

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **041588**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.11.09**

**(51)** Int. Cl. **A61K 38/37** (2006.01)

**(21)** Номер заявки  
**201592022**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2014.06.27**

---

**(54) РАСЩЕПЛЯЕМЫЙ ТРОМБИНОМ ЛИНКЕР, СОДЕРЖАЩИЙ ХТЕН, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

---

**(31)** 61/840,872

**(32)** 2013.06.28

**(33)** US

**(43)** 2016.05.31

**(86)** PCT/US2014/044731

**(87)** WO 2014/210558 2014.12.31

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

**(72)** Изобретатель:  
**Чхабра Экта Сет, Кулман Джон, Лю  
Тунгуао (US)**

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

**(56)** US-A1-20110183907  
US-A1-20130108629  
WO-A1-2010060081  
US-A1-20120178691  
US-A1-20120289468  
WO-A1-2013122617  
WO-A1-2013106787

PETERS et al, "Biochemical and functional characterization of a recombinant monomeric factor VIII-Fc fusion protein," Journal of Thrombosis and Haemostasis, 27 January 2013 (27.01.2013), Vol. 11, Pgs. 132-141.

---

**(57)** Настоящее изобретение предусматривает химерную молекулу, содержащую белок VWF, связанный с гетерологичным фрагментом с помощью линкера VWF. Изобретение предусматривает эффективный линкер VWF, который может быть расщеплен в присутствии тромбина. Химерная молекула может дополнительно содержать полипептидную цепь, содержащую белок FVIII и второй гетерологичный фрагмент, причем цепь, содержащая белок VWF, и цепь, содержащая белок FVIII, ассоциированы друг с другом. Изобретение также включает нуклеотиды, векторы, клетки-хозяева, способы применения химерных белков.

---

**B1**

**041588**

**041588**

**B1**

### Уровень техники

Гемофилия А представляет собой нарушение, сопровождающееся повышенной кровоточивостью, вызываемое дефектами кодирования гена коагулирующего фактора VIII (FVIII), и поражает 1-2 из 10000 родившихся мальчиков. Graw et al., *Nat. Rev. Genet.* 6(6): 488-501 (2005). Пациентов, страдающих гемофилией А, можно лечить инфузией очищенного или рекомбинантно полученного FVIII. Однако известно, что все коммерчески доступные продукты FVIII имеют период полувыведения, равный около 8-12 часов, что требует частого внутривенного введения пациентам. См. Weiner M.A. and Cairo, M.S., *Pediatric Hematology Secrets*, Lee, M.T., 12. *Disorders of Coagulation*, Elsevier Health Sciences, 2001; Lillcrap, D. *Thromb. Res.* 122 Suppl 4:S2-8 (2008). Кроме того, был опробован ряд подходов, направленных на увеличение периода полувыведения FVIII. Например, подходы, используемые для увеличения периода полувыведения факторов свертывания крови, включают пегилирование, гликопегилирование и конъюгацию с альбумином. См. Dumont et al., *Blood.* 119(13): 3024-3030 (интернет-публикация 13 января 2012 г.). Независимо от используемой белковой инженерии, однако, разрабатываемые в настоящее время продукты FVIII пролонгированного действия имеют улучшенные значения периода полувыведения, но величины периодов полувыведения, как сообщается, ограничены всего лишь около 1,5-2-кратным увеличением в доклинических животных моделях. См. там же. Непротиворечивые результаты были продемонстрированы на людях, например, сообщалось, что rFVIIIc улучшает период полувыведения до около 1,7-кратной величины по сравнению с ADVATE® у пациентов с гемофилией А. См. там же. Таким образом, увеличение периода полувыведения, несмотря на незначительные улучшения, может указывать на существование других факторов, ограничивающих  $t_{1/2}$ .

Вследствие частого введения доз и неудобств, причиняемых графиком введения, существует потребность в разработке продуктов FVIII, требующих меньшей частоты введения, т.е. продукта FVIII, имеющего период полувыведения, превышающий 1,5-2-кратный предел периода полувыведения.

### Сущность изобретения

Настоящее изобретение касается химерной молекулы, содержащей белок фактора фон Виллебранда (VWF), гетерологичный фрагмент (H1), последовательность XTEN и линкер VWF, соединяющий белок VWF с гетерологичным фрагментом, при этом линкер VWF содержит полипептид, выбранный из: (i) области a2 из фактора VIII (FVIII); (ii) области a1 из FVIII; (iii) области a3 из FVIII; (iv) сайта расщепления тромбином, содержащего X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любой их комбинации, и при этом последовательность XTEN соединена с белком VWF, гетерологичным фрагментом (H1), линкером VWF или любой их комбинацией. В одном варианте реализации изобретения последовательность XTEN соединяет белок VWF с линкером VWF или линкер VWF с гетерологичным фрагментом. В другом варианте реализации изобретения химерная молекула дополнительно включает вторую полипептидную цепь, которая содержит белок FVIII, при этом первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь ассоциированы друг с другом. В других вариантах реализации изобретения белок FVIII в химерной молекуле дополнительно содержит дополнительную последовательность XTEN. Дополнительная последовательность XTEN может быть связана с N-концом или C-концом белка FVIII или вставлена между двумя соседними аминокислотами FVIII. В еще одних вариантах реализации изобретения вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй гетерологичный фрагмент (H2).

Настоящее описание также включает химерную молекулу, содержащую первую полипептидную цепь, которая содержит белок VWF, гетерологичный фрагмент (H1) и линкер VWF, соединяющий белок VWF и гетерологичный фрагмент (H1), и вторую полипептидную цепь, содержащую белок FVIII и последовательность XTEN, при этом линкер VWF в первой полипептидной цепи содержит: (i) область a2 из FVIII; (ii) область a1 из FVIII; (iii) область a3 из FVIII; (iv) сайт расщепления тромбином, содержащий X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любую их комбинацию, и при этом первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь ассоциированы друг с другом. В одном варианте реализации изобретения последовательность XTEN присоединена к N-концу или C-концу белка FVIII или вставлена между двумя соседними аминокислотами FVIII. В другом варианте реализации изобретения химерная молекула дополнительно содержит дополнительную последовательность XTEN, которая связана с белком VWF, гетерологичным фрагментом, линкером VWF или любой их комбинацией. В других вариантах реализации изобретения химерная молекула дополнительно содержит второй гетерологичный фрагмент (H2). В еще одних вариантах реализации изобретения второй гетерологичный фрагмент соединен с белком FVIII, последовательностью XTEN или обоими.

Для химерных молекул, в соответствии с настоящим изобретением, последовательность XTEN, соединенная с белком VWF, линкером VWF, белком FVIII или любыми другими компонентами в химерных молекулах, содержит около 42 аминокислот, около 72 аминокислот, около 108 аминокислот, около 144 аминокислот, около 180 аминокислот, около 216 аминокислот, около 252 аминокислот, около 288 аминокислот, около 324 аминокислот, около 360 аминокислот, около 396 аминокислот, около 432 аминокислот, около 468 аминокислот, около 504 аминокислот, около 540 аминокислот, около 576 аминокислот, около 612 аминокислот, около 624 аминокислот, около 648 аминокислот, около 684 аминокислот, около 720 ами-

нокислот, около 756 аминокислот, около 792 аминокислот, около 828 аминокислот, около 836 аминокислот, около 864 аминокислот, около 875 аминокислот, около 912 аминокислот, около 923 аминокислот, около 948 аминокислот, около 1044 аминокислот, около 1140 аминокислот, около 1236 аминокислот, около 1318 аминокислот, около 1332 аминокислот, около 1428 аминокислот, около 1524 аминокислот, около 1620 аминокислот, около 1716 аминокислот, около 1812 аминокислот, около 1908 аминокислот или около 2004 аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептид XTEN выбирают из AE42, AE72, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288 или AG144. В других вариантах реализации изобретения полипептид XTEN выбирают из SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 47; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 48; SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 42.

