с полиэтиленгликолем (таким как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное ПЭГ) в условиях, когда пептид по данному изобретению присоединяют к одной или большему количеству групп ПЭГ; и

(ii) получение продукта(ов) реакции. Как правило, оптимальные условия реакции для реакций будут определяться в каждом конкретном случае на основе известных параметров и желаемого результата.

Существует несколько способов прикрепления ПЭГ, доступных специалистам в данной области

техники, например, Malik F et al., *Exp. Hematol.* 20: 1028-35 (1992); Francis, *Focus on Growth Factors* 3(2): 4-10 (1992); европейские патенты. № EP0401384, EP0154316 и EP0401384; и публикации международных заявок на патенты. № WO92/16221 и WO95/34326. В качестве неограничивающего примера варианты FIX могут содержать цистеиновые замены в одном или большем количестве участков встраивания или около них, как описано в данном документе, при этом цистеины могут быть дополнительно конъюгированы с ПЭГ-полимером. См. Mei et al., *Blood* 116: 270-279 (2010) и в патенте США № 7632921, которые включены в данное описание посредством ссылки в полном объеме.

В других вариантах осуществления данного изобретения органический полимер представляет собой полисиаловую кислоту (PSA). PSA представляют собой встречающиеся в природе неразветвленные полимеры сиаловой кислоты, продуцируемые некоторыми бактериальными штаммами и у млекопитающих в определенных клетках. См., например, Roth J. et al. (1993) in *Polysialic Acid: From Microbes to Man*, eds. Roth J., Rutishauser U., Troy F. A. (Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland), pp. 335-348. PSA могут быть получены в различной степени полимеризации из $n \approx 80$ или более остатков сиаловой кислоты вплоть до $n=2$ с помощью ограниченного кислотного гидролиза или путем расщепления нейраминидазами или путем фракционирования естественных, производных от бактерий форм полимера. Существует несколько способов прикрепления PSA, доступных специалистам в данной области техники, например способы, аналогичные способам прикрепления ПЭГ, описанным выше. В некоторых аспектах активированную PSA также можно присоединить к аминокислотному остатку цистеина на FIX. См., например, в патенте США № 5846951.

В других вариантах осуществления данного изобретения органический полимер представляет собой полимер гидроксиэтилкрахмала (HES). В некоторых аспектах слитый белок FIX по данному изобретению содержит по меньшей мере один полимер HES, конъюгированный с одним или большим количеством участков в FIX, слитый с С-концом FIX, или и то и другое, при этом слитый белок FIX обладает прокоагулянтной активностью и может быть экспрессирован в клетке-хозяине *in vivo* или *in vitro*.

III. Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева и способы их получения.

В данном изобретении дополнительно предлагается полинуклеотид, кодирующий слитый белок FIX, описанный в данном документе, экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид, клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид или вектор, или способы получения слитого белка FIX.

Полинуклеотид, кодирующий слитый белок FIX, может представлять собой одну нуклеотидную последовательность, две нуклеотидные последовательности, три нуклеотидные последовательности или более. В одном варианте осуществления данного изобретения одна нуклеотидная последовательность кодирует слитый белок FIX, содержащий полипептид FIX и гетерологичный фрагмент (например, XTEN), например, слитый белок FIX, содержащий полипептид FIX и XTEN, встроенный в полипептид FIX, домен Fc, слитый с С-концом полипептида FIX, и второй домен Fc, слитый с полипептидом FIX посредством необязательного линкера. В другом варианте осуществления данного изобретения полинуклеотид содержит две нуклеотидные последовательности, первую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид FIX, и XTEN, встроенный в полипептид FIX, и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую гетерологичный фрагмент, например Fc. В других вариантах осуществления данного изобретения полинуклеотид содержит две нуклеотидные последовательности, первую нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид FIX, XTEN, встроенный в полипептид FIX, и домен Fc, слитый с полипептидом FIX, и вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую второй домен Fc. Закодированные домены Fc могут образовывать ковалентную связь после экспрессии.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения полинуклеотид, кодирующий слитый белок FIX, является кодон-оптимизированным.

В данном контексте термин "экспрессионный вектор" относится к любой конструкции нуклеиновой кислоты, которая содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции встроенной кодирующей последовательности, или в случае РНК-вирусного вектора, необходимые элементы для репликации и трансляции при введении в пригодную клетку-хозяина. Экспрессионные векторы могут включать в себя плазмиды, фагемиды, вирусы и их производные.

В данном контексте термин "последовательность контроля экспрессии гена" означает любую регуляторную нуклеотидную последовательность, такую как промоторная последовательность, или комбинацию "промотор-энхансер", которая облегчает эффективную транскрипцию и трансляцию кодирующей нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана. Последовательность контроля экспрессии гена, может быть, например, промотором млекопитающего или вирусным промотором, таким как конститутивный или индуцируемый промотор. Конститутивные промоторы млекопитающих включают в себя, но не ограничиваются этим, промоторы для следующих генов: гипоксантинфосфорибозилтрансферазу (HPRT), аденозиндезаминазу, пируваткиназу, бета-актиновый промотор и другие конститутивные промоторы. Типовые вирусные промоторы, которые конститутивно функционируют в эукариотических клетках, включают в себя, например, промоторы из цитомегаловируса (CMV), вируса обезьян (например, SV40), вируса папилломы, аденовируса, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса саркомы Рауса, цитомегаловируса, длинные концевые повторы (LTR) вируса лейкоза Молони и других ретровирусов, а также промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса. Специалистам в данной области техники так-

же известны другие конститутивные промоторы. Промоторы, применяемые в качестве последовательностей экспрессии гена по данному изобретению, также включают в себя индуцируемые промоторы. Индуцируемые промоторы экспрессируются в присутствии индуцирующего агента, например, металлотионеиновый промотор индуцируется для стимулирования транскрипции и трансляции в присутствии определенных ионов металлов. Специалистам в данной области техники также известны другие индуцируемые промоторы.

Для целей данного изобретения могут применяться многочисленные системы экспрессионных векторов. Как правило, эти экспрессионные векторы обычно реплицируются в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо как неотъемлемая часть хромосомной ДНК хозяина. Экспрессионные векторы могут включать в себя последовательности контроля экспрессии, включающие, но не ограничиваясь ими, промоторы (например, естественно-ассоциированные или гетерологичные промоторы), энхансеры, сигнальные последовательности, сигналы сплайсинга, энхансерные элементы и последовательности терминирования транскрипции. Предпочтительно, последовательности контроля экспрессии представляют собой эукариотические промоторные системы в векторах, способные трансформировать или трансфицировать клетки эукариотических хозяев. В экспрессионных векторах могут также использоваться элементы ДНК, которые получены из вирусов животных, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус полиомы, аденовирус, вирус осповакцины, бакуловирус, ретровирусы (RSV, MMTV или MOMLV), цитомегаловирус (CMV) или вирус SV40. Другие включают применение полицистронных систем с внутренними участками связывания рибосом. В большинстве случаев экспрессионные векторы содержат селективные маркеры (например, резистентности к ампициллину, резистентности к гигромицину, резистентности к тетрациклину, или резистентности к неомицину), необходимые для выявления клеток, трансформированных желаемыми последовательностями ДНК (см., например, Itakura et al., патент США № 4704362). Клетки с интегрированной ДНК в своих хромосомах можно отобрать путем введения одного или большего количества маркеров, которые позволяют отбирать трансфицированные клетки-хозяева. Маркер может обеспечить прототрофию аутокотрофному хозяину, резистентность к биоцидам (например, антибиотикам) или резистентность к тяжелым металлам, таким как медь. Селектируемый маркерный ген может быть либо непосредственно связан с последовательностями ДНК, которые должны быть экспрессированы, либо введен в одну и ту же клетку путем котрансформации.

Примером вектора, пригодного для экспрессии оптимизированной последовательности FIX, является NEOSPLA (см. в патенте США № 6159730). Этот вектор содержит промотор/энхансер цитомегаловируса, основной промотор мышинового бета-глобина, источник репликации SV40, последовательность полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота, экзон 1 и экзон 2 неомицинофосфотрансферазы, ген дигидрофолатредуктазы и лидерную последовательность. Было обнаружено, что этот вектор обуславливает очень высокий уровень экспрессии антител после включения генов варибельной и константной области, трансфекции в клетках с последующим отбором в G418, содержащим среду и амплификацию метотрексатом. Векторные системы также описаны в патентах США № 5736137 и 5658570, каждый из которых включен в данное описание посредством ссылки в полном объеме. Эта система обеспечивает высокий уровень экспрессии, например >30 пг/клеток/сут. Другие типовые векторные системы описаны, например, в патенте США № 6413777.

В других вариантах осуществления данного изобретения полипептиды по данному изобретению экспрессируются с применением полицистронных конструкций. В этих системах экспрессии множество представляющих интерес продуктов гена, таких как множественные полипептиды мультимерсвязывающего белка, могут быть получены из одной полицистронной конструкции. В этих системах преимущественно применяют участок внутренней посадки рибосомы (IRES) для обеспечения относительно высоких уровней полипептидов в эукариотических клетках-хозяевах. Совместимые с IRES последовательности описаны в патенте США № 6193980, который также включен в данный документ.

В более широком смысле, сразу после получения последовательности вектора или ДНК, кодирующей полипептид, экспрессионный вектор можно вводить в соответствующую клетку-хозяин. Другими словами, клетки-хозяева могут быть трансформированы. Введение плазмиды в клетку-хозяин можно осуществить различными способами, хорошо известными специалистам в данной области техники, как обсуждалось выше. Трансформированные клетки выращивают в условиях, пригодных для продуцирования полипептида FIX, и анализируют на синтез полипептида FIX. Примеры методов анализа включают в себя твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA) или анализ сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS), иммуногистохимию и тому подобное.

В описаниях процессов выделения полипептидов из рекомбинантных хозяев термины "клетка" и "культура клеток" применяются взаимозаменяемо, чтобы обозначать источник полипептида, если только он четко не определен. Другими словами извлечение полипептидов из "клеток" может означать извлечение либо из отцентрифугированных цельных клеток, либо из культуры клеток, содержащей как среду, так и суспендированные клетки.

Линия клеток-хозяев, применяемая для экспрессии белка, предпочтительно является производной от млекопитающего; наиболее предпочтительно, является производной от человека или мыши. Типовые линии клеток-хозяев описаны выше. В одном варианте осуществления способа получения полипептида с

активностью FIX клетка-хозяин представляет собой клетку HEK293. В другом варианте осуществления способа получения полипептида с активностью FIX клетка-хозяин представляет собой клетку CHO. Гены, кодирующие полипептиды по данному изобретению может также экспрессироваться в клетках, не относящихся к млекопитающим, таких как бактерии или клетки дрожжей или растений. В этой связи следует понимать, что различные одноклеточные микроорганизмы, не относящиеся к млекопитающим, такие бактерии также можно трансформировать; т.е. применять такие микроорганизмы, которые можно выращивать в культуре или подвергать ферментации. Бактерии, которые чувствительны к трансформации, включают представителей семейства Enterobacteriaceae, таких как штаммы *Escherichia coli* или *Salmonella*; *Bacillaceae*, например *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, а также *Haemophilus influenzae*. Следует также понимать, что, когда они экспрессируются в бактериях, полипептиды, как правило, становятся частью телец включения. Полипептиды должны быть выделены, очищены и затем собраны в функциональные молекулы.

В альтернативном варианте полинуклеотидные последовательности по данному изобретению могут быть включены в трансгены для введения в геном трансгенного животного и последующей экспрессии в молоке трансгенного животного (см., например, Deboer et al., US 5741957, Rosen, US 5304489, и Meade et al., US 5849992). Пригодные трансгены включают кодирующие последовательности для полипептидов в функциональной связи с промотором и энхансером из специфического гена молочной железы, такого как казеин или бета-лактоглобулин.

Синтез *in vitro* позволяет увеличить масштабы продукции с получением больших количеств желаемых полипептидов. Способы культивирования клеток млекопитающих в условиях тканевой культуры известны в данной области техники и включают в себя гомогенную суспензионную культуру, например, в воздушном реакторе или в реакторе непрерывной мешалки, или в условиях иммобилизованной или захваченной культуры клеток, например, в полых волокнах, микрокапсулах, на агарозных микрогранулах или на керамических картриджах. Если необходимо и/или желательно, растворы полипептидов могут быть очищены с помощью обычных методов хроматографии, например гель-фильтрацией, ионообменной хроматографией, хроматографией на DEAE-целлюлозе или (иммуно-аффинной хроматографией), например, после предпочтительного биосинтеза синтетического полипептида с шарнирной областью или до или после этапа хроматографии с гидрофобным взаимодействием (ХГВ), описанного в данном документе. Последовательность аффинного тега (например, тега His (6)) необязательно может быть присоединена или включена в полипептидную последовательность для облегчения последующей очистки.

После экспрессии белок FIX можно очистить согласно стандартным процедурам, известным в данной области техники, включая осаждение сульфатом аммония, хроматографию с колонкой для аффинной хроматографии, очистку ВЭЖХ, гель-электрофорез и тому подобное (см., в общих чертах, Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, N. Y., (1982))). Для применения в фармацевтических целях предпочтительными являются, по существу, чистые белки, имеющие по меньшей мере от около 90 до 95% гомогенности, а наиболее предпочтительно от 98 до 99% или более гомогенности. В одном варианте осуществления данного изобретения клетка-хозяин является эукариотической клеткой. В данном контексте термин "эукариотическая клетка" относится к любой клетке животного или растения, имеющей точно определенное ядро. Эукариотические клетки животных включают в себя клетки позвоночных, например млекопитающих, и клетки беспозвоночных, например насекомых. Эукариотические клетки растений могут включать в себя, без ограничения, дрожжевые клетки. Эукариотическая клетка отличается от прокариотической клетки, например, бактерии.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего. Клетка млекопитающего представляет собой любую клетку, полученную от млекопитающего. Клетки млекопитающих конкретно включают в себя, но не ограничиваются ими, линии клеток млекопитающих. В одном варианте осуществления данного изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку человека. В другом варианте осуществления данного изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку HEK 293, которая является линией эмбриональных клеток почки человека. Клетки HEK 293 доступны в виде CRL-1533 в Американской коллекции типовых культур, Манассас, штат Виргиния, и в виде клеток 293-H, № по каталогу 11631-017 или 293-F, № по каталогу 11625-019 от компании Invitrogen (Карлсбад, штат Калифорния). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку PER. C6®, которая является линией клеток человека, полученных из сетчатки. Клетки PER. C6® доступны от компании Crucell (Лейден, Нидерланды). В других вариантах осуществления данного изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку яйчника китайского хомячка (CHO). Клетки CHO доступны в Американской коллекции типовых культур, Манассас, штат Виргиния (например, CHO-K1; CCL-61). В других вариантах осуществления данного изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку почки детеныша хомячка (ВНК). Клетки ВНК доступны в Американской коллекции типовых культур, Манассас, штат Виргиния (например, CRL-1632). В некоторых вариантах осуществления данного изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку НКВ11, которая является гибридной клеточной линией клетки HEK293 и линии В-клеток человека. Mei et al., *Mol. Biotechnol.* 34(2): 165-78

(2006).

В других вариантах осуществления данного изобретения трансфицированные клетки являются стабильно трансфицированной. Эти клетки могут быть выбраны и поддерживаться в качестве стабильной линии клеток с помощью обычных методов, известных специалистам в данной области техники.

Клетки-хозяева, содержащие ДНК-конструкции белка, выращивают в пригодной для выращивания среде. В данном контексте термин "пригодная для выращивания среда" означает среду, содержащую питательные вещества, необходимые для роста клеток. Питательные вещества, необходимые для роста клеток, могут включать в себя источник углерода, источник азота, незаменимые аминокислоты, витамины, минералы и факторы роста. Необязательно среда может содержать один или большее количества селективных факторов. Необязательно среда может содержать телячью сыворотку или эмбриональную телячью сыворотку (FCS). В одном варианте осуществления данного изобретения среда, по существу, не содержит какого-либо IgG. Как правило, среду для выращивания для клеток, содержащих конструкцию ДНК, будут выбирать, например, на основании чувствительности к лекарственному препарату или дефицита незаменимого питательного вещества, и будут дополнять селективируемым маркером на конструкции ДНК или котрансфицировать конструкцией ДНК. Как правило, культивируемые клетки млекопитающих выращивают в коммерчески доступных средах, содержащих или не содержащих сыворотку (например, MEM, DMEM, DMEM/F12). В одном варианте осуществления данного изобретения среда представляет собой CD293 (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния). В другом варианте осуществления данного изобретения среда представляет собой CD17 (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния). Выбор среды, пригодной для конкретной применяемой линии клеток, находится в компетенции специалистов в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения нуклеиновая кислота, вектор или клетка-хозяин дополнительно содержит дополнительный нуклеотид, который кодирует белок-конвертазу. Белок-конвертаза может быть выбран из группы, состоящей из пропротеиновой конвертазы субтилизин/кексина 5-го типа (PCSK5 или PC5), пропротеиновой конвертазы субтилизин/кексина 7-го типа (PCSK7 или PC7), дрожжей Kex 2, пропротеиновой конвертазы субтилизин/кексина 3-го типа (PACE или PCSK3), а также двух или большего количества их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения белок-конвертаза представляет собой PACE, PC5 или PC7. В конкретном варианте осуществления данного изобретения белок-конвертаза представляет собой PC5 или PC7. См. в международной публикации патента США № WO 2012/006623, которая включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки. В другом варианте осуществления данного изобретения белок-конвертаза представляет собой PACE/фурин.

В некоторых аспектах данное изобретение относится к слитому белку FIX, получаемому согласно описанным в данном документе способам.

В некоторых аспектах клетки-хозяева по данному изобретению могут экспрессировать слитый белок FIX *in vivo* или *in vitro*. Синтез *in vitro* позволяет увеличить масштабы продукции с получением большого количества желаемых измененных полипептидов по данному изобретению. Слитый белок FIX может быть получен путем культивирования клеток-хозяев, описанных в данном документе, в условиях, в которых экспрессируется белок FIX. Способы культивирования клеток млекопитающих в условиях тканевой культуры известны в данной области техники и включают в себя гомогенную суспензионную культуру, например, в воздушном реакторе или в реакторе непрерывной мешалки, или в условиях иммобилизованной или захваченной культуры клеток, например, в полых волокнах, микрокапсулах, на агарозных микрогранулах или на керамических картриджах. Если необходимо и/или желательно, растворы полипептидов могут быть очищены с помощью обычных методов хроматографии, например гель-фильтрацией, ионообменной хроматографией, хроматографией с гидрофобным взаимодействием (ХГВ), хроматографией на DEAE-целлюлозе или аффинной хроматографией. В других аспектах клетки-хозяева экспрессируют слитый белок FIX *in vivo*.

В одном варианте осуществления, данное изобретение включает в себя способ получения слитого белка FIX, содержащего встроенный гетерологичный фрагмент в участке встраивания, слияние гетерологичного фрагмента с С-концом FIX, или и то и другое, при этом слитый белок FIX проявляет прокоагулянтную активность. В другом варианте осуществления, данное изобретение включает в себя способ увеличения периода полувыведения белка FIX без устранения или снижения прокоагулянтной активности белка FIX, включающий введение гетерологичного фрагмента в участок встраивания, слияние гетерологичного фрагмента с С-концом FIX, или и то и другое, как описано в данном документе, при этом слитый белок FIX проявляет прокоагулянтную активность и увеличивается период полувыведения по сравнению с белком FIX без гетерологичного фрагмента.

В других вариантах осуществления, данное изобретение относится к способу конструирования слитого белка FIX, включающему конструирование нуклеотидной последовательности, кодирующей слитый белок FIX, содержащий по меньшей мере один гетерологичный фрагмент в участке встраивания, являющийся слитым с С-концом FIX, или и то и другое, как описано в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления, данное изобретение включает в себя способ увеличения уровня экспрессии слитого белка FIX, включающий встраивание гетерологичного фрагмента в участок встраивания, слияние с С-концом FIX, или и то и другое, как описано в данном документе, при этом сли-

тый белок FIX проявляет прокоагулянтную активность.

В других вариантах осуществления данного изобретения предлагается способ сохранения прокоагулянтной активности слитого белка FIX, включающий встраивание гетерологичного фрагмента в участок встраивания, слияние гетерологичного фрагмента с С-концом FIX, или и то и другое, при этом слитый белок FIX проявляет прокоагулянтную активность.

IV. Фармацевтические композиции и способы лечения.

В данном изобретении дополнительно предлагается способ профилактики, лечения, облегчения или контроля заболевания или патологического состояния, связанного с кровотечением, у человека, имеющего для этого показания, с применением фармацевтической композиции, содержащей слитый белок FIX по данному изобретению. Типовой способ включает в себя введение субъекту, имеющему для этого показания, терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции/состава, содержащего слитый белок FIX по данному изобретению. В других аспектах, композицию, содержащую ДНК, кодирующую слитый белок по данному изобретению, можно вводить субъекту, имеющему для этого показания. В некоторых аспектах данного изобретения клетку, экспрессирующую слитый белок FIX по данному изобретению, можно вводить субъекту, имеющему для этого показания. В некоторых аспектах данного изобретения фармацевтическая композиция содержит:

- (i) слитый белок FIX;
- (ii) выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок FIX;
- (iii) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок FIX;
- (iv) клетку, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок FIX, и/или вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок FIX; или
- (v) их комбинацию, при этом фармацевтические композиции дополнительно содержат приемлемое вспомогательное вещество или носитель.

Слитый белок FIX по данному изобретению можно вводить пациенту внутривенно, подкожно или перорально. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения слитый белок FIX вводят субъекту путем внутривенной инъекции. В других вариантах осуществления данного изобретения слитый белок FIX вводят субъекту путем подкожной инъекции. Инъекции могут содержать одну болюсную дозу. Субъекты могут получать более одной инъекции.

Слитые белки по данному изобретению могут применяться с профилактической целью. В данном контексте термин "профилактическое воздействие" относится к введению молекулы до эпизода кровотечения. В одном варианте осуществления данного изобретения, субъекту, имеющему показания для введения общего гемостатического агента, проводится или запланировано оперативное вмешательство. Слитый белок по данному изобретению можно вводить до или после оперативного вмешательства в качестве профилактического средства. Слитый белок по данному изобретению можно вводить до или после оперативного вмешательства для контроля эпизода острого кровотечения. Оперативное вмешательство может включать в себя, но не ограничивается этим, трансплантацию печени, резекцию печени, стоматологические процедуры или трансплантацию стволовых клеток.

Слитый белок по данному изобретению также применяется для лечения по необходимости. Термин "лечение по необходимости" относится к введению слитого белка при появлении симптомов эпизода кровотечения или перед деятельностью, которая может вызвать кровотечение. В одном аспекте лечение по необходимости вводят субъекту, когда начинается кровотечение, например после травмы, или когда ожидается кровотечение, например перед оперативным вмешательством. В другом аспекте лечение по необходимости проводят перед деятельностью, повышающей риск кровотечений, такой как контактный спорт.

В других вариантах осуществления данного изобретения слитый белок применяется для контроля, облегчения или лечения острого кровотечения. В других вариантах осуществления данного изобретения слитый белок FIX демонстрирует один или большее количество фармакокинетических параметров по сравнению с соответствующим белком FIX без гетерологичного фрагмента. Параметры ФК могут быть основаны на уровне антигена FIX (часто обозначаемом в данном документе в скобках как "антиген") или уровне активности FIX (часто обозначаемом в данном документе в скобках как "активность"). В литературе параметры ФК часто основаны на измерении уровня активности FIX из-за присутствия в плазме некоторых субъектов эндогенного, неактивного FIX, который препятствует измерению вводимого (т.е. экзогенного) FIX с помощью антитела против FIX. Однако, когда FIX вводят как часть слитого белка Fc, как указано в данном документе, уровень вводимого (т.е. экзогенного) антигена FIX можно точно измерить с применением антитела к гетерологичному полипептиду. Кроме того, некоторые параметры ФК могут быть основаны на модели прогнозируемых данных (часто обозначаемой в данном документе в скобках как "модель прогнозирования") или на данных наблюдений (часто обозначаемых в данном документе в скобках как "наблюдаемые") и предпочтительно основываются на данных наблюдений.

Слитый белок FIX можно вводить субъекту с помощью любых способов, известных в данной области техники, например слитый белок FIX можно вводить с помощью местного (например, трансдермального или глазного), перорального, буккального, назального, вагинального, ректального или парентерального (например, подкожной, внутрикожной, внутрисосудистой/внутривенной, внутримышечной,

спинальной, внутричерепной, интратекальной, внутриглазной, периглазной, внутриглазничной, внутрисуставной и внутрибрюшинной инъекции) пути введения. В одном конкретном варианте осуществления данного изобретения слитый белок FIX с помощью посредством подкожной инъекции. Подкожная инъекция может включать в себя один или большее количество болюсных доз, включая, например, одну болюсную дозу слитого белка FIX. В альтернативном варианте слитый белок FIX можно вводить внутривенно.

Доза слитого белка FIX может варьироваться в зависимости от природы конкретного слитого белка и характера состояния субъекта. В некоторых вариантах осуществления данного изобретения доза слитого белка FIX может содержать от 1 до 1000 МЕ/кг слитого белка FIX.

Патологическое состояние, сопровождающееся кровотечением, может быть обусловлено нарушением свертывания крови. Нарушение свертывания крови можно также назвать коагулопатией. В одном примере нарушение свертывания крови, которое можно лечить с помощью фармацевтической композиции по данному изобретению, представляет собой гемофилию. В другом примере нарушение свертывания крови, которое можно лечить с помощью фармацевтической композиции по данному изобретению, представляет собой гемофилию В.

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения тип кровотечения, ассоциированный с состоянием кровотечения, выбирают из гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения в полости рта, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в полость рта, травмы, травмы головы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома костей, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве и кровотечения во влагалище подвздошно-поясничной мышцы. В других вариантах осуществления данного изобретения субъект, страдающий от состояния кровотечения, имеет показания для лечения в связи с оперативным вмешательством, включая, например, профилактику хирургических кровотечений или контроль состояния до и после оперативного вмешательства. В одном примере оперативное вмешательство выбирают из малого хирургического вмешательства и обширного хирургического вмешательства. Примеры хирургических операций включают в себя удаление зубов, тонзиллэктомию, паховую герниотомию, синовэктомию, краниотомию, остеосинтез, травматологические операции, внутричерепные операции, внутрибрюшные операции, внутригрудные операции, операции по замене суставов (например, тотальная замена коленного сустава, замена тазобедренного сустава и т.п.), операции на сердце и кесарево сечение.

В другом примере субъект одновременно получает фактор VIII. Поскольку соединения по данному изобретению способны активировать FIXa, их можно применять для предварительной активации полипептида FIXa перед введением FIXa субъекту. Способы по данному изобретению могут быть осуществлены у субъекта, имеющему показания для профилактического воздействия или лечения по необходимости. Фармацевтические композиции, содержащие слитый белок FIX по данному изобретению, могут быть составлены для любого пригодного способа введения, включая, например, местное (например, трансдермальное или глазное), пероральное, буккальное, назальное, вагинальное, ректальное или парентеральное введение.

В данном контексте термин "парентеральный" включает в себя подкожную, внутрикожную, внутрисосудистую (например, внутривенную), внутримышечную, спинальную, внутричерепную, интратекальную, внутриглазную, периокулярную, внутриглазничную, внутрисуставную и внутрибрюшинную инъекцию, а также любую аналогичную технику инъекции или инфузии. В частности, фармацевтические композиции, содержащие слитый белок FIX по данному изобретению, могут быть составлены для подкожного введения. Композиция может также представлять собой, например, суспензию, эмульсию, состав с замедленным высвобождением, крем, гель или порошок. Композицию можно приготовить в виде суппозитория с традиционными связующими агентами и носителями, такими как триглицериды.

В одном примере фармацевтическая композиция представляет собой жидкую композицию, например забуференный, изотонический, водный раствор. В другом примере фармацевтическая композиция имеет значение pH, которое является физиологическим или близким к физиологическому. В других примерах водный состав имеет физиологические или близкие к физиологическим показатели осмолярности и солёности. Этот состав может содержать хлорид натрия и/или ацетат натрия. В некоторых примерах композиция по данному изобретению является лиофилизированной.

Слитый белок по настоящему изобретению может быть получен *in vivo* у млекопитающего, например, у пациента-человека, при этом ожидается клиническая эффективность генно-терапевтического подхода к лечению заболевания, сопровождающегося кровотечением, или нарушения, выбранного из группы, состоящей из нарушения свертывания крови, гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения в полости рта, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в полость рта, травмы, травмы головы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома костей, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве и кровотечения во влагалище подвздошно-поясничной мышцы. В одном варианте осуществления данного изобретения, заболевание или нарушение, сопровождающееся кровотечением, представляет собой гемофилию. В

другом варианте осуществления данного изобретения, заболевание или нарушение, сопровождающееся кровотечением, представляет собой гемофилию В. Данное изобретение включает введение пригодной нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, функционально связанной с пригодными последовательностями контроля экспрессии. В определенном варианте осуществления данного изобретения эти последовательности включены в вирусный вектор. Пригодные вирусные векторы для такой генной терапии включают аденовирусные векторы, лентивирусные векторы, бакуловирусные векторы, векторы вируса Эпштейна-Барр, паповавирусные векторы, векторы вируса осповакцины, векторы вирусов простого герпеса и векторы аденоассоциированного вируса (AAV). Вирусный вектор может быть репликативно-дефектным вирусным вектором. В других вариантах осуществления данного изобретения аденовирусный вектор имеет делецию в своем гене E1 или гене E3. В случае применения аденовирусного вектора, млекопитающее может не подвергаться воздействию нуклеиновой кислоты, кодирующей селектируемый маркерный ген. В других вариантах осуществления данного изобретения последовательности включены в невирусный вектор, известный специалистам в данной области техники.

Если не указано иное, то в практике данного изобретения будут применяться обычные методы клеточной биологии, клеточной культуры, молекулярной биологии, трансгенной биологии, микробиологии, рекомбинантной ДНК и иммунологии, которые известны специалистам в данной области техники. Такие методы подробно описаны в литературе. См., например, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Sambrook et al., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press: (1989); *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook et al., ed., Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1992), *DNA Cloning*, D. N. Glover ed., Volumes I and II (1985); *Oligonucleotide Synthesis*, M. J. Gait ed., (1984); Mullis et al., в патенте США № 4683195; *Nucleic Acid Hybridization*, B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984); *Transcription And Translation*, B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1984); *Culture Of Animal Cells*, R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc. (1987); *Immobilized Cells And Enzymes*, IRL Press, (1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); the treatise, *Methods In Enzymology*, Academic Press, Inc., N. Y. ; *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells*, J. H. Miller and M. P. Calos eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1987); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 and 155 (Wu et al., eds.); *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology*, Mayer and Walker, eds., Academic Press, London (1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volumes I-IV, D. M. Weir and C. C Blackwell, eds. (1986); *Manipulating the Mouse Embryo*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1986); и в Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989).

Стандартные справочные издания, в которых излагаются общие принципы иммунологии, включают: *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, New York; Klein, J., *Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination*, John Wiley & Sons, New York (1982); Roitt, I., Brostoff, J. and Male D., *Immunology*, 6th ed. London: Mosby (2001); Abbas A., Abul, A. and Lichtman, A., *Cellular and Molecular Immunology*, Ed. 5, Elsevier Health Sciences Division (2005); и Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988).

Опираясь на подробное описание данного изобретения, оно будет более понятным со ссылкой на следующие примеры, которые включены в данный документ исключительно в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения изобретения.

Примеры

Пример 1. Идентификация активных вариантов FIX-XTEN.

Сконструированы слитые белки FIX, содержащие полипептид FIX с одним или большим количеством встраиваний XTEN для улучшения свойств белка FIX. Однако расположение, длину, состав и количество модификаций XTEN можно легко изменить, а также можно оценить влияние этих изменений на активность и клиренс FIX. Настоящий пример направлен на идентификацию участков в FIX, в которые можно встроить XTEN без ослабления активности FIX и применять этот подход как к другим немодифицированным FIX, так и к рекомбинантному слитому белку FIX-Fc.

Способы.

Последовательность, кодирующую FIX-полипептид, лигировали в экспрессионный вектор pcDNA4/mys-His C (INVITROGEN™, Карлсбад, штат Калифорния) между участками BsiWI и PmeI после введения последовательности инициации трансляции Kozak (GCCGCCACC) непосредственно в 5' до кодона ATG, кодирующего стартовый остаток Met.

Клетки HEK293F (INVITROGEN™, Карлсбад, штат Калифорния) трансфицировали плазмидой с применением полиэтиленимина (PEI, Polysciences Inc., Уоррингтон, штат Пенсильвания). Временно трансфицированные клетки выращивали в среде FREESTYLE™ 293 или смеси сред FREESTYLE™ 293 и CD OPTICHO™ (INVITROGEN™, Карлсбад, штат Калифорния). Среду для культивирования клеток собирали через 5 дней после трансфекции и анализировали на активность FIX посредством хромогенного анализа или анализа активности аЧТВ FIX.