В других аспектах дополнительная последовательность XTEN в химерных молекулах содержит около 42 аминокислот, около 72 аминокислот, около 108 аминокислот, около 144 аминокислот, около 180 аминокислот, около 216 аминокислот, около 252 аминокислот, около 288 аминокислот, около 324 аминокислот, около 360 аминокислот, около 396 аминокислот, около 432 аминокислоты, около 468 аминокислот, около 504 аминокислоты, около 540 аминокислот, около 576 аминокислот, около 612 аминокислот, около 624 аминокислот, около 648 аминокислот, около 684 аминокислот, около 720 аминокислот, около 756 аминокислот, около 792 аминокислот, около 828 аминокислот, около 836 аминокислот, около 864 аминокислоты, около 875 аминокислот, около 912 аминокислот, около 923 аминокислот, около 948 аминокислот, около 1044 аминокислот, около 1140 аминокислот, около 1236 аминокислот, около 1318 аминокислот, около 1332 аминокислот, около 1428 аминокислот, около 1524 аминокислот, около 1620 аминокислот, около 1716 аминокислот, около 1812 аминокислот, около 1908 аминокислот или около 2004 аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный полипептид XTEN выбирают из AE42, AE72, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288, или AG144. В определенных вариантах реализации изобретения дополнительный полипептид XTEN выбирают из SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 47; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 48; SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 42.

В одном варианте реализации изобретения линкер VWF, пригодный для соединяющего белка VWF и гетерологичного фрагмента в химерных молекулах, содержит область a2, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80, около 85, около 90, около 95 или 100% идентичную участку от Glu720 до Arg740, соответствующему полноразмерному FVIII, при этом область a2 способна расщепляться тромбином. В конкретном варианте реализации изобретения область a2 содержит ISDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRFS (SEQ ID NO: 4). В другом варианте реализации изобретения линкер VWF, пригодный для соединяющего белка VWF и гетерологичного фрагмента, содержит область a1, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80, около 85, около 90, около 95 или 100% идентичную участку от Met337 до Arg372, соответствующему полноразмерному FVIII, при этом область a1 способна расщепляться тромбином. В некоторых вариантах реализации изобретения область a1 содержит ISMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPFIQIRSV (SEQ ID NO: 5). В других вариантах реализации изобретения линкер VWF, пригодный для соединяющего белка VWF и гетерологичного фрагмента, содержит область a3, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80, около 85, около 90, около 95 или 100% идентичную участку от Glu1649 до Arg1689, соответствующему полноразмерному FVIII, при этом область a3 способна расщепляться тромбином. В конкретном варианте реализации изобретения область a3 содержит ISEITRTTLQSDQEErYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQ (SEQ ID NO: 6). В еще одних вариантах реализации изобретения линкер VWF, пригодный для соединяющего белка VWF и гетерологичного фрагмента, содержит сайт расщепления тромбином, содержащий X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, при этом мотив экзосайта взаимодействия PAR1 содержит S-F-L-L-R-N (SEQ ID NO: 7). В одном варианте реализации изобретения мотив экзосайта взаимодействия PAR1 дополнительно содержит последовательность, выбранную из P, P-N, P-N-D, P-N-D-K (SEQ ID NO: 8), P-N-D-K-Y (SEQ ID NO: 9), P-N-D-K-Y-E (SEQ ID NO: 10), P-N-D-K-Y-E-P (SEQ ID NO: 11), P-N-D-K-Y-E-P-F (SEQ ID NO: 12), P-N-D-K-Y-E-P-F-W (SEQ ID NO: 13), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E (SEQ ID NO: 14), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D (SEQ ID NO: 20), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D-E (SEQ ID NO: 21), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D-E-E (SEQ ID NO: 22), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D-E-E-S (SEQ ID NO: 23) или любой их комбинации. В другом варианте реализации изобретения алифатическую аминокислоту выбирают из глицина, аланина, валина, лейцина или изолейцина. В конкретном варианте реализации изобретения линкер VWF содержит GGLVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEES (SEQ ID NO: 24). В определенных вариантах реализации изобретения тромбин расщепляет линкер VWF быстрее, чем тромбин расщеплял бы сайт расщепления тромбином, если бы сайт расщепления тромбином замещал линкер VWF в химерной молекуле. В других вариантах реализации изобретения тромбин расщепляет линкер VWF по меньшей мере в около 10 раз, по меньшей мере в около 20 раз, по меньшей мере в около 30 раз, по меньшей мере в около 40 раз, по меньшей мере в около 50 раз, по меньшей мере в около 60 раз, по меньшей мере в около 70 раз, по меньшей мере в около 80 раз, по меньшей мере в около 90 раз или по меньшей мере в около 100 раз быстрее, чем тромбин расщеплял бы сайт расщепления тромбином, если бы сайт расщепления тромбином замещал линкер VWF в химерной молекуле.

В некоторых вариантах реализации изобретения линкер VWF дополнительно содержит одну или более аминокислот и имеет длину по меньшей мере около 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 или 2000 аминокислот. В одном примере одна или более аминокислот содержат пептид gly. В другом примере одна или более аминокислот содержат GlyGly. В других примерах одна или более аминокислот содержат пептид gly/ser. В некоторых примерах пептид gly/ser имеет формулу  $(Gly_4Ser)_n$  или  $S(Gly_4Ser)_n$ , где n обозначает положительное целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 100. В определенных примерах линкер  $(Gly_4Ser)_n$  представляет собой  $(Gly_4Ser)_3$  (SEQ ID NO: 89) или  $(Gly_4Ser)_4$  (SEQ ID NO: 90).

Белок VWF, пригодный для химерной молекулы по изобретению, может содержать домен D' и домен D3 VWF, где домен D' и домен D3 способны связываться с белком FVIII. В одном варианте реализации изобретения домен D' белка VWF содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотам 764-866 SEQ ID NO: 2. В другом варианте реализации изобретения домен D3 белка VWF содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотам 867-1240 SEQ ID NO: 2. В других вариантах реализации изобретения белок VWF содержит по меньшей мере одно аминокислотное замещение в остатке, соответствующем остатку 1099, остатку 1142, или обоим остаткам 1099 и 1142 SEQ ID NO: 2. В еще одних вариантах реализации изобретения в последовательности белка VWF, аминокислота, отличная от цистеина, замещает остаток, соответствующий остатку 1099, остатку 1142 или обоим остаткам 1099 и 1142 SEQ ID NO: 2. В других вариантах реализации изобретения последовательность белка VWF содержит аминокислоты 764-1240 SEQ ID NO: 2. В определенных вариантах реализации изобретения белок VWF дополнительно содержит домен D1, домен D2, или домены D1 и D2 VWF. В некоторых вариантах реализации изобретения белок VWF дополнительно содержит домен VWF, выбранный из домена A1, домена A2, домена A3, домена D4, домена B1, домена B2, домена B3, домена C1, домена C2, домена CK, одного или более их фрагментов, или любых их комбинаций. В других вариантах реализации изобретения белок VWF состоит, по существу, из или состоит из: (1) доменов D' и D3 VWF или их фрагментов; (2) доменов D1, D' и D3 VWF или их фрагментов; (3) доменов D2, D' и D3 VWF или их фрагментов; (4) доменов D1, D2, D' и D3 VWF или их фрагментов; или (5) доменов D1, D2, D', D3 и A1 VWF или их фрагментов. В еще одних вариантах реализации изобретения белок VWF дополнительно содержит сигнальный пептид VWF. В других вариантах реализации изобретения белок VWF является пегилированным, гликозилированным, гэккилированным (гидроксиэтилкрахмал-конъюгированным) или полисиалилированным. Термин "пегилированный" относится к наличию полиэтиленгликоля (ПЭГ), присоединенного к белку; термин "гликозилированный" относится к наличию гликозилирования белка; термин "гэккилированный" относится к наличию гидроксиэтилкрахмала (ГЭК), присоединенного к белку; и термин "полисиалилированный" относится к наличию полисиаловой кислоты (ПСК), присоединенной к белку. Примеры ПЭГ, ГЭК и ПСК приведены в других разделах данного документа.