Хромогенную активность FIX измеряли с применением набора BIOPHEN Factor IX от компании Aniaga и все инкубации проводили на нагревательном планшете при 37°C со встряхиванием. Сбор культуры клеток из временно трансфицированных сред вариантов FIX-XTEN из 6-луночных планшетов раз-

бавляли до желаемого диапазона активности FIX с применением буфера для разбавления Tris-BSA (R4). Стандарты FIX также готовили в буфере для разбавления Tris-BSA. Стандарты, образцы разбавленной культуры клеток и объединенный нормальный контроль плазмы человека для анализа (50 мкл/лунку) добавляли на 96-луночные планшеты IMMULON® 2HB в двух повторностях. Фактор X человека, FVIII: C и ингибитор полимеризации фибрина (50 мкл), 50 мкл смеси фактора XIIIa с тромбином, фосфолипидами и кальцием и 50 мкл хромогенного субстрата с фактором Ха (SXA-11) добавляли последовательно в каждую лунку, с 2-минутной инкубацией между каждым добавлением. После инкубации с субстратом, для прекращения цветовой реакции добавляли 50 мкл 20% уксусной кислоты и измеряли оптическую плотность при 405 нм с помощью прибора SPECTRAMAX® плюс (MOLECULAR DEVICES®). Анализ данных выполняли с помощью SOFTMAX® Pro Software (версия 5. 2). Для оценки активности FIX применяли одноэтапный анализ коагуляции с учетом активированного частичного тромбопластинового времени (аЧТВ). Активность аЧТВ FIX-XTEN измеряли с помощью прибора SYSMEX® CA-1500 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Тэрритаун, штат Нью-Йорк). С целью создания стандартной кривой для анализа, стандарт WHO Фактора IX разбавляли имитационной трансфекционной средой с соответствующей концентрацией культуральной среды в качестве анализируемого образца. Сбор культуры клеток из временно трансфицированных сред вариантов FIX-XTEN из 6-луночных планшетов разбавляли до желаемого диапазона активности FIX с применением имитационной трансфекционной среды. После разведения проводили анализ аЧТВ с помощью прибора Sysmex следующим образом: 50 мкл разбавленных стандартов и образцов смешивали с 50 мкл FIX-обеденной плазмы человека Siemens (Siemens human FIX depleted Plasma), а затем с 50 мкл активатора актина FSL (эллагиновая кислота) Siemens (Siemens Actin FSL (ellagic acid) activator). Смесь инкубировали в течение 1 мин. Затем к смеси добавляли 50 мкл Siemens CaCl₂ и инкубировали в течение 240 с. Сразу же после инкубации измеряли время свертывания. С целью определения активности FIX в анализируемых образцах, время свертывания стандартов наносили на график с помощью логарифмических шкал, чтобы экстраполировать согласованность между временем свертывания и активностью FIX, а затем рассчитывали активность FIX-XTEN по стандартной кривой.

Выбор участков встраивания.

Для выбора участков встраивания XTEN в FIX анализировали структуры FIX из Банка белковых структур: 1PFX, 1IXA, 1CFI, 1CFH, 1EDM, 3LC3, 3LC5, 1RFN, 1X7A и 3KCG. Встраивание XTEN в домен GLA исключали из-за существенной роли домена GLA в закреплении FIX на поверхностях фосфолипидов и субэндотелиальном коллагене типа IV. Участки встраивания XTEN отбирали путем анализа имеющихся структур FIX в Банка белковых структур в сочетании со следующими критериями:

- 1) рассчитанная доступная площадь поверхности с помощью алгоритмического программного обеспечения ASA View (<http://www.abren.net/asaview/>) и Get Area (<http://curie.utmb.edu/getarea.html>);
- 2) доступность растворителей, оцененная с помощью водород/дейтерий-обменной масс-спектрометрии (H/DX-MS);
- 3) исключение участков в определенных вторичных структурных элементах;
- 4) предпочтение положению со значительной вариабельностью межвидовой белковой последовательности и 5) исключение участков, близких к мутациям, известных своей связью с гемофилией В.

Для встраивания XTEN были отобраны четыре участка в домене EGF1, 5 участков в домене EGF2, 2 участка в области линкера между доменом AP и доменом EGF2, 4 участка в домене AP (активационный пептид) и 18 участков в каталитическом домене (табл. 6).

Таблица 6. Потенциальные участки для встраивания XTEN в FIX
(встраивание на с-конце указанного остатка)

Домен FIX	Отобранные участки
EGF1	E52, G59, I66, K80
EGF2	D85, N89, A103, N105, E113
Линкер	P129, K142
AP	V149, E162, D166, S174
Каталитический	K188, V202, E224, G226, K228, T230, E240, H257, K265, E277, S283, D292, K316, K341, H354, K392, R403, K413

Анализ активности встраиваний XTEN, состоящего из 42 аминокислот, и С-концевого слияния.

Высокоактивный вариант FIX Padua (R338L) применяли в качестве "скаффолда", противостоящего потенциальной потере активности FIX из-за снижения активности, вызванного встраиванием XTEN. Элемент XTEN, состоящий из 42 остатков, (AE42), встраивали в участки, выбранные с учетом вышеуказанных критериев или сливали с С-концом FIX. Активность FIX этих вариантов оценивали в кондиционированной среде трансфицированных клеток HEK293, как описано выше. Уровни активности FIX для FIX-AE42 отображены в процентах от базовой конструкции без XTEN, FIX-R338L (фиг. 1). Встраивание XTEN было успешным в ограниченном количестве участков, что определено хромогенным анализом FIX (фиг. 1 и табл. 7). В общей сложности 33 участка в FIX отбирали и оценивали путем встраивания AE-42.

Из них: два участка в домене EGF2, один - в области линкера между доменом EGF2 и доменом AP, четыре - в домене AP и четыре - в каталитическом домене, включая С-конец, с помощью анализа активности FIX были идентифицированы как пермиссивные участки (фиг. 1 и табл. 7).

Таблица 7. Примеры участков встраивания в FIX

Участок встраивания	Домен	Активн ость AE42	Активн ость AE72	Актив ность AE144	Актив ность AE288	Активн ость AE4864
52	EGF1	HO				
59	EGF1	HO				
66	EGF1	HO				
80	EGF1	HO				
85	EGF2	HO				
89	EGF2	HO				
103	EGF2	+	HO	HO	HO	HO
105	EGF2	+	HO	HO	HO	HO
113	EGF2	HO				
129	Линкер EGF2- AP	HO				
142	Линкер EGF2- AP	++	HO	HO	HO	HO
149	AP	+++	+	+	+	HO
162	AP	++	+	+	+	HO
166	AP	+++	+	+	+	HO
174	AP	+++	+	+	+	HO
188	Катали тический домен	HO				
202	Катали тический домен	+				
224	Катали тический домен	+	+	HO	HO	HO
226	Катали тический домен	+				
228	Катали тический домен	+				
230	Катали тический домен	HO				
240	Катали тический	HO				

	ий домен					
257	Катали тическ ий домен	+				
265	Катали тическ ий домен	НО				
277	Катали тическ ий домен	НО				
283	Катали тическ ий домен	НО				
292	Катали тическ ий домен	НО				
316	Катали тическ ий домен	НО				
341	Катали тическ ий домен	НО				
354	Катали тическ ий домен	НО				
392	Катали тическ ий домен	НО				
403	Катали тическ ий домен	НО				
413	Катали тическ ий домен	++	+	+	+	НО
415	С- конец	+++	+++	++	++	+

Примечание:

НО=активность не обнаружена;

(+)=обнаружено менее 30% активности;

(++)=от 30 до 70% активности; и

(+++)=более 70% активности, обнаруженной в процентах от базовой конструкции, с помощью хромогенного анализа (см. фиг. 5А-5С и 6А-6В).

Активность более длинных встраиваний XTEN и С-концевого слияния.

Затем более длинные XTEN (AE-72, -144 и -288) анализировали аналогичным образом на участках, показанных как пермиссивные относительно встраивания AE42. Уровни активности FIX определяли, как описано выше, и отображали в процентах от базовой конструкции без XTEN, FIX-R338L (фиг. 2).

Встраивание более длинных XTEN (AE144, AE288 или AE864) было успешным только на участках в AP и на участках, расположенных на С-конце FIX или близко к нему (фиг. 2). Уровень активности FIX, определяемый в кондиционированной среде, обратно коррелирует с длиной встроенного XTEN (фиг. 2, табл. 7). Для создания комбинаторной библиотеки были отобраны четыре пермиссивных участка встраивания в разных доменах FIX.

Множественные встраивания XTEN.

На основе результатов, полученных с применением отдельных вариантов XTEN, варианты FIX с множественными встраиваниями XTEN различной длины и в четырех разных местах (см. фиг. 4 и табл. 8) оценивали относительно уровня активности FIX в кондиционированной среде трансфицированных клеток НЕК293 с помощью анализа аЧТВ (табл. 8-10). Уровни активности FIX отображены в процентах от базовой конструкции без XTEN, FIX-R338L (фиг. 4).

Таблица 8. Примеры двойного встраивания в FIX

Участок встраивания 1	XTEN 1 (или Fc)	Участок встраивания 2	XTEN 2 (или Fc)	Активность
105	AE42			++
166	AE42			++
166	AE72			+
166	AE144			+
224	AE42			+
С-конец	AE72			++
С-конец	AE144			+
С-конец	AE288			+
С-конец	Fc			++
166	AE42	С-конец	AE72	++
166	AE42	С-конец	AE144	+
166	AE42	С-конец	AE288	+
166	AE72	С-конец	AE72	+
166	AE72	С-конец	AE144	+
166	AE72	С-конец	AE288	+
166	AE144	С-конец	AE72	+
166	AE144	С-конец	AE144	+
166	AE144	С-конец	AE288	+
105	AE42	166	AE42	+
105	AE42	166	AE72	+
105	AE42	166	AE144	НО
105	AE42	С-конец	AE72	+
105	AE42	С-конец	AE144	+
105	AE42	С-конец	AE288	+
105	AE42	224	AE42	+
166	AE42	224	AE42	+
166	AE72	224	AE42	+

166	AE144	224	AE42	НО
224	AE42	С-конец	AE72	+
224	AE42	С-конец	AE144	+
224	AE42	С-конец	AE288	+
105	AE42	С-конец	Fc	+
224	AE42	С-конец	Fc	+
166	AE42	С-конец	Fc	+
166	AE72	С-конец	Fc	+
166	AE144	С-конец	Fc	+

Примечание:

НО=активность не обнаружена;

(+)=обнаружено менее 30% активности;

(++)=от 30 до 70% активности; и

(+++)=более 70% активности, обнаруженной в процентах от базовой конструкции, с помощью хромогенного анализа (см. фиг. 8А-8С).

Таблица 9. Элементы XTEN, встроенные в каждый домен

Местоположение	Элемент
EGF2	AE42
AP	AE42, AE72, AE144
Каталитическая 60-петля	AE42
С-конец	AE72, AE144, AE288, Fc

Таблица 10. Общее количество конструкций, встроенных в виде одиночных, двойных, тройных и четверных комбинаций

Комбинация	Кол-во конструкций
Одиночная	9
Двойная	27
Тройная	31
Четверная	12
	Всего: 79

Три группы: FIX с одним встроенным XTEN, FIX с двумя встроенными XTEN и FIX-Fc с одним встроенным XTEN, продемонстрировали обнаруживаемую активность, тогда как комбинация "встраивание/слияние" в трех или более участках устраняла активность FIX (фиг. 4).

В заключение, в FIX присутствуют несколько пермиссивных участков для встраивания XTEN, при этом выбранные комбинации вариантов встраивания XTEN поддерживают активность FIX. Активные варианты FIX-XTEN, идентифицированные в данном примере, являются кандидатами на фармакокинетическую характеристику у мышей с гемофилией В.

Пример 2. Слитые белки FIX, восстановление их активности в плазме и AUC/D/

Мыши с дефицитом фактора IX (HemB, B6. 129P2-F9tm1Dws/J, MGI: 1932297) (Lin et al., 1997) первоначально были получены у доктора Даррела Стаффорда (Darrel Stafford) (Университет Северной Каролины, Чапел-Хилл). Самцам/самкам мышей HemB внутривенно вводили одну внутривенную болюсную инъекцию 50 или 200 МЕ/кг слитых белков FIX (например, FIX-CT. 288 (AE288 XTEN, слитый с С-концом полипептида FIX), FIX-CT. 864 (AE864 XTEN, слитый с С-концом полипептида FIX), FIX-AP. 144 (AE144 XTEN, встроенный после D166 в домен AP полипептида FIX), FIX-AP.72 (AE72 XTEN, встроенный после D166 в домен AP полипептида FIX), FIX-AP. 42 (AE42 XTEN, встроенный после D166 в домен AP полипептида FIX), FIXFc и FIX) в объеме дозы 10 мл/кг при t=0 ч. Кровь собирали через 5 мин после введения дозы и до 168 ч (7 дней) после введения дозы. Для каждого указанного момента

времени ~100 мкл цитратной крови собирали из ретроорбитальной вены или терминального отдела полой вены от 3-4 мышей в момент времени. Формировали до 3 моментов времени на мышь. Плазму выделяли с помощью центрифугирования при 5000 об/мин в течение 8 мин, после чего образцы плазмы мгновенно замораживали в бане с этанолом и сухим льдом и хранили при -80°C до их оценки с помощью одноэтапного анализа активированного тромбопластинового времени (аЧТВ) на приборе Sysmex-CA1500, с применением реагентов Dade Behring и актина FSL в качестве активатора, а также дозирочного материала в качестве стандартов активности. На фиг. 5A-5B уровни активности плазмы изображены в виде % от введенной дозы. Среднее время удержания (СВУ) и другие параметры фармакокинетики (ФК) рассчитывали с помощью некомпартментного моделирования с Phoenix WinNonlin 6.2.1 (Pharsight, Certera, с помощью анализа NCA). На фиг. 5C продемонстрированы относительные показатели восстановления активности плазмы (ось Y) по сравнению с СВУ (ось X). Площадь точек представляет собой площадь под кривой на дозу (AUC/D, в ч/кг/мл) и демонстрирует, что восстановление активности FIX в плазме и AUC/D увеличивалось с увеличением длины XTEN (фиг. 5C). Фигуры иллюстрируют, что слитые белки FIX с увеличенной длиной XTEN (288 и 864 на С-конце или 144, 72 и 42 в домене AP) демонстрировали зависящее от размера повышение восстановления активности плазмы до 60% и увеличение AUC/D после внутривенного введения болюсной дозы.

Пример 3. Слитые белки FIX и их период полувыведения.

Мышам с дефицитом FIX внутривенно вводили 50 или 200 МЕ/кг слитых белков FIX: FIX, слитый с XTEN, имеющим 288 аминокислот (например, AE288); FIX-Fc, в котором XTEN имеет 72 аминокислоты (например, AE72), встроенный в домен AP после D166; FIX-Fc, в котором XTEN имеет 42 аминокислоты (например, AE42), встроенный в домен AP после D166; и контроли (например, FIXFc и FIX). Плазму собирали, после чего оценивали активность FIX и проводили анализ ФК с помощью способов, аналогичных описанным в примере 5. На фиг. 6A уровни активности плазмы изображены в виде % от введенной дозы. Параметры фармакокинетики (ФК) рассчитывали с помощью WinNonlin 6.2.1 (Pharsight, Certera, с помощью анализа NCA); на фиг. 6B продемонстрированы относительные показатели восстановления активности плазмы (ось Y) по сравнению с СВУ (ось X). Площадь точек представляет собой площадь под кривой на дозу (AUC/D, в ч/кг/мл) и демонстрирует, что встраивание последовательностей XTEN в домен активационного пептида (AP) FIXFc увеличивало среднее время удержания в течение более длительного периода, чем для rFIXFc отдельно по сравнению с FIX (фиг. 6B). Кроме того, показатели восстановления активности плазмы и AUC/D улучшались с увеличением длины XTEN (фиг. 6A-6B). AUC/D для rFIX-CT. 288 (SEQ ID NO: 226) и rFIXFc-AP.72 (SEQ ID NO: 151) были в 3,4 и 4,5 раза выше по сравнению с rFIXFc, соответственно (фиг. 6A-6B). Это эквивалентно 8,5 и 14,5-кратному улучшению AUC/D по сравнению с внутривенно вводимым rFIX, соответственно (фиг. 6A-6B). Поэтому комбинации встраиваний XTEN в домен AP с Fc-опосредованным увеличением периода полувыведения в rFIXFc-R338L продлевали как период полувыведения, так и повышали показатели восстановления плазмы и AUC/доза по сравнению с rFIX и rFIXFc.

Пример 4. Улучшение показателей фармакокинетики слитых белков FIX после подкожного введения.

Мышам с дефицитом FIX подкожно вводили 50 или 200 МЕ/кг слитых белков FIX при t=0: FIX, слитый с XTEN из 288 аминокислот (например, AE288), на С-конце (FIX-CT. 288); FIXFc, имеющий XTEN из 72 аминокислот (например, AE72) в домене AP (FIXFc-AP.72); FIXFc, имеющий XTEN из 42 аминокислот (например, AE42) в домене EGF2 (например, FIXFc-EGF. 42); и контроли (FIXFc и FIX). Плазму собирали, после чего оценивали активность FIX и проводили анализ ФК с помощью способов, аналогичных описанным в примере 1. На фиг. 7A уровни активности плазмы изображены в виде % от введенной дозы. Параметры фармакокинетики (ФК) рассчитывали с помощью WinNonlin 6.2.1 (Pharsight, Certera, с помощью анализа NCA); на фиг. 7B продемонстрированы относительные показатели биодоступности (ось Y) по сравнению с СВУ (ось X). Площадь точек представляет собой площадь под кривой на дозу (AUC/D, в ч/кг/мл) и демонстрирует, что слияние последовательностей полипептидов XTEN на карбокси-конце rFIX или встраивание последовательностей XTEN в домен активирующего пептида (AP) или домен EGF2 FIXFc значительно улучшали профиль ФК слитых белков FIX после подкожного введения (фиг. 7B). rFIXFc-AP.72 и rFIX-CT. 288 характеризовались улучшенным в 6-9 раз показателем AUC/D, улучшенной в 1,5-2 раза биодоступностью и улучшенным в 3-10 раз показателем C_{max}/D по сравнению с rFIXFc у мышей HemB после подкожного введения. По сравнению с rFIX, улучшение фармакокинетических параметров представляло собой: улучшение в 28-40 раз показателя AUC/D, повышение биодоступности в 3 раза и улучшение в 15-30 раз показателя C_{max}/D по сравнению с rFIX для FIXFc-AP.72 и rFIX-CT. 288, соответственно (фиг. 7A-7B).

В совокупности слитые белки FIX (например, rFIX-CT. 288 и rFIXFc-AP.72) продемонстрировали 2,6-и 1,9-кратное улучшение показателя AUC/D при подкожном введении по сравнению с внутривенным введением rFIXFc, причем последний вводили внутривенно один раз в неделю или реже людям с профилактической целью.

Пример 5. Эффективность слитых белков FIX in vitro.

В кровь человека с гемофилией В добавляли указанные дозы 3, 10 и 30 МЕ/дл rFIXFc (незаштрихо-

ванные круги, пунктирная линия) или слитого белка FIX (например, rFIXFc-AP.72) (сплошные точки, сплошная линия) или несущую среду (незаштрихованный треугольник) (фиг. 8А-8С). Характеристики свертывания цельной крови определяли с помощью вращательной тромбоэластометрии (ROTEM), при этом коагуляцию инициировали рекальцификацией крови (NATEM). rFIXFc-AP.72 продемонстрировал сходную активность по сравнению с rFIXFc в крови человека с гемофилией В в отношении времени свертывания (СТ в секундах), альфа-угла (в градусах) и максимальной плотности тромба (MCF в мм) (фиг. 8А-8С). Показатели в каждый момент времени представляют собой среднее стандартное отклонение результатов анализа 4-5 повторных образцов (фиг. 8А-8С).

rFIXFc-AP.72 и rFIX-CT.288 продемонстрировали значительно улучшенную фармакокинетику после подкожного введения у мышей HemB по сравнению с rFIX и rFIXFc. Для оценки эффективности и аллометрического масштабирования в доклинических моделях животных продолжаются дальнейшие исследования.

Пример 6. Эффективность rFIXFc-AP.72 *in vivo* в модели острого кровотечения при рассечении хвостовой вены у мышей.

Раннюю эффективность изучали в заслепленной модели острого кровотечения при рассечении хвостовой вены у мышей, при этом общую потерю крови у мышей, получивших дозу препарата, измеряли после ампутации кончика хвоста, как описано ранее (Dumont et al., Blood, 119(13): 3024-3030, 2012). Вкратце, самцов мышей в возрасте 8-15 недель с гемофилией В (Lin et al., Blood (1997) 90: 3962-3966) анестезировали смесью 50 мг/кг кетамина и 0,5 мг/кг дексметомидина. Хвосты погружали в солевой раствор, нагретый до 37°C, на 10 мин, чтобы расширить латеральную вену, а затем внутривенно в хвостовую вену вводили либо несущую среду (3,88 г/л L-гистидина, 23,8 г/л маннита, 11,9 г/л сахарозы, 3,25 г/л хлорида натрия, 0,01% (масса/объем) полисорбата 20 (pH 7,1), 3% сывороточного альбумина человека), rFIXFc-AP.72, либо rFIXFc в концентрации 50, 100 и 200 МЕ/кг. Через пять минут после введения дозы обрезали хвост на расстоянии 5 мм от конца и погружали в предварительно взвешенную пробирку, содержащую 13 мл солевого раствора на 30 мин. Потери крови количественно определяли по весу. Статистическую значимость рассчитывали с применением непарного двухстороннего t-критерия в программе GraphPad Prism 6. С помощью указанных двухсторонних t-критериев продемонстрировано, что дозы 50, 100 и 200 МЕ/кг rFIXFc-AP.72 достоверно отличались от несущей среды (р-значение < 0,0001). Кроме того, данные показывают, что низкая доза, например 50 МЕ/кг, rFIXFc-AP.72 обуславливала достоверно менее интенсивную потерю крови по сравнению с той же низкой дозой, т.е. 50 МЕ/кг rFIXFc. Эти результаты демонстрируют аналогичную или лучшую раннюю эффективность rFIXFc-AP.72 по сравнению с rFIXFc в этой модели кровотечения.

Пример 7. Эффективность FIXFc-AP.72 *in vivo* в профилактической модели кровотечения при рассечении хвостовой вены у мышей.

Пролонгированную эффективность изучали в заслепленной модели кровотечения при рассечении хвостовой вены (TVT) у мышей, при этом выживаемость мышей с гемофилией В, получивших дозу препарата, анализировали после рассечения одной латеральной хвостовой вены, как описано ранее (Toby et al., PLOS One, DOI: 10. 1371/journal. pone. 0148255, 2016; Pan et al., Blood 114: 2802-2822 (2009)). Вкратце, самцам мышей в возрасте 8-15 недель с гемофилией В (Lin et al., Blood 90: 3962-3966 (1997)) предварительно внутривенно вводили rFIXFc с активностью FIX 15, 50, 100 МЕ/кг, или соответствующие подкожные дозы FIXFc-AP.72 и сравнивали с мышами, получавшими болюсную дозу несущей среды. Через 72 ч после введения дозы всех мышей анестезировали, и в месте хвоста, где его диаметр составляет 2,7 мм, рассекали одну латеральную хвостовую вену. В течение 9-11 ч, непосредственно после TVT, а затем в течение ночи на протяжении 24 ч, ежедневно контролировали и регистрировали качественные критерии оценки, включая повторное кровотечение и время до наступления смерти (определяли как время до эвтаназии, когда животное начинало агонизировать). Все мышей подвергали эвтаназии в конце 24-часового исследования, в то время как животные, которые не умерли или не начали агонизировать, расценивались как выжившие на 24-м часу.

Данные наносили на график как процент выживаемости после TVT с помощью GraphPad Prism 6. Мышам подкожно вводили несущую среду (пунктирная линия), подкожно вводили FIXFc-AP.72 (сплошные линии, заштрихованные обозначения) или внутривенно вводили FIXFc (пунктирные линии, незаштрихованные обозначения) (15, 50, 100 нг/кг/доза, за исключением дозы несущей среды, нг/кг=30) (фиг. 10). Кривые выживаемости для мышей, получавших соответствующие дозы МЕ/кг подкожно вводимого FIXFc-AP.72 по сравнению с внутривенно вводимым rFIXFc продемонстрировали лучшие показатели выживаемости мышей HemB, подкожно получавших FIXFc-AP.72, по сравнению с эквивалентным внутривенно вводимым rFIXFc во всех анализируемых дозах (фиг. 10).

Пример 8. Улучшенные фармакокинетические параметры FIXFc-AP.72 (FIX-216, двухцепочечный Fc) после внутривенного и подкожного введения по сравнению с rFIX у мышей HemB.

Мышам с гемофилией В вводили либо 200 МЕ/кг FIXFc-AP.72 (FIX-216, двухцепочечный Fc), либо rFIX. Кровь собирали из ретроорбитальной вены в указанное время. Уровни FIX в плазме определяли с помощью одноэтапного анализа свертывания, применяя дозирочный материал в качестве стандартов активности. На фиг. 11А активность плазмы изображены в виде % от введенной дозы. Фиг. 11В демонст-

рирует таблицу фармакокинетических параметров, определенных с помощью некомпартментного анализа (NCA) с применением программного обеспечения Phoenix WinNonLin 6.2.1 (Pharsight, Certara). Улучшенные фармакокинетические параметры, полученные для FIX-216 по сравнению с rFIX, включают среднее время удержания (CBU), AUC/доза и другие параметры.

Подкожное введение FIXFc-AP.72 обуславливало $t_{\max}$ приблизительно через 20 ч после введения дозы у мышей и повышало уровни активности в плазме по сравнению с аналогичной дозой (МЕ/кг) внутривенно вводимых rFIX или rFIXFc. С помощью модели кровотока TVT у мышей HemB, продемонстрировано, что через 72 ч после подкожного введения дозы FIXFc-AP.72 повышалась эффективность *in vivo* по сравнению с внутривенно вводимым rFIXFc во всех анализируемых дозах. Аналогичным образом, анализ ранней эффективности в модели кровотока при рассечении хвостовой вены мыши HemB продемонстрировал более высокую эффективность внутривенно вводимого FIXFc-AP.72 по сравнению с rFIXFc. Эти данные подтверждают возможность подкожного введения FIXFc-AP.72 один раз в неделю или реже с профилактической целью у людей.

Вышеприведенное описание конкретных вариантов осуществления данного изобретения полностью раскрывает общий характер изобретения, таким образом, что другие могут, применяя знания в объеме уровня техники, легко модифицировать и/или адаптировать для различных применений указанные конкретные варианты осуществления без излишнего экспериментирования и отхода от общей концепции данного изобретения. Следовательно, такие адаптации и модификации предназначены для того, чтобы быть в пределах значения и диапазона эквивалентов описанных вариантов осуществления на основе представленных в данном документе рекомендаций и указаний. Следует понимать, что фразеология или терминология в данном документе предназначена для описания, а не ограничения, таким образом, что терминология или фразеология данного описания должна интерпретироваться квалифицированным специалистом в свете идеи изобретения и рекомендаций.

Другие варианты осуществления данного изобретения будут очевидны для специалистов в данной области техники из рассмотрения характеристик и практического применения изобретения, описанного в данном документе. Предполагается, что характеристики и примеры следует рассматривать только как иллюстративные, причем истинный объем и сущность данного изобретения указаны в нижеприведенной формуле изобретения.

Настоящая заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/200590, поданной 3 августа 2015 года и 62/281 993, поданной 22 января 2016 года, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Варианты осуществления данного изобретения

B1. Слитый белок фактора IX (FIX), содержащий полипептид FIX и по меньшей мере один XTEN, который встроен в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аминокислоты 103 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 105 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 142 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 149 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 162 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 166 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 174 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 224 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 226 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 228 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 413 SEQ ID NO: 2, и любой их комбинации, и при этом слитый белок FIX проявляет прокоагулянтную активность.

B2. Слитый белок FIX по B1, отличающийся тем, что участок встраивания соответствует аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аминокислоты 149 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 162 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 166 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 174 SEQ ID NO: 2 и любой их комбинации.

B3. Слитый белок FIX по B1 или B2, отличающийся тем, что участок встраивания соответствует аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аминокислоты 224 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 226 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 228 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 413 SEQ ID NO: 2, и любой их комбинации.

B4. Слитый белок FIX по любому из B1-B3, отличающийся тем, что участок встраивания соответствует аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аминокислоты 103 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 105 SEQ ID NO: 2, и обеих.

B5. Слитый белок FIX по любому из B1-B4, отличающийся тем, что участок встраивания соответствует аминокислоте 142 SEQ ID NO: 2.

B6. Слитый белок FIX по любому из B1-B5, отличающийся тем, что XTEN содержит по меньшей мере около 6 аминокислот, по меньшей мере около 12 аминокислот, по меньшей мере около 36 аминокислот, по меньшей мере около 42 аминокислот, по меньшей мере около 72 аминокислот, по меньшей мере около 144 аминокислот или по меньшей мере около 288 аминокислот.

B7. Слитый белок FIX по любому из B1-B6, отличающийся тем, что XTEN содержит AE42, AE72, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288, AG144 или любую их комбинацию.

B8. Слитый белок FIX по любому из B1-B7, отличающийся тем, что XTEN содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на около 80, по меньшей мере на около 85, по меньшей мере на около 90, по меньшей мере на около 95, по меньшей мере на около 96, по меньшей мере на около 97, по меньшей мере на около 98, по меньшей мере на около 99 или на около 100% с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 и любой их комбинации.

B9. Слитый белок FIX по B7 или B8, отличающийся тем, что XTEN содержит AE72 или AE144.

B10. Слитый белок FIX по любому из B1-B9, отличающийся тем, что дополнительно содержит второй XTEN.

B11. Слитый белок FIX по B10, отличающийся тем, что XTEN встраивают в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аминокислоты 103 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 105 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 142 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 149 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 162 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 166 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 174 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 224 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 226 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 228 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 413 SEQ ID NO: 2 и любую их комбинацию, или отличающийся тем, что второй XTEN сливают с С-концом полипептида FIX или с линкером, слитым с С-концом полипептида FIX.

B12. Слитый белок FIX по B10 или B11, отличающийся тем, что XTEN и второй XTEN встраивают в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте, и/или сливают с С-концом полипептида FIX, выбранного из группы, состоящей из:

- i. аминокислоты 105 SEQ ID NO: 2 и аминокислоты 166 SEQ ID NO: 2;
- ii. аминокислоты 105 SEQ ID NO: 2 и аминокислоты 224 SEQ ID NO: 2;
- iii. аминокислоты 105 SEQ ID NO: 2 и сливают с С-концом;
- iv. аминокислоты 166 SEQ ID NO: 2 и аминокислоты 224 SEQ ID NO: 2;
- v. аминокислоты 166 SEQ ID NO: 2 и сливают с С-концом; а также
- vi. аминокислоты 224 SEQ ID NO: 2 и сливают с С-концом, соответственно.

B13. Слитый белок FIX по B10 или B11, отличающийся тем, что XTEN встраивают в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте 166 SEQ ID NO: 2, и отличающийся тем, что второй XTEN сливают с С-концом полипептида FIX.

B14. Слитый белок FIX по любому из B10-B13, отличающийся тем, что второй XTEN содержит по меньшей мере около 6 аминокислот, по меньшей мере около 12 аминокислот, по меньшей мере около 36 аминокислот, по меньшей мере около 42 аминокислот, по меньшей мере около 72 аминокислот, по меньшей мере около 144 аминокислот или по меньшей мере около 288 аминокислот.

B15. Слитый белок FIX по любому из B10-B14, отличающийся тем, что второй XTEN выбирают из группы, состоящей из AE42, AE72, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288, AG144 и любой их комбинации.

B16. Слитый белок FIX по B15, отличающийся тем, что второй XTEN представляет собой AE72 или AE144.

B17. Слитый белок FIX по любому из B10-B16, отличающийся тем, что второй XTEN содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на около 80, по меньшей мере на около 85, по меньшей мере на около 90, по меньшей мере на около 95, по меньшей мере на около 96, по меньшей мере на около 97, по меньшей мере на около 98, по меньшей мере на около 99 или на около 100% с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53 и любой их комбинации.

B18. Слитый белок FIX по любому из B10-B17, отличающийся тем, что дополнительно содержит третий, четвертый, пятый или шестой XTEN.

B19. Слитый белок FIX, содержащий полипептид FIX и гетерологичный фрагмент, содержащий XTEN, при этом XTEN является слитым с С-концом полипептида FIX и содержит аминокислотную последовательность длиннее чем 42 аминокислоты и короче чем 144 аминокислоты в длину.

B20. Слитый белок FIX по B19, отличающийся тем, что XTEN содержит аминокислотную последовательность длиной более чем 50, 55, 60, 65 или 70 аминокислот и короче чем 140, 130, 120, 110, 100, 90 или 80 аминокислот или любую их комбинацию.

B21. Слитый белок FIX по B20, отличающийся тем, что длина XTEN составляет 72 аминокислоты.

B22. Слитый белок FIX по B21, отличающийся тем, что XTEN представляет собой AE72.

B23. Слитый белок FIX по B19, отличающийся тем, что XTEN содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на около 80, по меньшей мере на около 85, по меньшей мере на около 90, по меньшей мере на около 95, по меньшей мере на около 96, по меньшей мере на около 97, по меньшей мере на около 98, по меньшей мере на около 99 или на 100% последовательности SEQ ID NO: 35.

B24. Слитый белок FIX по любому из B1-B23, отличающийся тем, что дополнительно содержит домен Fc.

B25. Слитый белок FIX по B24, отличающийся тем, что домен Fc сливают с полипептидом FIX или с XTEN.

B26. Слитый белок FIX по B24 или B25, отличающийся тем, что содержит второй домен Fc.

B27. Слитый белок FIX по B26, отличающийся тем, что второй домен Fc связан с первым доменом Fc.

B28. Слитый белок FIX по B26 или B27, который содержит две полипептидные цепи, при этом первая полипептидная цепь содержит полипептид FIX, слитый с доменом Fc, а вторая полипептидная цепь содержит второй домен Fc, при этом первый домен Fc и второй домен Fc связаны ковалентной связью.

B29. Слитый белок FIX по B26 или B27, который представляет собой одну полипептидную цепь, содержащую полипептид FIX, домен Fc, второй домен Fc и линкер, который связывает домен Fc и второй домен Fc.