В некоторых аспектах гетерологичный фрагмент (H1), соединенный с белком VWF с помощью линкера VWF, способен увеличивать период полувыведения химерной молекулы. В одном варианте реализации изобретения гетерологичный фрагмент (H1) содержит константную область иммуноглобулина или ее участок, альбумин, альбуминсвязывающий фрагмент, PAS, НАР, трансферрин или его фрагмент, полиэтиленгликоль (ПЭГ), гидроксиэтилкрахмал (ГЭК), ПСК, С-концевой пептид (СТР)  $\beta$ -субъединицы хорионического гонадотропина человека, или любую их комбинацию. В другом варианте реализации изобретения гетерологичный фрагмент содержит партнера связывания FcRn. В других вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент содержит Fc-область. В других вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент (H1) содержит клиренс-рецептор, или его фрагмент, причем клиренс-рецептор блокирует связывание белка FVIII с клиренс-рецепторами FVIII. В некоторых вариантах реализации изобретения клиренс-рецептор представляет собой рецептор липопротеинов низкой плотности - связанный белок 1 (LRP1) или его FVIII-связывающий фрагмент. В некоторых аспектах второй гетерологичный фрагмент, соединенный с белком FVIII через необязательный линкер FVIII, содержит константную область иммуноглобулина или ее участок, альбумин, альбумин-связывающий полипептид, PAS, С-концевой пептид (СТР)  $\beta$ -субъединицы хорионического гонадотропина человека, полиэтиленгликоль (ПЭГ), гидроксиэтилкрахмал (ГЭК), альбумин-связывающие малые молекулы, или любые их комбинации. В одном варианте реализации изобретения второй гетерологичный фрагмент (H2) способен увеличивать период полувыведения белка FVIII. В другом варианте реализации изобретения второй гетерологичный фрагмент (H2) содержит полипептид, неполипептидный фрагмент, или оба. В другом варианте реализации изобретения второй гетерологичный фрагмент (H2) содержит константную область иммуноглобулина или ее участок. В еще одних вариантах реализации изобретения второй гетерологичный фрагмент содержит партнер связывания FcRn. В других вариантах реализации изобретения второй гетерологичный фрагмент содержит вторую Fc-область. В некоторых вариантах реализации изобретения

первый гетерологичный фрагмент, соединенный с белком VWF с помощью линкера VWF, и второй гетерологичный фрагмент, соединенный с белком FVIII с помощью необязательного линкера, в котором последовательность XTEN связана с любым из компонентов, ассоциированы друг с другом. В одном варианте реализации изобретения ассоциация между первой полипептидной цепью и вторым полипептидом обозначает ковалентную связь. В другом варианте реализации изобретения ассоциация между первым гетерологичным фрагментом и вторым гетерологичным фрагментом представляет собой дисульфидную связь. В других вариантах реализации изобретения первый гетерологичный фрагмент является партнером связывания FcRn и второй гетерологичный фрагмент является партнером связывания FcRn. В еще одних вариантах реализации изобретения первый гетерологичный фрагмент является Fc-областью и второй гетерологичный фрагмент является Fc-областью.

В определенных вариантах реализации изобретения белок FVIII соединен со вторым гетерологичным фрагментом с помощью линкера FVIII. В одном варианте реализации изобретения второй линкер представляет собой расщепляемый линкер. В другом варианте реализации изобретения линкер FVIII идентичен линкеру VWF. В других вариантах реализации изобретения линкер FVIII отличается от линкера VWF. В некоторых аспектах химерная молекула по изобретению имеет формулу, выбранную из: (a) V-L1-X1-H1:H2-L2-X2-C; (b) V-X1-L1-H1:H2-L2-X2-C; (c) V-L1-X1-H1:H2-X2-L2-C; (d) V-X1-L1-H1:H2-X2-L2-C; (e) V-L1-X1-H1: H2-L2-C(X2); (f) V-X1-L1-H1:H2-L2-C(X2); (g) C-X2-L2-H2:H1-X1-L1-V; (h) C-X2-L2-H2:H1-L1-X1-V; (i) C-L2-X2-H2:H1-L1-X1-V; (j) C-L2-X2-H2:H1-L1-X1-V; (k) C(X2)-L2-H2:H1-X1-L1-V; или (l) C(X2)-L2-H2:H1-L1-X1-V; где V обозначает белок VWF; L1 обозначает линкер VWF; L2 обозначает необязательный линкер FVIII; H1 представляет собой первый гетерологичный фрагмент; H2 обозначает второй гетерологичный фрагмент; X1 обозначает последовательность XTEN; X2 обозначает необязательную последовательность XTEN; C обозначает белок FVIII; C(X2) обозначает белок FVIII, слитый с последовательностью XTEN, причем последовательность XTEN вставлена между двумя соседними аминокислотами FVIII; (-) обозначает пептидную связь или одну или более аминокислот; и (:) обозначает ковалентную связь между H1 и H2.

В других аспектах химерная молекула имеет формулу, выбранную из: (a) V-L1-X1-H1: H2-L2-X2-C; (b) V-X1-L1-H1: H2-L2-X2-C; (c) V-L1-X1-H1: H2-X2-L2-C; (d) V-X1-L1-H1: H2-X2-L2-C; (e) V-L1-X1-H1: H2-L2-C(X2); (f) V-X1-L1-H1: H2-L2-C(X2); (g) C-X2-L2-H2: H1-X1-L1-V; (h) C-X2-L2-H2: H1-L1-X1-V; (i) C-L2-X2-H2:H1-L1-X1-V; (j) C-L2-X2-H2:H1-L1-X1-V; (k) C(X2)-L2-H2:H1-X1-L1-V; или (l) C(X2)-L2-H2:H1-L1-X1-V; где V обозначает белок VWF; L1 обозначает линкер VWF; L2 обозначает необязательный линкер FVIII; H1 обозначает первый гетерологичный фрагмент; H2 обозначает второй гетерологичный фрагмент; X1 обозначает необязательную последовательность XTEN; X2 обозначает последовательность XTEN; C обозначает белок FVIII; C(X2) обозначает белок FVIII, слитый с последовательностью XTEN, причем последовательность XTEN вставлена между двумя соседними аминокислотами FVIII; (-) обозначает пептидную связь или одну или более аминокислот; и (:) обозначает ковалентную связь между H1 и H2. В химерных молекулах по изобретению белок VWF может ингибировать или предотвращать связывание эндогенного VWF с белком FVIII.

В определенных аспектах белок FVIII в химерных молекулах может содержать третий гетерологичный фрагмент (H3). Третий гетерологичный фрагмент (H3) может быть последовательностью XTEN. В других аспектах белок FVIII содержит четвертый гетерологичный фрагмент (H4). Четвертый гетерологичный фрагмент (H4) может быть последовательностью XTEN. В некоторых аспектах, белок FVIII содержит пятый гетерологичный фрагмент (H5). Пятый гетерологичный фрагмент может быть последовательностью XTEN. В других аспектах, белок FVIII содержит шестой гетерологичный фрагмент (H6). Шестой гетерологичный фрагмент может быть последовательностью XTEN. В определенных аспектах, один или более из третьего гетерологичного фрагмента (H3), четвертого гетерологичного фрагмента (H4), пятого гетерологичного фрагмента (H5) и шестого гетерологичного фрагмента (H6) способны увеличивать период полувыведения химерной молекулы. В других аспектах, третий гетерологичный фрагмент (H3), четвертый гетерологичный фрагмент (H4), пятый гетерологичный фрагмент (H5) и шестой гетерологичный фрагмент (H6) присоединены к С-концу или N-концу FVIII или вставлены между двумя аминокислотами белка FVIII. В других аспектах один или более из третьего гетерологичного фрагмента, четвертого гетерологичного фрагмента, пятого гетерологичного фрагмента и шестого гетерологичного фрагмента содержат отрезок, выбранный из одного или более из около 42 аминокислот, около 72 аминокислот, около 108 аминокислот, около 144 аминокислот, около 180 аминокислот, около 216 аминокислот, около 252 аминокислот, около 288 аминокислот, около 324 аминокислот, около 360 аминокислот, около 396 аминокислот, около 432 аминокислот, около 468 аминокислот, около 504 аминокислот, около 540 аминокислот, около 576 аминокислот, около 612 аминокислот, около 624 аминокислот, около 648 аминокислот, около 684 аминокислот, около 720 аминокислот, около 756 аминокислот, около 792 аминокислот, около 828 аминокислот, около 836 аминокислот, около 864 аминокислот, около 875 аминокислот, около 912 аминокислот, около 923 аминокислот, около 948 аминокислот, около 1044 аминокислот, около 1140 аминокислот, около 1236 аминокислот, около 1318 аминокислот, около 1332 аминокислот, около 1428 аминокислот, около 1524 аминокислот, около 1620 аминокислот, около 1716 аминокислот, около 1812 аминокислот, около 1908 аминокислот или около 2004 аминокислот. Например, последовательность