B30. Слитый белок FIX по B29, отличающийся тем, что линкер дополнительно содержит один или большее количество участков внутриклеточного процессинга.

B31. Слитый белок FIX по B29 или B30, отличающийся тем, что линкер содержит $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$, где n равно целому числу, выбранному от 1 до 100.

B32. Слитый белок FIX по любому из B1-B31, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на около 80, по меньшей мере на около 85, по меньшей мере на около 90, по меньшей мере на около 95, по меньшей мере на около 96, по меньшей мере на около 97, по меньшей мере на около 98, по меньшей мере на около 99 или на около 100% с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 54 до SEQ ID NO: 153 без сигнального пептида и пропептидной последовательности.

B33. Слитый белок FIX по любому из B1-B32, который имеет по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 30, по меньшей мере около 40, по меньшей мере около 50, по меньшей мере около 60, по меньшей мере около 70, по меньшей мере около 80, по меньшей мере около 90 или 100% прокоагулянтной активности нативного FIX.

B34. Слитый белок FIX по B33, отличающийся тем, что прокоагулянтную активность измеряют с применением анализа хромогенного субстрата, одноэтапного анализа свертывания крови или и того, и другого.

B35. Слитый белок FIX по любому из B1-B34, отличающийся тем, что полипептид FIX представляет собой вариант R338L FIX.

B36. Слитый белок FIX по B35, отличающийся тем, что вариант R338L FIX содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на около 80, по меньшей мере на около 85, по меньшей мере на около 90, по меньшей мере на около 95, по меньшей мере на около 96, по меньшей мере на около 97, по меньшей мере на около 98, по меньшей мере на около 99 или на 100% последовательности SEQ ID NO: 2.

B37. Выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую слитый белок FIX по любому из B1-B36.

B38. Экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид по B37.

B39. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по B37 или вектор по B38.

B40. Клетка-хозяин по B39, отличающаяся тем, что слитый белок FIX экспрессируется *in vivo*.

B41. Клетка-хозяин по B39, отличающаяся тем, что слитый белок FIX экспрессируется *in vitro*.

B42. Способ получения слитого белка FIX, включающий культивирование клетки-хозяина по B39 в условиях, в которых экспрессируется белок FIX.

B43. Композиция, содержащая слитый белок FIX по любому из B1-B36, полинуклеотид по B37, экспрессионный вектор по B38, или клетку-хозяин по любому из B39-B41 и фармацевтически приемлемый носитель.

B44. Способ профилактики, лечения, облегчения или контроля заболевания или патологического состояния, связанного с кровотечением, у пациента, имеющего для этого показание, при этом указанный способ включает введение эффективного количества слитого белка FIX по любому из B1-B36, полинуклеотида по B37, экспрессионного вектора по B38, клетку-хозяин по любому из B39-B41 или композиции по B43.

B45. Способ по B44, отличающийся тем, что введение включает подкожное введение пациенту.

B46. Способ диагностики или обнаружения заболевания или патологического состояния, связанного с нарушением свертывания крови, у субъекта, включающий приведение в контакт слитого белка FIX по любому из B1-B36, полинуклеотида по B37, экспрессионного вектора по B38 или клетки-хозяина по любому из B39-B41 с образцом субъекта.

B47. Способ продления периода полувыведения полипептида FIX, включающий встраивание XTEN в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте, выбранной из группы, состоящей из аминокислоты 103 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 105 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 142 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 149 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 162 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 166 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 174 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 224 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 226 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 228 SEQ ID NO: 2, аминокислоты 413 SEQ ID NO: 2 и любой их комбинации, тем самым конструируя слитый белок FIX, при этом белок FIX проявляет прокоагулянтную активность.

B48. Слитый белок фактора IX (FIX), содержащий первую цепь и вторую цепь, при этом:

a. первая цепь содержит: i. полипептид FIX;

ii. по меньшей мере один XTEN, при этом по меньшей мере один XTEN встраивают в полипептид FIX в участке встраивания, соответствующем аминокислоте 166 SEQ ID NO: 2, и

при этом по меньшей мере один XTEN содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 72 аминокислот; а также

iii. первый домен Fc, при этом первый домен Fc слит с полипептидом FIX по меньшей мере одного XTEN; а также

b. вторая цепь содержит второй домен Fc, при этом первый домен Fc и второй домен Fc связаны ковалентной связью; и при этом слитый белок FIX проявляет прокоагулянтную активность.

B49. Слитый белок FIX по B48, отличающийся тем, что по меньшей мере один XTEN содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на около 80, по меньшей мере на около 85, по меньшей мере на около 90, по меньшей мере на около 95, по меньшей мере на около 96, по меньшей мере на около 97, по меньшей мере на около 98%, по меньшей мере на около 99 или на около 100% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 35.

B50. Слитый белок FIX по B48 или B49, отличающийся тем, что первая цепь слитого белка FIX содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на около 80, по меньшей мере на около 85, по меньшей мере на около 90, по меньшей мере на около 95, по меньшей мере на около 96, по меньшей мере на около 97, по меньшей мере на около 98, или по меньшей мере на около 99% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 227; и отличающийся тем, что вторая цепь слитого белка FIX содержит аминокислотную последовательность, идентичную по меньшей мере на около 80, по меньшей мере на около 85, по меньшей мере на около 90, по меньшей мере на около 95, по меньшей мере на около 96, по меньшей мере на около 97, по меньшей мере на около 98, или по меньшей мере на около 99% с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 228.

B51. Слитый белок FIX по любому из B48-B50, отличающийся тем, что первая цепь слитого белка FIX содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227; и отличающийся тем, что вторая цепь слитого белка FIX содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228.

Следующие векторные последовательности упоминаются в приведенных примерах и в других разделах данной заявки. Следующий ключ поможет понять информацию.

Ключ:

сигнальный пептид (препептид),

про-пептид,

линкер с тегом белка или без него,

встраивание или слияние XTEN и/или Fc.

SEQ ID NO: 54 E0113_AE42; PNL118

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTE**GAPGSPAGSPTSTEECTSESATPESGPGSEPAT**
SGSETPASSGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLKTRAETVFPDQVDYVNSTEAETILDNI
TQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTV
AGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLSYVTPICIAKEYT
NIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDS
CQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVYNWIEKTKLTGPEGPSKLT
RAETGAGSPGAETAEQKLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 55 N0089_AE42 PNL116

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
ELDVTCN**GAPGSPAGSPTSTEECTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS**IKNGRCEQFCKNSAD
NKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLKTRAETVFPDQVDYVNSTEAETILDNI
TQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTV
AGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLSYVTPICIAKEYT
NIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDS
CQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVYNWIEKTKLTGPEGPSKLT
RAETGAGSPGAETAEQKLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 56 A0103_AE42 pNL117
 MQRVNMIMAE SPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTER TTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSA **GAPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSE PATSGSETPASS**D
 NKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRAETVFPD VDVVNSTEAETILDNI
 TQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVV
 AGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPIC IADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGD SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVSRYVNWIKEKTKLTGPEGPSKLT
 RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 57 P0129_AE42 pNL119
 MQRVNMIMAE SPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTER TTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVP **GAPGSPAGSPTSTEEGT**
SESATPESGPGSE PATSGSETPASSFPCGRVSVSQT SKLTRAETVFPD VDVVNSTEAETILDNI
 TQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVV
 AGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPIC IADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGD SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVSRYVNWIKEKTKLTGPEGPSKLT
 RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 58 K0142_AE42 pNL120
 MQRVNMIMAE SPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTER TTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SK**GAPG**
SPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSE PATSGSETPASSLTRAETVFPD VDVVNSTEAETILDNI
 TQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVV
 AGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPIC IADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGD SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVSRYVNWIKEKTKLTGPEGPSKLT
 RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 59 V0149_AE42 pNL121
 MQRVNMIMAE SPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTER TTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYECWCPFGFEGKNC

ELDVTCNIKNGRCEQFCCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ET**VGAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS**FPDVDYVNSTEAEITLDNI
 TQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVV
 AGEHNIEETEHTEQKRNVIIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRVFBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVYNWIKETKLTGPEGPSKLT
RAETGAGSPGAETAEOKLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 60 E0162_AE42 pNL122
 MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ET**VFPD**VDYVNSTEAE**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS**TILDNI
 TQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVV
 AGEHNIEETEHTEQKRNVIIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRVFBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVYNWIKETKLTGPEGPSKLT
RAETGAGSPGAETAEOKLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 61 D0166_AE42 pNL123
 MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ET**VFPD**VDYVNSTEAEITLD**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS**NI
 TQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVV
 AGEHNIEETEHTEQKRNVIIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRVFBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVYNWIKETKLTGPEGPSKLT
RAETGAGSPGAETAEOKLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 62 S0174_AE42 pNL124
 MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ET**VFPD**VDYVNSTEAEITLDNITQSTQ**S****GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS**
ETPASSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVV
 AGEHNIEETEHTEQKRNVIIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYT

NIFLKFGSGYVSGWGRV~~FHKGRS~~ALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRVNWIKEKTKLTGPEGPSKLT
 RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 63 K0188_AE42 pNL125
 MQRVNMIMAE~~SPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC~~
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFC~~KNSADNKVVC~~SCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPD~~VDYVN~~STEAE~~TILDNITQSTQSFNDFTRVVG~~EDAK**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESAT**
PESGPGSEPATSGSETPASSPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVV
 AGEHNIEETEHTEQKRN~~VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPIC~~ADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRV~~FHKGRS~~ALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRVNWIKEKTKLTGPEGPSKLT
 RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 64 V0202_AE42 pNL126
 MQRVNMIMAE~~SPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC~~
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFC~~KNSADNKVVC~~SCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPD~~VDYVN~~STEAE~~TILDNITQSTQSFNDFTRVVG~~EDAKPGQFPWQVVLNGKV**GAPGSPAG**
SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASSDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVV
 AGEHNIEETEHTEQKRN~~VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPIC~~ADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRV~~FHKGRS~~ALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRVNWIKEKTKLTGPEGPSKLT
 RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 65 E0224_AE42 pNL127
 MQRVNMIMAE~~SPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC~~
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFC~~KNSADNKVVC~~SCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPD~~VDYVN~~STEAE~~TILDNITQSTQSFNDFTRVVG~~EDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCV**E**
GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASSTGVKITVV
 AGEHNIEETEHTEQKRN~~VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPIC~~ADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRV~~FHKGRS~~ALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRVNWIKEKTKLTGPEGPSKLT
 RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 66 E0240_AE42 pNL128

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLKTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITV VAGEHNIEE**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS**TEHTEQKRVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVNWIKEKTKLTGPEGPSKLT
 RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 67 H0257_AE42 pNL129

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLKTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITV VAGEHNIEETEHTEQKRVIRIIPHH**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS**NYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVNWIKEKTKLTGPEGPSKLT
 RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 68 K0265_AE42 pNL130

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLKTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITV VAGEHNIEETEHTEQKRVIRIIPHHNYNAAINK**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS**YNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVNWIKEKTKLTGPEGPSKLT
 RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 69 E0277_AE42 pNL131

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLKTRA

ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDE**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS**PLVLNSYVTPIC IADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRVFHKG RSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVSRVYNWIKETKLTGPEGPSKLT
 RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 70 D0292_AE42 pNL132
 MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTER TTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSC KDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFC KNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPIC IAD**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS**KEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRVFHKG RSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVSRVYNWIKETKLTGPEGPSKLT
 RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 71 K0316_AE42 pNL133
 MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTER TTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSC KDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFC KNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPIC IADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFHKG**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESAT**
PESGPGSEPATSGSETPASSGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVSRVYNWIKETKLTGPEGPSKLT
 RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 72 K0341_AE42 pNL134
 MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTER TTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSC KDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFC KNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPIC IADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFHKG RSALVLQYLRVPLVDRATCLL
 STK**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS**FTIYNNMFCAGFHEGGRDS

CQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVNWIKEKTKLTGPEGPSKLT
 RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 73 H0354_AE42 pNL135

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLL
 STKFTIYNNMFCAGFH **GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASSE**GGRDS
 CQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVNWIKEKTKLTGPEGPSKLT
 RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 74 K0392_AE42 pNL136

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLL
 STKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMK**GAPGSPAGSP**
TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASSGKGIYTKVSRVNWIKEKTKLTGPEGPSKLT
 RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 75 R0403_AE42 pNL137

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLL
 STKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVS
RGAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASSYVNWIKEKTKLTGPEGPSKLT
 RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 76 K0413_AE42 pNL138

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHC VETGVKITV VAGEHNIEETEHETEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPIC IADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLL
 STKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVS
 RYVNWIKEKTK**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS**LTGPEGPSKLT
 RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 77 CT_AE42 pNL140

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHC VETGVKITV VAGEHNIEETEHETEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPIC IADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLL
 STKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVS
 RYVNWIKEKTKLTGAGSPGAETAL**VPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEES**GAGSPGAETAGAPGSPA
GSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASSGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 78 E0052_AE42 pNL141

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCE**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE**
PATSGSETPASSSNPCLNGGSKDDINSYECWCPFGFEGKNC ELDVTCNIKNGRCEQFCCKNSAD
 NKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNI
 TQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I VNEKWIVTAAHC VETGVKITV
 AGEHNIEETEHETEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE LDEPLVLNSYVTPIC IADKEYT
 NI FLKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVSRYVNWIKEKTKLTGPEGPSKLT
 RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 79 G0059_AE42 pNL142

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNG**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP**
ESGPGSEPATSGSETPASSGSCKDDINSYECWCPFGFEGKNC ELDVTCNIKNGRCEQFCCKNSAD
 NKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNI

TQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIIVTAAHCVETGVKITVV
 AGEHNIETEHETEQKRNIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRVFBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRYVNWIKETKLTGPEGPSKLT
RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 80 I0066_AE42 pNL143
 MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDI**GAPGSPAGSPTSTEEG**
TSESATPESGPGSEPATSGSETPASSNSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSAD
 NKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRAETVFPDQVDYVNSTEAETILDNI
 TQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIIVTAAHCVETGVKITVV
 AGEHNIETEHETEQKRNIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRVFBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRYVNWIKETKLTGPEGPSKLT
RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 81 K0080_AE42 pNL144
 MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGK**GA**
PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASSNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSAD
 NKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRAETVFPDQVDYVNSTEAETILDNI
 TQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIIVTAAHCVETGVKITVV
 AGEHNIETEHETEQKRNIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRVFBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRYVNWIKETKLTGPEGPSKLT
RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 82 D0085_AE42 pNL145
 MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELD**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS**VTCNIKNGRCEQFCKNSAD
 NKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRAETVFPDQVDYVNSTEAETILDNI
 TQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIIVTAAHCVETGVKITVV
 AGEHNIETEHETEQKRNIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRVFBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS

CQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITYTKVSRYVNWIKEKTKLTGPEGPSKLT
 RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 83 CT_AE144 pNL164

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPCFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSKLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAEETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITTVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLL
 STKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITYTKVS
 RYVNWIKEKTKLTGAGSPGAETALVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEESGAGSPGAETAGAPTSTE
PSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS
ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG
TSTEPSEGSAPGASSGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 84 CT_AE288 pNL165

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPCFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSKLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAEETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITTVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLL
 STKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITYTKVS
 RYVNWIKEKTKLTGAGSPGAETALVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEESGAGSPGAETAGAPGTSE
SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE
GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE
GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEP
ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSG
SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASSGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 85 CT_AE864 pNL166

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPCFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSKLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAEETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITTVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE

LDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLL
 STKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIIYTKVS
 RYVNWIKETKLTGAGSPGAETALVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEESGAGSPGAETAGAPGSPA
 GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE
 GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP
 GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE
 SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE
 GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP
 GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST
 EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG
 SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP
 GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE
 SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE
 GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE
 GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEP
 ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSG
 SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASSGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 86 K0142_AE72 pNL167

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSKGAPS
 PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP
 SEGSAPGASSLTRAETVFPDQVDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQV
 VLNGKVDAFCGGSIVNEKWIIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIIRIIPHHNYN
 AAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQ
 YLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEE
 CAMKGKYGIIYTKVSRYVNWIKETKLTGPEGPSKLTRAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPAT
 GHHHHHHHH

SEQ ID NO: 87 K0142_AE144 pNL168

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSKGAPS
 PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP
 SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST

EEGTSTEPSEGSAPGASSLTRAETVFPDVDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAK
 PGQFPWQVVLNGKVD AFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTVAGEHNIETEHTEQKRN VIR
 IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPIC IADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHK
 GRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTSFLT
 GIISWGEECAMKGKYG IYTKVSRVYNWIKETKLTGPEGPSKLTRAETGAGSPGAETAEOQLIS
EEDLSPATGHHHHHHH