XTEN третьего гетерологического фрагмента, четвертого гетерологического фрагмента, пятого гетерологического фрагмента или шестого гетерологического фрагмента может быть выбрана из AE42, AE72, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288 или AG144. В частности последовательность XTEN может быть выбрана из SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 47; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 48; SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 42. В определенных вариантах реализации изобретения период полувыведения химерной молекулы увеличивается по меньшей мере в около 1,5 раза, по меньшей мере в около 2 раза, по меньшей мере в около 2,5 раза, по меньшей мере в около 3 раза, по меньшей мере в около 4 раза, по меньшей мере в около 5 раз, по меньшей мере в около 6 раз, по меньшей мере в около 7 раз, по меньшей мере в около 8 раз, по меньшей мере в около 9 раз, по меньшей мере в около 10 раз, по меньшей мере в около 11 раз или по меньшей мере в около 12 раз по сравнению с FVIII дикого типа.

Настоящее описание также предусматривает полинуклеотид или набор полинуклеотидов, кодирующих химерную молекулу или ее комплементарную последовательность. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов может дополнительно содержать полинуклеотидную цепь, которая кодирует PC5 или PC7.

Также включен вектор или набор векторов, содержащих полинуклеотид или набор полинуклеотидов и один или более промоторов, функционально связанных с полинуклеотидом или набором полинуклеотидов. В некоторых вариантах реализации изобретения вектор или набор векторов могут дополнительно содержать дополнительную полинуклеотидную цепь, кодирующую PC5 или PC7.

Настоящее изобретение также включает клетку-хозяина, содержащую полинуклеотид или набор полинуклеотидов или вектор или набор векторов. В одном варианте реализации изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. В другом варианте реализации изобретения клетку-хозяина выбирают из клетки HEK293, клетки CHO или клетки ВНК.

В некоторых аспектах изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую химерную молекулу, раскрытую в данном документе, полинуклеотид или набор полинуклеотидов, кодирующих химерную молекулу, вектор или набор векторов, содержащих полинуклеотид или набор полинуклеотидов, или клетку-хозяина, раскрытую в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В одном варианте реализации изобретения химерная молекула в композиции имеет увеличенный период полувыведения по сравнению с белком FVIII дикого типа. В другом варианте реализации изобретения период полувыведения химерной молекулы в композиции увеличен по меньшей мере в около 1,5 раза, по меньшей мере в около 2 раза, по меньшей мере в около 2,5 раза, по меньшей мере в около 3 раза, по меньшей мере в около 4 раза, по меньшей мере в около 5 раз, по меньшей мере в около 6 раз, по меньшей мере в около 7 раз, по меньшей мере в около 8 раз, по меньшей мере в около 9 раз, по меньшей мере в около 10 раз, по меньшей мере в около 11 раз или по меньшей мере в около 12 раз по сравнению с FVIII дикого типа.

Также включен способ снижения частоты или тяжести эпизода кровотечения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества химерной молекулы, раскрытой в данном документе, полинуклеотида или набора полинуклеотидов, кодирующих химерную молекулу, вектора или набора векторов, раскрытых в данном документе, клетки-хозяина, раскрытой в данном документе, или композиции, раскрытой в данном документе. Изобретение также включает способ предотвращения возникновения эпизода кровотечения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества химерной молекулы, раскрытой в данном документе, полинуклеотида или набора полинуклеотидов, кодирующих химерную молекулу, вектора или набора векторов, раскрытых в данном документе, клетки-хозяина, раскрытой в данном документе, или композиции, раскрытой в данном документе. В одном варианте реализации изобретения эпизод кровотечения выбирают из нарушения свертываемости крови, гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения в ротовой полости, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в полости рта, травмы, повреждения черепа (trauma capitis), желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома кости, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве, кровоизлияния во влагалище подвздошно-поясничной мышцы, или любых их комбинаций. В другом варианте реализации изобретения химерная молекула, раскрытая в данном документе, полинуклеотид или набор полинуклеотидов, кодирующих химерную молекулу, вектор или набор векторов, раскрытых в данном документе, клетка-хозяин, раскрытая в данном документе, или композиция, раскрытая в данном документе, могут быть введены путем, выбранным из местного введения, внутриглазного введения, парентерального введения, интратекального введения, субдурального введения, перорального введения или любых их комбинаций.

Настоящее описание также включает способ получения химерной молекулы, включающий трансфекцию одной или более клеток-хозяев полинуклеотидом, раскрытым в данном документе, или вектором, раскрытым в данном документе, и экспрессию химерной молекулы в клетке-хозяине. Способ дополнительно включает выделение химерной молекулы. В некоторых вариантах реализации изобретения активность химерной молекулы по отношению к FVIII может быть измерена путем анализа активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) или методом ротационной тромбоэластометрии (ROTEM).

### Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 иллюстрирует примерную схему химерной молекулы (FVIII-XTEN/гетеродимер VWF), содержащей две полипептидные цепи - первую цепь, содержащую белок VWF (например, домен D' и домен D3 VWF) соединенный с Fc-областью с помощью расщепляемого тромбином линкера VWF, и вторую цепь, содержащую белок FVIII, соединенный со второй Fc-областью с помощью линкера FVIII. Белок FVIII содержит один или более XTEN в разных доменах FVIII.

Фиг. 2 иллюстрирует разные конструкторы VWF, причем каждый конструктор содержит домен D' и домен D3, соединенные с Fc-областью с помощью расщепляемого тромбином линкера VWF, за исключением контроля (т.е. VWF-052). VWF-031 содержит линкер из 48 аминокислот, включающий сайт расщепления тромбином L-V-P-R (SEQ ID NO: 25). VWF-034 содержит последовательность XTEN, состоящую из 288 аминокислот, и линкер из 35 аминокислот, включающий сайт расщепления тромбином L-V-P-R (SEQ ID NO: 25). VWF-035 содержит линкер из 73 аминокислот, включающий сайт расщепления тромбином L-V-P-R (SEQ ID NO: 25). VWF-039 содержит линкер из 98 аминокислот, включающий сайт расщепления тромбином L-V-P-R (SEQ ID NO: 25) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1. VWF-051 содержит линкер из 54 аминокислот, включающий сайт расщепления тромбином A-L-R-P-R-V-V (SEQ ID NO: 26). VWF-052 содержит линкер из 48 аминокислоты без какого-либо сайта расщепления тромбином (контроль). VWF-054 содержит линкер VWF из 40 аминокислот, включающий область a1 FVIII. VWF-055 содержит линкер VWF из 34 аминокислот, включающий область a2 FVIII. VWF-056 содержит линкер VWF из 46 аминокислот, включающий область a3 FVIII.

Фиг. 3A иллюстрирует скорость тромбин-медируемого расщепления в единицах сдвига положения резонанса за секунду (RU/s) как функцию плотности захвата в единицах RU для слитых конструкторов VWF-Fc, т.е. VWF-031, VWF-034, VWF-036, VWF-039, VWF-051 и VWF-052.

Фиг. 3B иллюстрирует скорость тромбин-медируемого расщепления в единицах сдвига положения резонанса за секунду (RU/s) как функцию плотности захвата в единицах RU для слитых конструкторов VWF-Fc, т.е. VWF-031, VWF-034, VWF-036, VWF-051 и VWF-052. В этих экспериментах, каждый слитый конструктор VWF-Fc захватывался при разных плотностях и затем подвергался воздействию фиксированной концентрации альфа-тромбина человека. Наклон каждой кривой на фиг. 3A и 3B непосредственно отображает восприимчивость каждого конструктора к расщеплению тромбином.

Фиг. 4A иллюстрирует скорость тромбин-медируемого расщепления в единицах сдвига положения резонанса за секунду (RU/s) как функцию плотности захвата в единицах RU для слитых конструкторов VWF-Fc, т.е. VWF-054, VWF-055 и VWF-056.

Фиг. 4B иллюстрирует скорость тромбин-медируемого расщепления в единицах сдвига положения резонанса за секунду (RU/s) как функцию плотности захвата в единицах RU для слитых конструкторов VWF-Fc, т.е. VWF-031, VWF-039, VWF-054, VWF-055 и VWF-056. В этих экспериментах каждый слитый конструктор VWF-Fc захватывался при разных плотностях и затем подвергался воздействию фиксированной концентрации альфа-тромбина человека. Наклон каждой кривой на фиг. 4A и 4B непосредственно отображает восприимчивость каждого конструктора к расщеплению тромбином.

Фиг. 5 иллюстрирует результаты линейного регрессионного анализа с целью определения восприимчивости различных конструкторов VWF-Fc - VWF-031, VWF-034, VWF-036, VWF-039, VWF-051, VWF-052, VWF-054, VWF-055 и VWF-056 - к тромбин-медируемому расщеплению. Значения величин выражены в обратных секундах и отображают наклоны кривых, проиллюстрированных на фиг. 3 и 4. Относительную восприимчивость двух разных конструкторов определяют как частное от деления значений их соответствующих наклонов. Отношение  $\text{наклон}_{\text{VWF-039}}/\text{наклон}_{\text{VWF-031}}$  равно 71, указывая на то, что слитый конструктор VWF-Fc VWF-039 является в 71 раз более чувствительным к тромбин-медируемому расщеплению, чем VWF-031. Отношение  $\text{наклон}_{\text{VWF-055}}/\text{наклон}_{\text{VWF-031}}$  равно 65, и отношение  $\text{наклон}_{\text{VWF-051}}/\text{наклон}_{\text{VWF-031}}$  равно 1,8.

Фиг. 6 иллюстрирует время свертывания для различных химерных молекул у НемА-пациента, измеренное путем анализа цельной крови методом ROTEM. FVIII155/VWF-031 содержит две полипептидные цепи - первую цепь, содержащую BDD FVIII, соединенный с Fc-областью, и вторую цепь, содержащую домен D' и домен D3 VWF, соединенные с Fc-областью через минимальный сайт расщепления тромбином (т.е. L-V-P-R (SEQ ID NO: 25)). FVIII155/VWF-039 содержит две полипептидные цепи - первую цепь, содержащую BDD FVIII, соединенный с Fc-областью, и вторую цепь, содержащую домен D' и домен D3 VWF, соединенные с Fc-областью с помощью линкера VWF, содержащего L-V-P-R (SEQ ID NO: 25) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1. FVIII155/VWF-055 содержит две полипептидные цепи - первую цепь, содержащую BDD FVIII, соединенный с Fc-областью, и вторую цепь, содержащую домен D' и домен D3 VWF, соединенные с Fc-областью с помощью линкера VWF, содержащего область a2 из FVIII.

Фиг. 7 иллюстрирует схему типичного гетеродимера FVIII-VWF и конструкторов FVIII169, FVIII286, VWF057, VWF059 и VWF062. Например, конструктор FVIII169 содержит белок FVIII с делецией В-домена с замещением R1648A, соединенный с Fc-областью, в котором последовательность XTEN (например, AE288) вставлена в положении аминокислоты 745, что соответствует зрелому полноразмерному FVIII

(A1-a1-A2-a2-288XTEN-a3-A3-C1-C2-Fc). Конструкт FVIII286 содержит белок FVIII с делецией В-домена с замещением R1648, соединенный с Fc-областью, в котором последовательность XTEN (например, AE288) вставлена в положение аминокислоты 745, что соответствует зрелому полноразмерному FVIII, с дополнительной областью a2 между FVIII и Fc (A1-a1-A2-a2-288XTEN-a3-A3-C1-C2-a2-Fc). VWF057 представляет собой слитый конструкт VWF-Fc, содержащий домен D'D3 белка VWF (с двумя аминокислотными замещениями в домене D'D3, т.е. C336A и C379A), связанный с Fc-областью с помощью линкера VWF, который содержит тромбиновый сайт LVPR ("LVPR") и GS-линкер ("GS"), при этом последовательность XTEN (т.е. 144XTEN) вставлена между доменом D'D3 и линкером VWF (D'D3-144XTEN-GS+LVPR-Fc). VWF059 представляет собой слитый конструкт VWF-Fc, содержащий домен D'D3 белка VWF (с двумя аминокислотными замещениями в домене D'D3, т.е. C336A и C379A), связанный с Fc-областью с помощью участка кислотной области 2 (a2) в качестве линкера VWF, при этом последовательность XTEN вставлена между доменом D'D3 и линкером VWF. VWF062 представляет собой слитый конструкт VWF-Fc, содержащий домен D'D3 белка VWF (с двумя аминокислотными замещениями в домене D'D3, т.е. C336A и C379A), связанный с Fc-областью, при этом последовательность XTEN вставлена между доменом D'D3 и Fc-областью (D'D3-144XTEN-Fc).

Фиг. 8 иллюстрирует острую эффективность гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc/D'D3-линкер-Fc (т.е. FVIII169/VWF034, FVIII169/VWF059 и FVIII169/VWF057), по сравнению с FVIII с делецией В-домена ("SQ BDD FVIII" или "BDD-rFVIII") или контрольным носителем в модели НемА-мышей со срезанным кончиком хвоста. BDD-rFVIII обозначен кружками, и FVIII169/VWF034 обозначен квадратами, FVIII169/VWF059 обозначен треугольниками, FVIII169/VWF057 обозначен незакрашенными кружками, и носитель обозначен перевернутыми треугольниками. VWF034 представляет собой слитый конструкт VWF-Fc, который содержит Fc-область, соединенную с доменом D' и доменом D3 VWF с помощью линкера VWF, содержащий LVPR, при этом последовательность XTEN (т.е. 288XTEN) вставлена между доменом D'D3 и линкером VWF (D'D3-288XTEN-LVPR-Fc). Подробное описание конструктов FVIII169, VWF059 и VWF057 приведено в других разделах данного документа. Медианная потеря крови (мкл) у мышей после введения дозы 75 МЕ/кг конструкта в каждой экспериментальной группе показана горизонтальными линиями.

#### Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение касается химерной молекулы, содержащей последовательность XTEN и расщепляемый тромбином линкер, соединяющий белок VWF или белок FVIII с гетерологичным фрагментом, например фрагментом, увеличивающим период полувыведения. Изобретение также предусматривает химерную молекулу, содержащую две полипептидные цепи - первую цепь, содержащую белок VWF, связанный с гетерологичным фрагментом, и вторую цепь, содержащую белок FVIII и второй гетерологичный фрагмент, причем химерная молекула содержит последовательность XTEN в первой или второй полипептидных цепях, и или белок VWF, или белок FVIII (или оба) связаны с гетерологичным фрагментом с помощью линкера VWF или линкера FVIII (или обоих). Расщепляемый тромбином линкер (линкер VWF или линкер FVIII) может эффективно расщепляться тромбином в месте повреждения, где тромбин является легкодоступным. Типичные примеры химерных молекул проиллюстрированы в настоящем описании и фигурах. В некоторых вариантах реализации изобретения изобретение относится к химерным молекулам, имеющим структуры, представленные, например, на фиг. 1-7. В других вариантах реализации изобретения изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему конструкты химерных молекул, раскрытые в данном документе.