SEQ ID NO: 88 K0142_AE288 pNL169
 MQRVNMIMAE SPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTER TTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFC KNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFP CGRVSVSQTSGAPG
TSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE
PSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS
TEEGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG
SE PATSGSETPGSE PATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPA
TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASSLTRAETVFPDVDYVNSTEAEITLDNITQST
 QSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVD AFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTVAGEH
 NIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPIC IADKEYTNI FL
 KFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGD
 SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVSRVYNWIKETKLTGPEGPSKLTRAET
GAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHH

SEQ ID NO: 89 V0149_AE72 pNL170
 MQRVNMIMAE SPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTER TTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFC KNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFP CGRVSVSQT SKLTRA
 ETV**GAPSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS**
PGTSTEPSEGSAPGASSFPDVDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQV
 VLNGKVD AFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTVAGEHNIETEHTEQKRN VIRIIPHHNYN
 AAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPIC IADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQ
 YLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEE
 CAMKGKYG IYTKVSRVYNWIKETKLTGPEGPSKLTRAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPAT
GHHHHHHH

SEQ ID NO: 90 V0149_AE144 pNL171
 MQRVNMIMAE SPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTER TTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC

ELDVTCNIKNGRCEQFCCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSKLTRA
 ETV**GAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS**
PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSP
AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASSFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAK
 PGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTVAGEHNIEETEHTEQKRN VIR
 IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHK
 GRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLT
 GIISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRVYNWIKETKLTGPEGPSKLTRAETGAGSPGAETAEOQLIS
EEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 91 V0149_AE288 pNL172
 MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSKLTRA
 ETV**GAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES**
GPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS
PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESA
TPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS
APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASSFPDVDYVNSTEAETILDNITQST
 QSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTVAGEH
 NIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FL
 KFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGD
 SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRVYNWIKETKLTGPEGPSKLTRAET
GAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 92 E0162_AE72 pNL173
 MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSKLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEA**E****GAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES**
GPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGASSTILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQV
 VLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYN
 AAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQ
 YLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEE
 CAMKGKYGIIYTKVSRVYNWIKETKLTGPEGPSKLTRAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPAT
 GHHHHHHHH

SEQ ID NO: 93 E0162_AE144 pNL174

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAE**GAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES**
GPSTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT
STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASSTILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAK
 PGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTVAGEHNIEETEHTEQKRNIR
 IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRVFKH
 GRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTSFLT
 GIISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRVYNWIKETKLTGPEGPSKLTRAETGAGSPGAETAEOQLIS
EEDLSPATGHHHHHHH

SEQ ID NO: 94 E0162_AE288 pNL175

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAE**GAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS**
ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG
TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES
ATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG
SAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASTILDNITQST
 QSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTVAGEH
 NIEETEHTEQKRNIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FL
 KFGSGYVSGWGRVFKHGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGD
 SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRVYNWIKETKLTGPEGPSKLTRAET
GAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHH

SEQ ID NO: 95 D0166_AE72 pNL176

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAE**TILDGAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA**
TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGASSNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQV
 VLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTVAGEHNIEETEHTEQKRNIRIIPHHNYN
 AAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRVFKHGRSALVLQ

YLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEE
 CAMKGKYGIIYTKVSRVNWIKETKLTGPEGPSKLTRAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPAT
GHHHHHHHH

SEQ ID NO: 96 D0166_AE144 pNL177
 MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILD**GAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA**
TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS
APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASSNITQSTQSFNDFTRVVGEDAK
 PGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTVVAGEHNIEETEHTEQKRNIR
 IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHK
 GRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLT
 GIISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRVNWIKETKLTGPEGPSKLTRAETGAGSPGAETAEOQLIS
EEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 97 D0166_AE288 pNL178
 MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILD**GAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPA**
TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS
ETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG
TSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTE
PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASSNITQST
 QSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTVVAGEH
 NIEETEHTEQKRNIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAKEYTNI FL
 KFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGD
 SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRVNWIKETKLTGPEGPSKLTRAET
GAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 98 S0174_AE72 pNL179
 MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSG**APSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE**

TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGASSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQV
 VLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYN
 AAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQ
 YLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEE
 CAMKGKYGIIYTKVSRYVNWIKETKLTGPEGPSKLTRAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPAT
GHHHHHHHH

SEQ ID NO: 99 S0174_AE144 pNL180
 MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSGAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE
TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT
STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASSFNDFTRVVGGEDAK
 PGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN VIR
 IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHK
 GRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLT
 GIISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRYVNWIKETKLTGPEGPSKLTRAETGAGSPGAETAEOQLIS
EEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 100 S0174_AE288 pNL181
 MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSGAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE
SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG
SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES
ATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS
TEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPA
SSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEH
 NIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FL
 KFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGD
 SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRYVNWIKETKLTGPEGPSKLTRAET
GAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 101 E0224_AE72 pNL182

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVD AFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVE**GAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP**
GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGASSTGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRI I PHHNYN
 AAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPIC IADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQ
 YLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEE
 CAMKGKYG IYTKVSRYVNWIKEKTKLTGPEGPSKLTRAETGAGSPGAETAEOKLISEEDLSPAT
GHHHHHHHH

SEQ ID NO: 102 E0224_AE144 pNL183

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVD AFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVE**GAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP**
GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST
EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASSTGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN VIR
 I I PHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPIC IADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHK
 GRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTSFLT
 GIISWGEECAMKGKYG IYTKVSRYVNWIKEKTKLTGPEGPSKLTRAETGAGSPGAETAEOKLIS
EEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 103 E0224_AE288 pNL184

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVD AFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVE**GAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSET**
PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS
ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESAT
PESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA
PGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASSTGVKITVVAGEH
 NIEETEHTEQKRN VIRI I PHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPIC IADKEYTNI FL
 KFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGD

SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITYTKVSRVNWIKETKLTGTGPEGPSKLTRAET
GAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 104 K0413_AE72 pNL185

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNRCEQFCNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDQVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDFAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITVAGEHNIEETEHTEQKRNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLL
 STKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITYTKVS
 RYVNWIKETK**GAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS**
TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGASSLTGTGPEGPSKLTRAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPAT
GHHHHHHHH

SEQ ID NO: 105 K0413_AE144 pNL186

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNRCEQFCNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDQVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDFAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITVAGEHNIEETEHTEQKRNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLL
 STKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITYTKVS
 RYVNWIKETK**GAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS**
TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE
EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASSLTGTGPEGPSKLTRAETGAGSPGAETAEOQLIS
EEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 106 K0413_AE288 pNL187

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNRCEQFCNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDQVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDFAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITVAGEHNIEETEHTEQKRNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLL
 STKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITYTKVS
 RYVNWIKETK**GAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT**

SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA
 TPEGSPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES
 GPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT
 STEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASSLTGPEGPSKLTRAET
GAGSPGAETAEOKLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 107 A0103_AE72 pNL188

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSAGAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES
ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGASSDNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPC
 GRVSVSQTSKLTRAETVFPDQVDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQV
 VLNGKVDACGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIETEHTEQKRNIRIIPHHNYN
 AAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQ
 YLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGE
 CAMKGKYGIIYTKVSRVNWIKETKLTGPEGPSKLTRAETGAGSPGAETAEOKLISEEDLSPAT
GHHHHHHHH

SEQ ID NO: 108 A0103_AE144 pNL189

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSAGAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES
ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG
SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASSDNKVVCSCTEGYRLAENQKSC
 EPAVPFPCGRVSVSQTSKLTRAETVFPDQVDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAK
 PGQFPWQVVLNGKVDACGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIETEHTEQKRNIR
 IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHK
 GRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTSFLT
 GIISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRVNWIKETKLTGPEGPSKLTRAETGAGSPGAETAEOKLIS
EEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 109 A0103_AE288 pNL190

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSAGAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP
ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG
SETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP

GTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST
 EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASSDNKV
 VCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSKLTRAETVFPDQVDYVNSTEAETILDNITQST
 QSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTVVAGEH
 NIEETEHTEQKRNIRIIPHHYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAKEYTNIFL
 KFGSGYVSGWGRVFBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGD
 SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVYNWIKETKLTGPEGPSKLTRAET
GAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 110 G0226_AE42 pNL195

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSCCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSKLTRA
 ETVFPDQVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCCGGS
 IVNEKWIVTAAHCVETGVK**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS**VKITTV
 AGEHNIEETEHTEQKRNIRIIPHHYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRVFBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVYNWIKETKLTGPEGPSKL
RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 111 K0228_AE42 pNL196

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSCCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSKLTRA
 ETVFPDQVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCCGGS
 IVNEKWIVTAAHCVETGVK**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS**ITVV
 AGEHNIEETEHTEQKRNIRIIPHHYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRVFBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVYNWIKETKLTGPEGPSKL
RAETGAGSPGAETAEOQLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 112 T0230_AE42 pNL197

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSCCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSKLTRA
 ETVFPDQVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCCGGS
 IVNEKWIVTAAHCVETGVKIT**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS**VV

AGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPIC IADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVSRVNWIKEKTKLTGPEGPSKLT
RAETGAGSPGAETAEQKLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 113 N0105_AE42 pNL198
 MQRVNMIMAE SPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTER TTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFC KNSADN**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPAS**
SKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRAETVFPDVDYVNSTEAE TILDNI
 TQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVV
 AGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPIC IADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVSRVNWIKEKTKLTGPEGPSKLT
RAETGAGSPGAETAEQKLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 114 S0283_AE42 pNL199
 MQRVNMIMAE SPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTER TTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFC KNSADNKVVC SCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAE TILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITTV VAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNS**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS**YVTPIC IADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVSRVNWIKEKTKLTGPEGPSKLT
RAETGAGSPGAETAEQKLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 115 CT_AE72 pNL202
 MQRVNMIMAE SPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTER TTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFC KNSADNKVVC SCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAE TILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITTV VAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPIC IADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLL
 STKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVS
 RYVNWIKEKTKLTGAGSPGAETA**LVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEES**GAGSPGAETAG**APSPAG**

SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG
 SAPGASSGAETAEQKLISEEDLSPATGHHHHHHHH

SEQ ID NO: 116 C-конец-AE864 FIX-092

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSKLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVD AFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITV VAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPIC IADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLR
 STKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVS
 RYVNWIKETKLTGPEGPS KLTRAETGSP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS
 PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSE
 PATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP
 TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG
 PGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSP
 AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE
 EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE
 EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS
 ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSP
 TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG
 PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE
 PATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT
 PESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTE
 EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSS
 S

SEQ ID NO: 117 C-конец-AE144 pJH0131

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSKLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVD AFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITV VAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPIC IADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLL
 STKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVS
 RYVNWIKETKLTGAGSPGAETA LVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEES GAGSPGAETAGAPSPAG

SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG
 SAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG
 TSTEPSEGSAPGASS

SEQ ID NO: 118 N105-AE42 pJH44

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADN**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPAS**
SKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRAETVFPDVDYVNSTEAEITLDNI
 TQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTV
 AGEHNIEETEHETEQKRNVIIRIIPHHYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRVFBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITYTKVSRYVNWIKEKTKLT

SEQ ID NO: 119 D166-AE72 pJH46

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAEITLD**GAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA**
TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGASSNI TQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQV
 VLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTVVAGEHNIEETEHETEQKRNVIIRIIPHHYN
 AAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFBKGRSALVLQ
 YLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEE
 CAMKGKYGITYTKVSRYVNWIKEKTKLT

SEQ ID NO: 120 D166-AE144 pJH47

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAEITLD**GAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA**
TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS
APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASSNI TQSTQSFNDFTRVVGGEDAK
 PGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTVVAGEHNIEETEHETEQKRNVI
 IIPHHYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFBK
 GRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLT
 GIISWGEECAMKGKYGITYTKVSRYVNWIKEKTKLT

SEQ ID NO: 121 C-конец-AE144 pJH50

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHETEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLL
 STKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVS
 RYVNWIKEKTKLTGAGSPGAETALVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEESGAGSPGAETAGAPTSTE
PSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGS
ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG
TSTEPSEGSAPGASS

SEQ ID NO: 122 C-конец-AE288 pJH51

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHETEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLL
 STKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVS
 RYVNWIKEKTKLTGAGSPGAETALVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEESGAGSPGAETAGAPGTSE
SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE
GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE
GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSE
ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSG
SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASS

SEQ ID NO: 123 C-конец-AE72 pJH52

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHETEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLL
 STKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVS

RYVNWIKEKTKLTGAGSPGAETALVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEESGAGSPGAETAGAPTSES
 ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG
 SAPGASS

SEQ ID NO: 124 E224-AE42 pJH54

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS
 VNEKWIVTAAHCVEGAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS¹TVV
 AGEHNIEETEHTEQKRN²VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRV³FBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGYIYTKVSRYVNWIKEKTKLT

SEQ ID NO: 125 D166-AE42 pJH55

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDGAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS¹NI
 TQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHC²VETGVKITVV
 AGEHNIEETEHTEQKRN³VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRV⁴FBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGYIYTKVSRYVNWIKEKTKL

SEQ ID NO: 126 D166-AE42, C-конец-AE72 pJH59

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDGAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS¹NI
 TQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHC²VETGVKITVV
 AGEHNIEETEHTEQKRN³VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRV⁴FBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGYIYTKVSRYVNWIKEKTKLTGAGSPGAET
 ALVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEESGAGSPGAETAGAPTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS
 ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGAS

SEQ ID NO: 127 D166-AE42, C-конец-AE144 pJH60

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILD**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASSNI**
 TQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVV
 AGEHNIETEHETEQKRNVIIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRVFBHGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSDGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITYKVSRYVNWIKETKLTGAGSPGAET
ALVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEESGAGSPGAETAGAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE
PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP
EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASS

SEQ ID NO: 128 D166-AE42, C-конец-AE288 pJH61

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILD**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASSNI**
 TQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVV
 AGEHNIETEHETEQKRNVIIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRVFBHGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSDGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITYKVSRYVNWIKETKLTGAGSPGAET
ALVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEESGAGSPGAETAGAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT
SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA
TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS
APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS
PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP
SEGSAPASS

SEQ ID NO: 129 D166-AE72, C-конец-AE72 pJH62

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILD**GAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA**
TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGASSNI TQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQV
 VLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIETEHETEQKRNVIIRIIPHHNYN
 AAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFBHGRSALVLQ

YLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEE
 CAMKGKYGIYTKVSRVYNWIKETKLTGAGSPGAETALVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEESGAG
SPGAETAGAPTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT
PESGPGTSTEPSEGSAPGASS

SEQ ID NO: 130 D166-AE72, C-конец-AE144 pJH63

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDGAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA
TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGASSNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQV
 VLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIRIIPHHNYN
 AAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQ
 YLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEE
 CAMKGKYGIYTKVSRVYNWIKETKLTGAGSPGAETALVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEESGAG
SPGAETAGAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP
EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS
PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASS

SEQ ID NO: 131 D166-AE72, C-конец-AE288 pJH64

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDGAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA
TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGASSNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQV
 VLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIRIIPHHNYN
 AAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQ
 YLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEE
 CAMKGKYGIYTKVSRVYNWIKETKLTGAGSPGAETALVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEESGAG
SPGAETAGAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA
TPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES
GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGT
SESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEP
SEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASS

SEQ ID NO: 132 D166-AE144, C-конец-AE72 pJH65

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDQVDYVNSTEAETILDGAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA
TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS
APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASSNITQSTQSFNDFTRVVGEDAK
 PGQFPWQVVLNGKVDFAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNIR
 IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHK
 GRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLT
 GIISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRVYVNIKEKTKLTGAGSPGAETA LVPRSFLLRNPNDKYEPFW
EDEESGAGSPGAETAGAPTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSET
PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGASS

SEQ ID NO: 133 D166-AE144, C-конец-AE144 pJH66

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDQVDYVNSTEAETILDGAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA
TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS
APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASSNITQSTQSFNDFTRVVGEDAK
 PGQFPWQVVLNGKVDFAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNIR
 IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHK
 GRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLT
 GIISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRVYVNIKEKTKLTGAGSPGAETA LVPRSFLLRNPNDKYEPFW
EDEESGAGSPGAETAGAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG
PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS
TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASS

SEQ ID NO: 134 D166-AE144, C-конец-AE288 pJH67

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDQVDYVNSTEAETILDGAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA
TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS
APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASSNITQSTQSFNDFTRVVGEDAK
 PGQFPWQVVLNGKVDFAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNIR

IIPHNNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHK
 GRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTSFLT
 GIISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRYVNWIKETKLTGAGSPGAETALVPRSFLLRNPNDKYEPFW
EDEESGAGSPGAETAGAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSE
TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT
SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESA
TPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS
APGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPASS

SEQ ID NO: 135 N105-AE42, D166-AE42 pJH68

MQRVMNIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNGAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPAS
 SKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRAETVFPD VDVNSTEAETILDGA
 PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASSNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPG
 QFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHC VETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRII
 PHHNNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGR
 SALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTSFLTGI
 ISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRYVNWIKETKLT

SEQ ID NO: 136 N105-AE42, D166-AE72 pJH69

MQRVMNIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNGAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPAS
 SKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRAETVFPD VDVNSTEAETILDGA
 PSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST
 EPSEGSAPGASSNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVT
 AAHC VETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRN VIRIIIPHNNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLN
 SYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRYVNWIKETKLT

SEQ ID NO: 137 N105-AE42, D166-AE144 pJH70

MQRVMNIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNGAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPAS
 SKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRAETVFPD VDVNSTEAETILDGA

PSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST
 EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT
 STEEGTSTEPSEGSAPGASSNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIVTAAHCVETGVKITTVAGEHNIEETEHETEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPIC IADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLL
 STKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVS
 RYVNWIKEKTKLT

SEQ ID NO: 138 N105-AE42, C-конец-AE72 pJH71

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTER TTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNRCEQFC KNSADNGAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPAS
 SKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRAETVFPD VDVNSTEAE TILDNI
 TQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTV
 AGEHNIEETEHETEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPIC IADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVSR YVNWIKEKTKLTGAGSPGAET
ALVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEESGAGSPGAETAGAPTSEATPESGPGSEPATSGSETPGTS
ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGASS

SEQ ID NO: 139 N105-AE42, C-конец-AE144 pJH72

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTER TTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNRCEQFC KNSADNGAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPAS
 SKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRAETVFPD VDVNSTEAE TILDNI
 TQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTV
 AGEHNIEETEHETEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPIC IADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVSR YVNWIKEKTKLTGAGSPGAET
ALVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEESGAGSPGAETAGAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE
PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE
EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASS

SEQ ID NO: 140 N105-AE42, C-конец-AE288 pJH73

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTER TTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNRCEQFC KNSADNGAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPAS

SKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPFCGRVSVSQTSLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNI
 TQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIIVTAAHCVEITGVKITVV
 AGEHNIETEHTEQKRNIRIIPHHYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRVFBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVYNWIKETKLTGAGSPGAET
ALVPRSFLLRNPNDKYEPFWEEDESGAGSPGAETAGAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT
 SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA
 TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS
 APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS
 PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP
 SEGSAPASS

SEQ ID NO: 141 N105-AE42, E224-AE42 pJH74

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNGAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPAS
 SKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPFCGRVSVSQTSLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNI
 TQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIIVTAAHCVEGAPGSPAG
 SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASSTGVKITVVAGEHNIETEHTEQKRNIRIIPHHYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVYNWIKETKLT

SEQ ID NO: 142 D166-AE42, E224-AE42 pJH75

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPFCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDGAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASSNI
 TQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIIVTAAHCVEGAPGSPAG
 SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASSTGVKITVVAGEHNIETEHTEQKRNIRIIPHHYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVYNWIKETKLT

SEQ ID NO: 143 D166-AE72, E224-AE42 pJH76

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSKLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILD**GAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA**
TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGASSNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQV
 VLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVE**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS**
ETPASSTGVKITTVAGEHNIEETEHTEQKRNIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLN
 SYVTPICIAADKEYTNIIFLKFGSGYVSGWGRVFBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYN
 NMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGYIYTKVSRVYNWIKE
 KTKLT

SEQ ID NO: 144 D166-AE144, E224-AE42 pJH77
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSKLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILD**GAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA**
TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS
APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASSNITQSTQSFNDFTRVVGEDAK
 PGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVE**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG**
SEPATSGSETPASSTGVKITTVAGEHNIEETEHTEQKRNIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNIIFLKFGSGYVSGWGRVFBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLL
 STKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGYIYTKVS
 RYVYNWIKEKTKLT

SEQ ID NO: 145 E224-AE42, C-конец-AE72 pJH78
 MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSKLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSI
 VNEKWIVTAAHCVE**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS**TGVKITTV
 AGEHNIEETEHTEQKRNIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYT
 NIIFLKFGSGYVSGWGRVFBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGYIYTKVSRVYNWIKEKTKLTGAGSPGAET
ALVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEESGAGSPGAETAGAPTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS
ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGASS

SEQ ID NO: 146 E224-AE42, C-конец-AE144 pJH79

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDQVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS
 VNEKWIVTAAHCVEGAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASSTGVKITTV
 AGEHNIEETEHTEQKRVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRVFBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVNWIKETKLTGAGSPGAET
ALVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEESGAGSPGAETAGAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE
PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP
EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASS

SEQ ID NO: 147 E224-AE42, C-конец-AE288 pJH80

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDQVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS
 VNEKWIVTAAHCVEGAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASSTGVKITTV
 AGEHNIEETEHTEQKRVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRVFBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVNWIKETKLTGAGSPGAET
ALVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEESGAGSPGAETAGAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT
SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA
TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS
APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS
PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP
SEGSAPASS

SEQ ID NO: 148 N105-AE42, C-конец-Fc pJH81

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADN**GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPAS**
SKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRAETVFPDQVDYVNSTEAETILDNI
TQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTV
AGEHNIEETEHTEQKRVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAKEYT
NIFLKFGSGYVSGWGRVFBKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS

CQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVYNWIKETKLTDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVME
 ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 149 E224-AE42, C-конец-Fc pJH82

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDQVYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS
 VNEKWIVTAAHCVEGAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASSTGVKITVV
 AGEHNIETEHEQKRNIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRVFNHGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDS
 CQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVYNWIKETKLTDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVME
 ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 150 D166-AE42, C-конец-Fc pJH83

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDQVYVNSTEAETILDGAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASSNI
 TQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSVNEKWIVTAAHCVEVETGVKITVV
 AGEHNIETEHEQKRNIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAKEYT
 NIFLKFGSGYVSGWGRVFNHGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDS

CQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRVNWIKETKLTDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
 EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGP
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
 VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT
 CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVME
 ALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 151 D166-AE72, C-конец-Fc pJH84
 MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDGAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA
 TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGASSNITQSTQSFNDFTRVVGEDAKPGQFPWQV
 VLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTVAGEHNIEETEHETEQKRNIRIIPHHNYN
 AAINKYNHDIALLELDEPLVLSYVTPICIAKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQ
 YLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEE
 CAMKGKYGIIYTKVSRVNWIKETKLTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
 VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
 QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGG
 GGGGGGGSGGGSGGGSGGGSGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
 SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
 PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 152 D166-AE144, C-конец-Fc pJH85
 MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAETILDGAPSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA
 TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS
 APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASSNITQSTQSFNDFTRVVGEDAK
 PGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITTVAGEHNIEETEHETEQKRNIR

IIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHK
 GRSALVLQYLRVPLVDRATCLLSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLT
 GIIISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRYVNWIKETKLTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSL
 SLSPGKGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
 VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
 VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ

SEQ ID NO: 153 C-конец-Fc pJH56

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLEREC
 MEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCPFGFEGKNC
 ELDVTCNIKNGRCEQFCCKNSADNKVVCSCCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRA
 ETVFPDVDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGS I
 VNEKWIPTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHEQKRN VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLE
 LDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLL
 STKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIIYTKVS
 RYVNWIKETKLTDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGSGGGSGG
 GGGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR
 EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
 KLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 226 C-конец-AE288

pSYN-FIX-102

MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREV
 FENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCCKNSADNKVV
 CSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRAETVFPDVDYVNSTEAEITLDNITQSTQSFNDFTRVVGGE
 DAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIPTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHEQKRN VIRIIPHHNYNAA
 INKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNI FLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLLS
 TKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIIYTKVSRYVNWIKETKLTG

**TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS
APGAETAEQKLISEEDLSPATGHHHHH***

SEQ ID NO: 227 двойная цепь D166-AE72, C-конец-Fc pSYN-FIX-216
MQRVNMIMAESFGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREV
FENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCNSADNKVV
CSCTEGYRLAENQKSCEPAVFPFCGRVSVSQSKLTRAETVFPDQVYNSTEAEITLD**GPSGSPSTSTEEGTSESAT
PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGASSNITQSTQSFNDFTRVVGGED
AKPGQFPWQVVLNGKVDFAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIIRIIPHHNYNAAI
NKYNHDIALLELDEPLVLSYVTPICIAKEYTNIIFLKFGSGYVSGWGRVFKGRSALVLQYLRLVPLVDRATCLLST
KFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGDGSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKGIYTKVSRVYNWIKETKLTDK
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTIVLQDNLNGKEYCKKVSINKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG**

SEQ ID NO: 228 двойная цепь D166-AE72, C-конец-Fc pSYN-FIX-216-Fc часть
цепи

**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTIVLQDNLNGKEYCKKVSINKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG**

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Слитый белок фактора IX (FIX), содержащий полипептид FIX и XTEN, который встроен в полипептид FIX, причем слитый белок FIX содержит аминокислотную последовательность полипептида FIX SEQ ID NO: 2 с XTEN, встроенным в участке встраивания, выбранном из группы, состоящей из положений аминокислот: 149, 162, 166, 174 и 413 последовательности SEQ ID NO: 2, причем XTEN составляет от около 42 аминокислот до около 288 аминокислот в длину, и при этом слитый белок FIX проявляет прокоагулянтную активность.

2. Слитый белок фактора IX (FIX), содержащий вариант полипептида R338L FIX (Padua) и XTEN, который встроен в вариант полипептида FIX, причем слитый белок FIX содержит аминокислотную последовательность полипептида FIX SEQ ID NO: 2 с XTEN, встроенным в участке встраивания, выбранном из группы, состоящей из положений аминокислот: 149, 162, 166, 174 и 413 последовательности SEQ ID NO: 2, причем XTEN составляет от около 42 аминокислот до около 288 аминокислот в длину, и при этом слитый белок FIX проявляет прокоагулянтную активность, и

причем слитый белок FIX характеризуется по меньшей мере в 1,5 раза большим периодом полувыведения in vivo по сравнению с вариантом полипептида R338L FIX (Padua) без указанного встраивания XTEN.

3. Слитый белок FIX по п.1 или 2, отличающийся тем, что участок встраивания выбран из группы, состоящей из положений аминокислот: 149, 162, 166 и 174 последовательности SEQ ID NO: 2.

4. Слитый белок FIX по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что XTEN составляет около 144 аминокислот или около 288 аминокислот в длину.

5. Слитый белок FIX по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что XTEN составляет около 72 аминокислот в длину.

6. Слитый белок FIX по любому из пп.1-5, который дополнительно содержит второй XTEN.

7. Слитый белок FIX по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что участком встраивания является положение аминокислоты 166 последовательности SEQ ID NO: 2.

8. Слитый белок FIX по любому из пп.1-7, который дополнительно содержит первый домен Fc, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228.

9. Слитый белок FIX по п.8, дополнительно содержащий второй домен Fc, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228.

10. Слитый белок FIX по п.9, который содержит две полипептидные цепи, при этом:

а) первая полипептидная цепь содержит первый домен Fc, слитый с N-концом или C-концом полипептида FIX, содержащего XTEN, и

б) вторая полипептидная цепь содержит второй домен Fc,

при этом первый домен Fc и второй домен Fc связаны ковалентной связью, причем ковалентная связь представляет собой дисульфидную связь.

11. Слитый белок FIX по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что слитый белок FIX содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227.

12. Слитый белок FIX по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что слитый белок FIX содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227 без сигнального пептида и без пропептида (аминокислот 1-46).

13. Выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую слитый белок FIX по любому из пп.1-12.

14. Экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид по п.13.

15. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п.13 или вектор по п.14.

16. Слитый белок фактора IX (FIX), содержащий первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, при этом:

а) первая полипептидная цепь содержит:

(i) полипептид FIX и XTEN, который встроен в полипептид FIX, причем слитый белок FIX содержит аминокислотную последовательность полипептида FIX SEQ ID NO: 2 с XTEN, встроенным в положении аминокислоты 166 последовательности SEQ ID NO: 2, и при этом указанный XTEN содержит аминокислотную последовательность, имеющую около 76 аминокислот; и

(ii) первый домен Fc, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228, при этом указанный первый домен Fc слит с С-концом полипептида FIX, содержащего указанный XTEN; и

б) вторая полипептидная цепь содержит второй домен Fc,

причем первый домен Fc и второй домен Fc связаны ковалентной связью, причем ковалентная связь представляет собой дисульфидную связь; и при этом слитый белок FIX проявляет прокоагулянтную активность.

17. Слитый белок FIX по п.16, отличающийся тем, что первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227; и при этом вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228.

18. Слитый белок FIX по п.16, отличающийся тем, что первая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 227 без сигнального пептида и без пропептида (аминокислот 1-46), и при этом вторая полипептидная цепь содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 228.

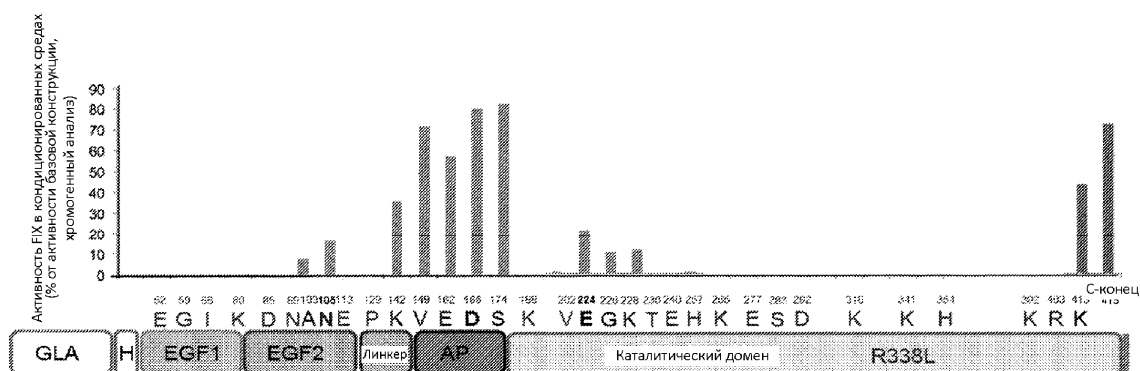
19. Композиция для профилактического лечения или лечения по необходимости кровотечения, содержащая слитый белок FIX по любому из пп.1-12 или 16-18 и фармацевтически приемлемый носитель.

20. Применение слитого белка FIX по любому из пп.1-12 или 16-18 для уменьшения частоты эпизодов кровотечения у субъекта-человека, причем субъект страдает гемофилией В.

21. Применение слитого белка FIX по любому из пп.1-12 или 16-18 для профилактического лечения кровотечения у субъекта-человека, причем субъект страдает гемофилией В.

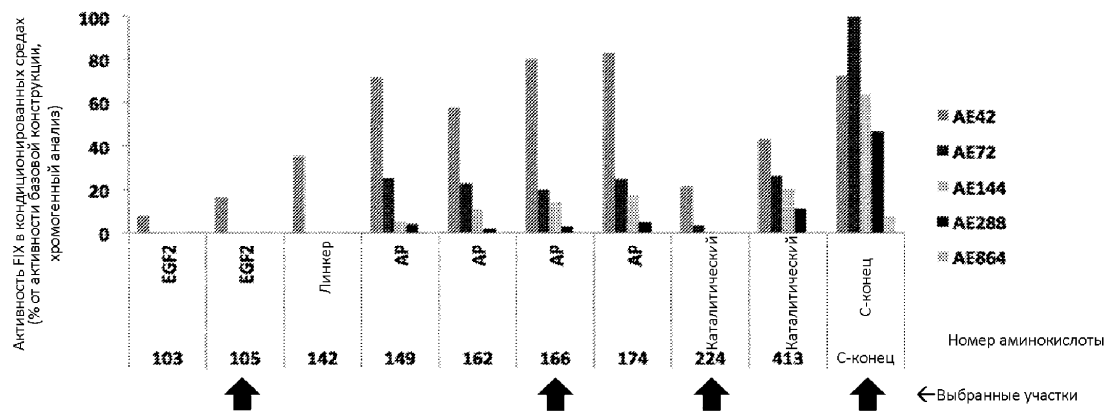
22. Применение слитого белка FIX по любому из пп.1-12 или 16-18 для лечения по необходимости кровотечения у субъекта-человека, причем субъект страдает гемофилией В.