Для обеспечения четкого понимания описания и формулы изобретения, ниже приводятся следующие определения.

#### I. Определения.

Следует отметить, что объекты, описываемые в единственном числе, относятся к одному или более указанным объектам; например, подразумевается, что "нуклеотидная последовательность" обозначает одну или более нуклеотидных последовательностей. По существу, термины в единственном числе, "один или более", и "по меньшей мере один" могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо. Термин "около" используется в данном документе в значениях приблизительно, ориентировочно, около или близко к. Когда термин "около" используется в сочетании с диапазоном числовых значений, он модифицирует этот диапазон путем расширения его границ до значений выше и ниже указанных числовых величин. В общем, термин "около" используется в данном документе для модификации числовой величины за счет отклонения ее на 10 процентов от указанного значения в большую или меньшую сторону (выше или ниже).

Термин "полинуклеотид" или "нуклеотид" рассматривается как охватывающий отдельно взятую нуклеиновую кислоту, а также множество нуклеиновых кислот, и относится к выделенной молекуле или конструкту нуклеиновой кислоты, например матричной РНК (мРНК) или плазмидной ДНК (пДНК). В определенных вариантах реализации изобретения полинуклеотид содержит обычную фосфодиэфирную связь или необычную связь (например, амидную связь, такую как присутствующую в пептидных нуклеиновых кислотах (ПНК)). Термин "нуклеиновая кислота" относится к любому или более сегментам нуклеиновой кислоты, например фрагментам ДНК или РНК, присутствующим в полинуклеотиде.



Под "выделенной" нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом подразумевается молекула нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, извлеченная из ее естественного окружения. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий полипептид фактора VIII, содержащийся в векторе, считается выделенным в целях настоящего изобретения. Дополнительные примеры выделенного полинуклеотида включают рекомбинантные полинуклеотиды, поддерживаемые в гетерологичных клетках-хозяевах или очищенные (частично или в значительной степени) от других полинуклеотидов в растворе. Выделенные молекулы РНК включают *in vivo* или *in vitro* РНК-транскрипты полинуклеотидов по настоящему изобретению. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты в соответствии с настоящим изобретением дополнительно включают такие молекулы, полученные путем синтеза. Кроме того, полинуклеотид или нуклеиновая кислота могут включать регуляторные элементы, такие как промоторы, энхансеры, сайты связывания рибосом или сигналы терминации транскрипции.

В используемом в данном документе значении "кодирующая область" или "кодирующая последовательность" представляет собой участок полинуклеотида, который состоит из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Хотя "стоп-кодон" (TAG, TGA или TAA) типично не транслируется в аминокислоту, он может считаться частью кодирующей области, но любые фланкирующие последовательности, например промоторы, сайты связывания рибосом, терминаторы транскрипции, интроны и т.п., не являются частью кодирующей области. Границы кодирующей области типично определяются старт-кодоном на 5'-конце, кодирующим аминоконец образующегося полипептида, и кодоном терминации трансляции на 3'-конце, кодирующим карбоксильный конец образующегося полипептида. Две или больше кодирующих областей по настоящему изобретению может присутствовать в одном полинуклеотидном конструкте, например в одном векторе или в отдельных полинуклеотидных конструктах, например в отдельных (разных) векторах. Отсюда следует, что один вектор может содержать только одну кодирующую область, или могут содержать две или больше кодирующих областей, например один вектор может отдельно кодировать первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь химерной молекулы, как описано ниже. Кроме того, вектор, полинуклеотид, или нуклеиновая кислота по изобретению могут кодировать гетерологичные кодирующие области, слитые или неслитые с нуклеиновой кислотой, кодирующей химерную молекулу по изобретению. Гетерологичные кодирующие области включают, без ограничений, специализированные элементы или мотивы, такие как секреторный сигнальный пептид или гетерологичный функциональный домен.

Определенные белки, секретируемые клетками млекопитающего, ассоциированы с секреторным сигнальным пептидом, который отщепляется от зрелого белка после инициации экспорта растущей белковой цепи через шероховатую эндоплазматическую сеть. Рядовые специалисты в данной области техники знают, что сигнальные пептиды обычно присоединены к N-концу полипептида и отщепляются от полного или "полноразмерного" полипептида с образованием секретируемой или "зрелой" формы полипептида. В определенных вариантах реализации используется нативный сигнальный пептид, например сигнальный пептид FVIII или сигнальный пептид VWF, или функциональное производное такой последовательности, которое сохраняет способность направлять секрецию полипептида, функционально ассоциированного с ним. Альтернативно, может быть использован гетерологичный сигнальный пептид млекопитающего, например тканевый активатор плазминогена (ТРА) человека или сигнальный пептид  $\beta$ -глюкуронидазы мыши, или их функциональное производное. Термин "ниже по ходу транскрипции" относится к нуклеотидной последовательности, которая расположена по направлению к 3'-концу от референтной нуклеотидной последовательности. В определенных вариантах реализации изобретения ниже по ходу транскрипции нуклеотидной последовательности относится к последовательности, следующей за точкой начала транскрипции. Например, кодон инициации трансляции гена расположен ниже по ходу транскрипции от сайта начала транскрипции.

Термин "против хода транскрипции" относится к нуклеотидной последовательности, которая расположена по направлению к 5'-концу от референтной нуклеотидной последовательности. В определенных вариантах реализации изобретения расположенные против хода транскрипции нуклеотидные последовательности относятся к последовательностям, находящимся со стороны 5'-конца от кодирующей области или точки начала транскрипции. Например, большинство промоторов расположены в направлении против хода транскрипции от сайта начала транскрипции.

В используемом в данном документе значении термин "регуляторная область" относится к нуклеотидным последовательностям, которые расположены в направлении против хода транскрипции (5'-некодирующие последовательности), внутри, или ниже по ходу транскрипции (3'-некодирующие последовательности) от кодирующей области, и которые оказывают влияние на транскрипцию, процессинг РНК, стабильность, или трансляция ассоциированной кодирующей области. Регуляторные области могут включать промоторы, лидерные последовательности трансляции, интроны, последовательности распознавания полиаденилирования, сайты процессинга РНК, эффекторные сайты связывания и структуры стебель-петля. Если кодирующая область предназначена для экспрессии в эукариотической клетке, то сигнал полиаденилирования и последовательность терминации транскрипции будут обычно расположены по направлению к 3'-концу от кодирующей последовательности.

Полинуклеотид, который кодирует генный продукт, например полипептид, может включать промо-

тор и/или другие контрольные элементы транскрипции или трансляции, функционально ассоциированные с одной или более кодирующими областями. При функциональной ассоциации кодирующая область генного продукта, например полипептида, ассоциирована с одной или более регуляторными областями таким образом, чтобы поставить экспрессию генного продукта под влияние или контроль регуляторной области (областей). Например, кодирующая область и промотор являются "функционально ассоциированными", если индуцирование функции промотора приводит к транскрипции мРНК, кодирующей генный продукт, кодируемый кодирующей областью, и если природа связи между промотором и кодирующей областью не препятствует способности промотора направлять экспрессию генного продукта или не препятствует способности к транскрипции ДНК-матрицы. Другие контрольные элементы транскрипции, кроме промотора, например энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминации транскрипции, также могут быть функционально ассоциированы с кодирующей областью для направления экспрессии генного продукта.