Анализ активности встраиваний AE42 и С-концевого слияния



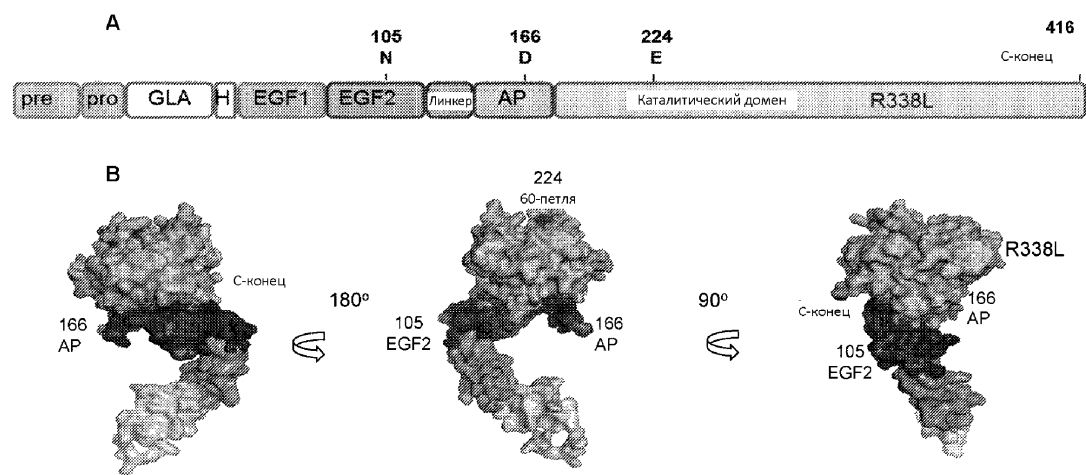
Фиг. 1

Анализ активности участков встраивания и длин XTEN



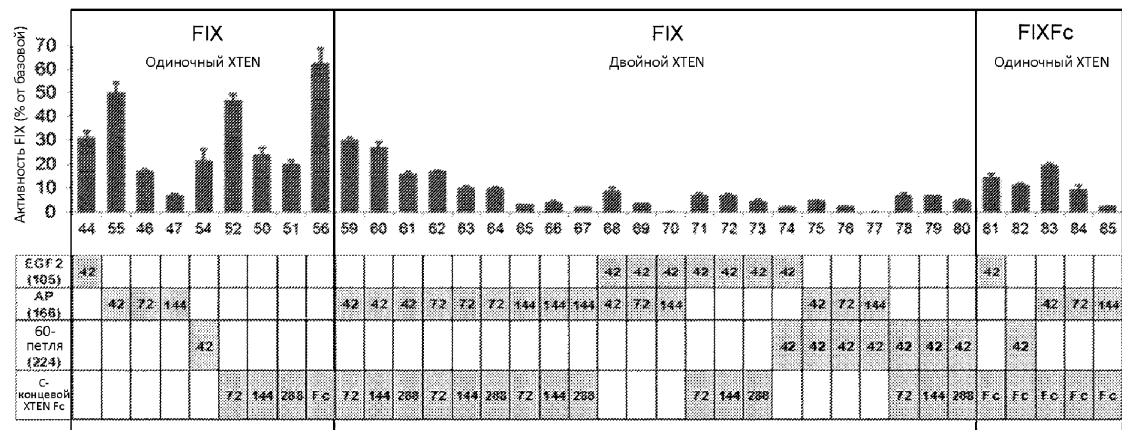
Фиг. 2

Четыре выбранных участка для комбинаторной библиотеки в FIX

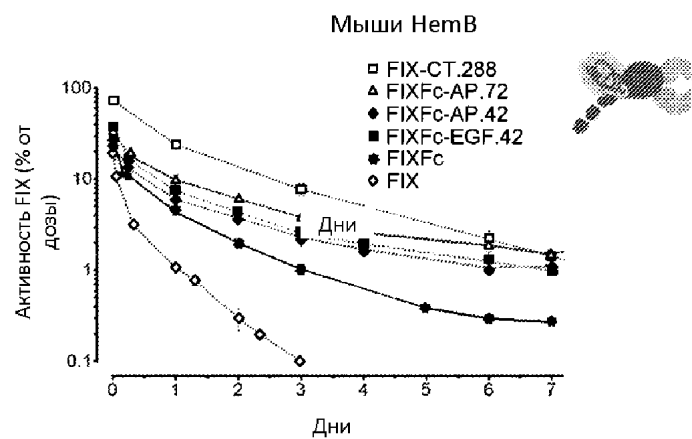
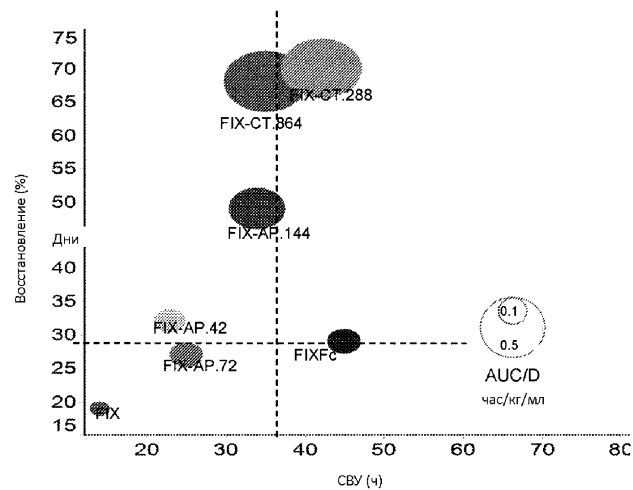
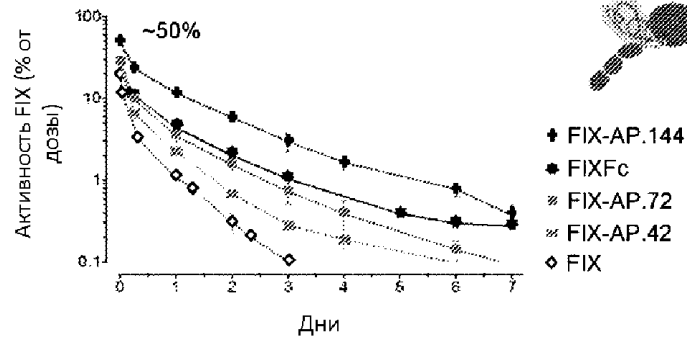
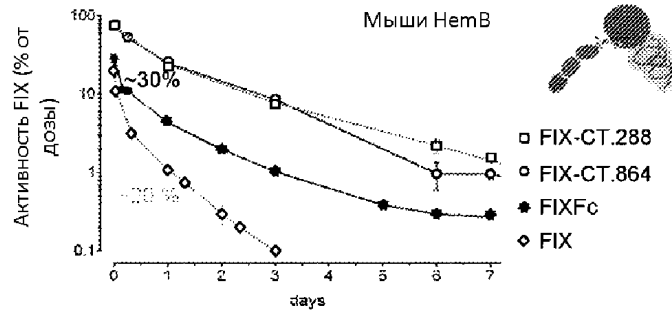


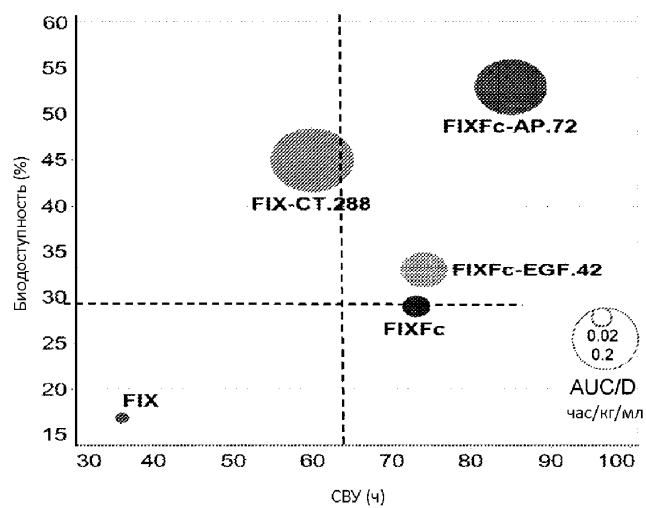
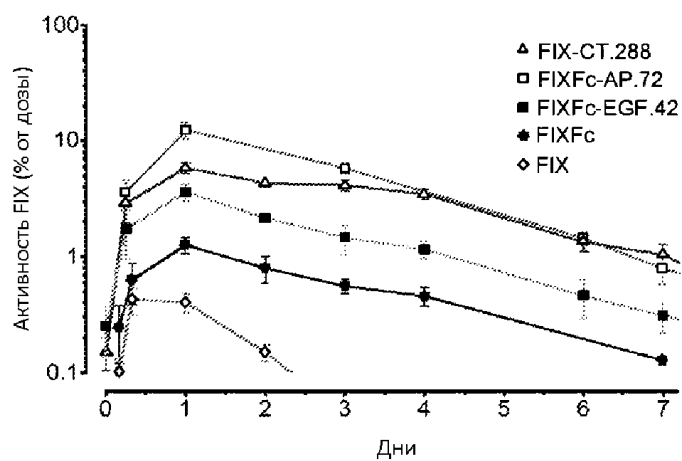
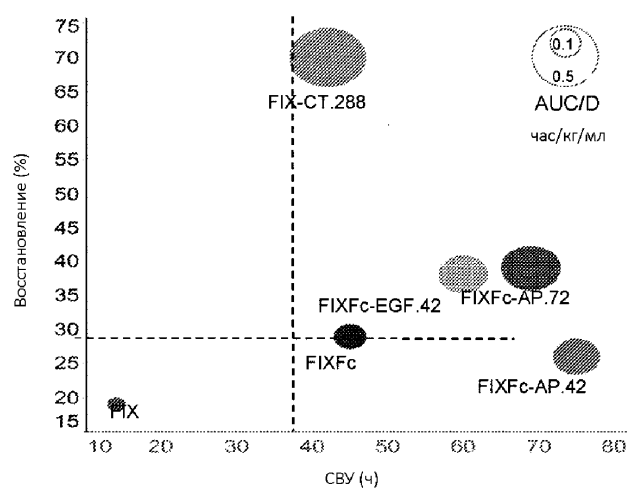
Фиг. 3

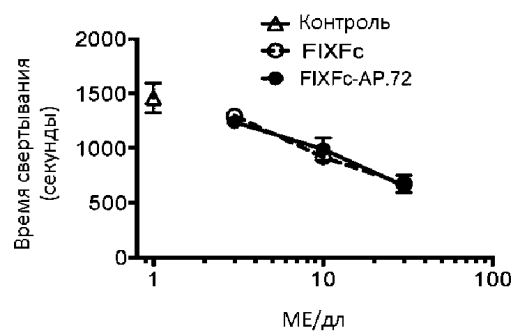
Три группы FIX-XTEN, обладающих обнаруживаемой активностью



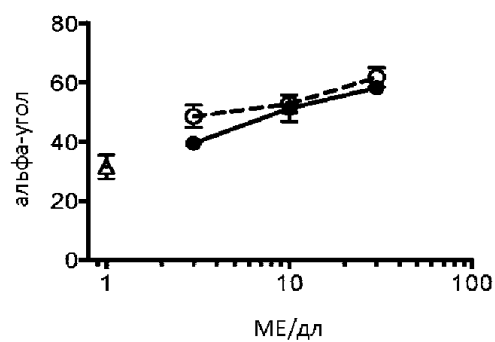
Фиг. 4



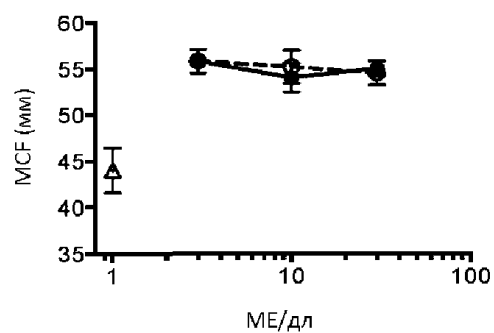




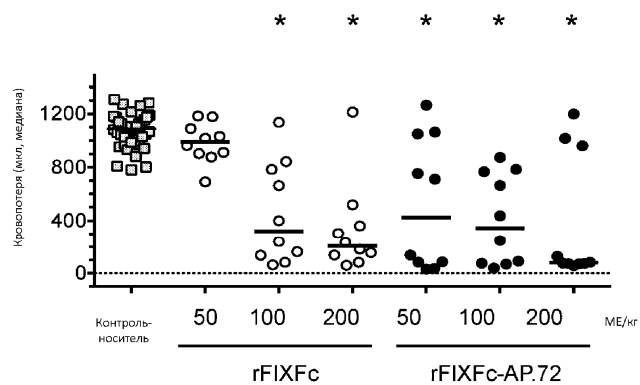
Фиг. 8А



Фиг. 8В

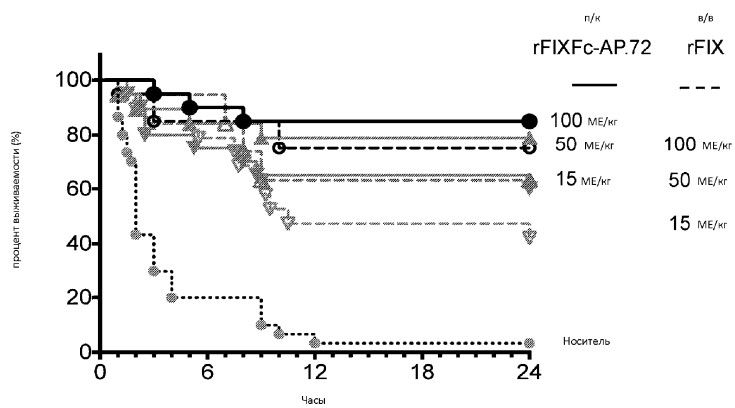


Фиг. 8С

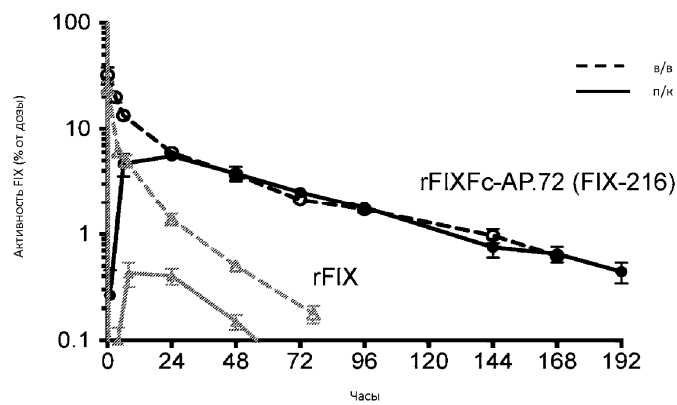


* p < 0.0001

Фиг. 9



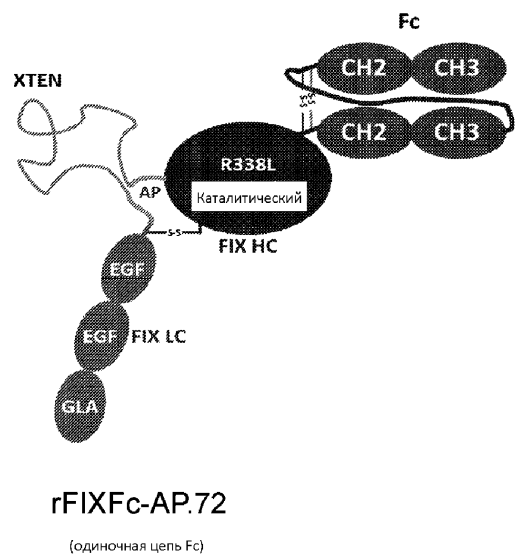
Фиг. 10



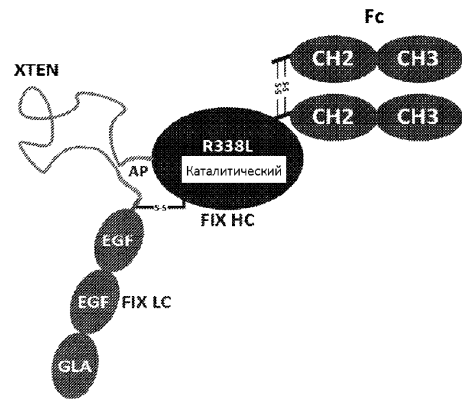
Фиг. 11А

	Внутривенно					Подкожно				
	I.R. (%)	t _{1/2} (ч)	MRT (ч)	AUC/D (н*кг/мл)	CI (мл/ч/кг)	F (%)	t _{1/2} (ч)	MRT (ч)	AUC/D (н*кг/мл)	CI (мл/ч/кг)
rFIX	21	17	17	0.043	23.2	14	21	38	0.006	175
rFIXFc-AP.72	32	51	53	0.165	6.0	70	48	72	0.116	8.6

Фиг. 11В



Фиг. 12А



rFIXFc-AP.72

(двойная цель Fc)

Фиг. 12В

название конструкции FIX	SEQ ID NO	Описание	название плазмиды
rFIX-CT.72	123	R338L, C-конец AE72	pJH52
rFIX-CT.144	121	R338L, C-конец AE144	pJH50
rFIX-CT.288	226	R338L, C-конец AE288-тег	FIX-102
rFIX-CT.288	122	R338L, C-конец AE288	pJH51
rFIX-CT.864	116	R338L, C-конец AE864	FIX-92
rFIX-AP.72	119	R338L, D166-AE72	pJH46
rFIX-AP.144	120	R338L, D166-AE144	pJH47
rFIXFc-EGF.42	148	R338L, N105-AE42, C-конец -Fc	pJH81
rFIXFc-AP.42	150	R338L, D166-AE42, C-конец Fc	pJH83
rFIXFc-AP.72	151	R338L, D166-AE72, C-конец Fc	pJH84
rFIXFc-AP.72 (двойная цель Fc)	227 & 228	R338L, D166-AE72, C-конец Fc (двойная цель Fc)	FIX-216

Фиг. 13