Различные контрольные области транскрипции известны квалифицированным специалистам в данной области техники. Они включают, без ограничений, контрольные области транскрипции, которые функционируют в клетках позвоночных, такие как, без ограничений, промоторные и энхансерные сегменты цитомегаловирусов (непосредственный ранний промотор, в сочетании с интроном-А), вирус обезьян 40 (ранний промотор) и ретровирусы (такие как вирус саркомы Рауса). Другие контрольные области транскрипции включают области, выделенные из генов позвоночных, такие как актин, белок теплового шока, бычий гормон роста и  $\beta$ -глобин кролика, а также другие последовательности, способные контролировать экспрессию генов в эукариотических клетках. Дополнительно пригодные контрольные области транскрипции включают тканеспецифичные промоторы и энхансеры, а также лимфокин-индуцируемые промоторы (например, промоторы, индуцируемые интерферонами или интерлейкинами). Аналогично, различные контрольные элементы трансляции известны рядовым специалистам в данной области техники. Они включают, без ограничений, сайты связывания рибосом, кодоны инициации и терминации трансляции и элементы, выделенные из пикорнавирусов (в частности, внутренний рибосомо-связывающий сайт, или IRES, также называемый последовательностью CITE).

Термин "экспрессия" в используемом в данном документе значении относится к процессу, в котором полинуклеотид продуцирует генный продукт, например РНК или полипептид. Он включает, без ограничений, транскрипцию полинуклеотида в матричную РНК (мРНК), транспортную РНК (тРНК), малую шпилечную РНК (shРНК), малую интерферирующую РНК (siРНК) или любой другой РНК-продукт, и трансляцию мРНК в полипептид. Экспрессия дает "генный продукт". В используемом в данном документе значении генный продукт может быть или нуклеиновой кислотой, например матричной РНК, полученной в результате транскрипции гена или полипептида, который транслируется из транскрипта. Генные продукты, описанные в данном документе, дополнительно включают нуклеиновые кислоты с посттранскрипционными модификациями, например полиаденилированием или сплайсингом, или полипептиды с посттрансляционными модификациями, например метилированием, гликозилированием, добавлением липидов, ассоциацией 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 для осуществления репликации присоединенного сегмента. "Репликон" относится к любому генетическому элементу (например, плазмиде, фагу, космиде, хромосоме, вирусу), который функционирует в качестве автономной единицы репликации *in vivo*, т.е. способной к репликации под своим собственным контролем. Термин "вектор" включает 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 используется большое число векторов, включая, например, плазмиды, модифицированные эукариотические вирусы, или модифицированные бактериальные вирусы. Вставка полинуклеотида в пригодный вектор может быть осуществлена путем лигирования соответствующих полинуклеотидных фрагментов в выбранный вектор, имеющий комплементарные липкие концы.

Векторы могут быть подвергнуты генетическим модификациям с целью кодирования селективируемых маркеров или репортеров, которые обеспечивают селекцию или идентификацию клеток со включенным вектором. Экспрессия селективируемых маркеров или репортеров обеспечивает возможность идентификации и/или селекции клеток-хозяев, которые включают и экспрессируют другие кодирующие области, содержащиеся в векторе. Примеры генов селективируемых маркеров, известных и используемых в данной области техники, включают: гены, обеспечивающие стойкость к ампициллину, стрептомицину, гентамицину, канамицину, гиромоцину, гербициду биалафосу, сульфонамиду и т.п.; и гены, которые используют в качестве фенотипических маркеров, т.е. регуляторные гены антоцианина, ген изопентанил-трансферазы и т.п. Примеры репортеров, известных и используемых в данной области техники, включают: люциферазу (Luc), зеленый флуоресцентный белок (GFP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), -галактозидазу (LacZ), -глокуронидазу (Gus) и т.п. Селективируемые маркеры могут также считаться репортерами.

Термин "плаزمид" относится к внехромосомальному элементу, часто несущему ген, не являющийся-

ся частью центрального метаболизма клетки и обычно имеющий форму кольцевой двухцепочечной молекулы ДНК. Такие элементы могут быть автономно реплицирующимися последовательностями, геном-интегрирующимися последовательностями, фагом или нуклеотидными последовательностями, линейной, кольцевой или сверхспиральной, одно- или двухцепочечной ДНК или РНК, выделенными из любого источника, в котором ряд нуклеотидных последовательностей был соединен или рекомбинирован в уникальную конструкцию, способную вводить промоторный фрагмент и последовательность ДНК выбранного генного продукта вместе с соответствующей 3'-нетранслированной последовательностью в клетку.

Эукариотические вирусные векторы, которые могут быть использованы, включают, без ограничений, аденовирусные векторы, ретровирусные векторы, адено-ассоциированные вирусные векторы, поксвирус, например векторы на основе вируса коровьей оспы, бакуловирусные векторы или векторы на основе вируса герпеса. Невирусные векторы включают плазмиды, липосомы, электрически заряженные липиды (цитофектины), комплексы ДНК-белок и биополимеры.

"Клонирующий вектор" относится к "репликону", представляющему собой единичный отрезок нуклеиновой кислоты, который реплицируется последовательно, и который содержит точку начала репликации, такой как плаزمид, фаг или космида, к которому может быть присоединен другой сегмент нуклеиновой кислоты для осуществления репликации присоединенного сегмента. Определенные клонирующие векторы способны к репликации в одном типе клеток, например бактериях, и экспрессии в другом, например эукариотических клетках. Клонирование векторы типично содержат одну или более последовательностей, которые могут быть использованы для селекции клеток, содержащих вектор, и/или один или более множественных сайтов клонирования для вставки последовательностей нуклеиновой кислоты, представляющих интерес.

Термин "экспрессионный вектор" относится к носителю, сконструированному для обеспечения возможности экспрессии вставленной последовательности нуклеиновой кислоты после введения в клетку-хозяина. Вставленная последовательность нуклеиновой кислоты функционально ассоциируется с регуляторными областями, как описано выше.

Векторы вводятся в клетки-хозяева способами, хорошо известными в данной области техники, например трансфекцией, электропорацией, микроинъекцией, трансдукцией, слиянием клеток, с помощью DEAE-декстрана, осаждением фосфата кальция, липофекцией (слияние с лизосомами), с использованием генной пушки или вектора-переносчика ДНК.

"Культура", "культивировать" и "культивация", в используемом в данном документе значении, означают инкубирование клеток в условиях *in vitro*, обеспечивающих возможность роста или деления клеток или поддержание клеток в жизнеспособном состоянии. "Культивируемые клетки", в используемом в данном документе значении, означает клетки, размножающиеся *in vitro*.

В используемом в данном документе значении, термин "полипептид" рассматривается как охватывающий форму единственного числа "полипептид", а также форму множественного числа "полипептиды", и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислоты), линейно соединенных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" относится к любой цепи или цепям, состоящим из двух или более аминокислот, и не указывает на определенную длину продукта. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, "белок", "аминокислотная цепь" или любой другой термин, используемый для обозначения цепи или цепей, состоящих из двух или больше аминокислот, включены в определение "полипептида", и термин "полипептид" может быть использован вместо или взаимозаменяемо с любым из этих терминов. Также предусматривается, что термин "полипептид" относится к продуктам постэкспрессионной модификации полипептида, включая, без ограничений гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию с помощью известных защитных/блокирующих групп, протеолитическое расщепление, или модификация неприродными аминокислотами. Полипептид может быть выделен из природного биологического источника или получен с использованием рекомбинантной технологии, но не обязательно транслирован из указанной последовательности нуклеиновой кислоты. Он может быть получен любым способом, включая химический синтез.

"Выделенный" полипептид или его фрагмент, вариант или производное относится к полипептиду, не находящемуся в его природном окружении. Никакой конкретной степени очистки не требуется. Например, выделенный полипептид может быть просто извлечен из его нативного или природного окружения. Рекомбинантно полученные полипептиды и белки, экспрессируемые в клетках-хозяевах, считаются выделенными в целях изобретения, так же, как и нативные или рекомбинантные полипептиды, которые были отделены, фракционированы, или частично или в значительной степени очищены любым пригодным методом.

Настоящее изобретение также включает фрагменты или варианты полипептидов и любую их комбинацию. Термины "фрагмент" или "вариант" по отношению к полипептид-связывающим доменам или связывающим молекулам по настоящему изобретению включают любые полипептиды, которые сохраняют, по меньшей мере, некоторые свойства (например, аффинность связывания FcRn по отношению к FcRn-связывающему домену или варианту Fc, коагулирующую активность по отношению к варианту FVIII, или активность связывания FVIII по отношению к белку VWF) референтного полипептида. Фраг-

менты полипептидов включают протеолитические фрагменты, а также фрагменты с делециями, в дополнение к специфическим фрагментам антител, описанным в других разделах данного документа, но не включают природный полноразмерный полипептид (или зрелый полипептид). Варианты полипептид-связывающих доменов или связывающих молекул по настоящему изобретению включают фрагменты, как описано выше, а также полипептиды с измененными аминокислотными последовательностями в результате аминокислотных замещений, делеций или вставок. Варианты могут встречаться или не встречаться в природных условиях. Неприродные варианты могут быть получены с использованием известных в данной области техники методов мутагенеза. Варианты полипептидов могут содержать консервативные или неконсервативные аминокислотные замещения, делеций или добавления. Термин "фрагмент VWF" или "фрагменты VWF", используемый в данном документе, означает любые фрагменты VWF, которые взаимодействуют с FVIII и сохраняют по меньшей мере одно или более свойств, нормально обеспечиваемых для FVIII полноразмерным VWF, например предотвращение преждевременной активации к FVIIIa, предотвращение преждевременного протеолиза, предотвращение ассоциации с фосфолипидными мембранами, что может приводить к преждевременному клиренсу, предотвращение связывания с клиренс-рецепторами FVIII, которые могут связывать "голый" FVIII, но не связанный с VWF FVIII, и/или стабилизацию взаимодействий тяжелой цепи и легкой цепи FVIII. В конкретном варианте реализации изобретения "фрагмент VWF", в используемом в данном документе значении, содержит домен D' и домен D3 белка VWF, но не включает домен A1, домен A2, домен A3, домен D4, домен B1, домен B2, домен B3, домен C1, домен C2 и домен CK белка VWF.

Термин "фактор, ограничивающий период полувыведения" или "фактор, ограничивающий период полувыведения FVIII", в используемом в данном документе значении, обозначает фактор, который препятствует увеличению период полувыведения белка FVIII более чем в 1,5 или в 2 раза по сравнению с FVIII дикого типа (например, ADVATE® или REFACTO®). Например, полноразмерный или зрелый VWF может действовать как фактор, ограничивающий период полувыведения FVIII, путем индуцирования выведения комплекса FVIII и VWF из системы по одному или более путям клиренса VWF. В одном примере эндогенный VWF представляет собой фактор, ограничивающий период полувыведения FVIII. В другом примере полноразмерная рекомбинантная молекула VWF, нековалентно связанная с белком FVIII, представляет собой фактор, ограничивающий период полувыведения FVIII.

Термин "эндогенный VWF", в используемом в данном документе значении, обозначает молекулы VWF, в природных условиях присутствующие в плазме. Эндогенная молекула VWF может быть мультимером, но может быть мономером или димером. Эндогенный VWF в плазме связывается с FVIII и образует нековалентный комплекс с FVIII. "Консервативное аминокислотное замещение" представляет собой замещение, при котором аминокислотный остаток замещается на аминокислотный остаток, имеющий схожую боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих схожие боковые цепи, были определены в данной области техники, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), 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 аминокислота в полипептиде замещена на другую аминокислоту из того же семейства боковых цепей, такое замещение считается консервативным. В другом варианте реализации изобретения цепочка аминокислот может быть консервативно замещена на структурно схожую цепочку, отличающуюся по порядку и/или по составу членов семейств боковых цепей.

Как известно в данной области техники, "идентичность последовательностей" между двумя полипептидами определяется путем сравнения аминокислотной последовательности одного полипептида с последовательностью второго полипептида. При обсуждении в данном документе, вопрос о том, является ли какой-либо конкретный полипептид на по меньшей мере около 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичным другому полипептиду, может быть определен с использованием способов и компьютерных программ/прикладного программного обеспечения, известных в данной области техники, таких как, без ограничений, программа BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package (программный пакет для анализа последовательностей, Университет Висконсина), версия 8 для операционной системы Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). BESTFIT использует алгоритм локальной гомологии Смита и Уотермана (Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981)), для нахождения сегмента с наилучшей гомологией между двумя последовательностями. При использовании BESTFIT или любой другой программы для выравнивания последовательностей с целью определения того, является ли определенная последовательность, например, идентичной на 95% референтной последовательности в соответствии с настоящим изобретением, параметры задаются, конечно, таким образом, чтобы процент идентичности рассчитывался по полной длине референтной полипептидной последовательности, и чтобы были дозволены пробелы в гомологии, составляющие до 5% от общего числа аминокислот в референтной последовательности.

В используемом в данном документе значении "аминокислота, соответствующая" или "эквивалент-

ная аминокислота" в последовательности VWF или последовательности белка FVIII определяется путем выравнивания для максимального увеличения идентичности или подобия между первой последовательностью VWF или FVIII и второй последовательностью VWF или FVIII. Число, используемое для идентификации эквивалентной аминокислоты во второй последовательности VWF или FVIII, основано на числе, используемом для идентификации соответствующей аминокислоты в первой последовательности VWF или FVIII.

"Слитая" или "химерная" молекула содержит первую аминокислотную последовательность, связанную со второй аминокислотной последовательностью, с которой она обычно не соединена в природных условиях. Аминокислотные последовательности, нормально присутствующие в разных белках, могут быть объединены в слитом полипептиде, или аминокислотные последовательности, нормально присутствующие в одном и том же белке, могут быть размещены в другом порядке в слитом полипептиде, например, в результате слияния домена фактора VIII по изобретению с доменом иммуноглобулина Fc. Слитый белок получают, например, путем химического синтеза, или путем создания и трансляции полинуклеотида, в котором пептидные области кодируются с желательным взаимным расположением. Химерный белок может дополнительно содержать вторую аминокислотную последовательность, ассоциированную с первой аминокислотной последовательностью с помощью ковалентной непептидной связи или нековалентной связи.

В используемом в данном документе значении термин "период полувыведения" относится к биологическому периоду полувыведения конкретного полипептида *in vivo*. Период полувыведения может быть представлен как время, необходимое для выведения половины количества, введенного субъекту, из циркуляции и/или других тканей животного. Если кривая клиренса для данного полипептида строится как функция времени, то эта кривая обычно является двухфазной, с быстрой  $\alpha$ -фазой и более длительной  $\beta$ -фазой.  $\alpha$ -Фаза типично соответствует равновесию введенного полипептида между внутри- и внесосудистым пространством и, частично, определяется размером полипептида.  $\beta$ -Фаза типично соответствует катаболизму полипептида во внутрисосудистом пространстве. В некоторых вариантах реализации изобретения химерная молекула по изобретению является монофазной и, таким образом, не имеет альфа-фазы, а только одну бета-фазу. Таким образом, в определенных вариантах реализации изобретения термин период полувыведения в используемом в данном документе значении относится к периоду полувыведения полипептида в  $\beta$ -фазе. Типичный  $\beta$ -фазовый период полувыведения человеческого антитела у людей составляет 21 день.

Термин "гетерологичный" по отношению к полинуклеотиду или полипептиду означает, что полинуклеотид или полипептид выделены из объекта, отличного от того объекта, с которым он сравнивается. Таким образом, гетерологичный полипептид, связанный с белком VWF, означает полипептидную цепь, которая соединена с белком VWF и не является встречающейся в природе частью белка VWF. Например, гетерологичный полинуклеотид или антиген может быть получен от разных видов, из разных типов клеток индивидуума, или из одних и тех же или разных типов клеток разных индивидуумов. Термин "связанный", "слитый" или "соединенный" в используемом в данном документе значении, относится к первой аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, присоединенной ко второй аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности (например, с помощью пептидной связи или фосфодиэфирной связи, соответственно). Термин "ковалентно связанный" или "ковалентное соединение" относится к ковалентной связи, например дисульфидной связи, пептидной связи, или к одной или более аминокислотам, например линкеру, между двумя фрагментами, связанными вместе. Первая аминокислота или нуклеотидная последовательность может быть непосредственно присоединена ко второй аминокислотной или нуклеотидной последовательности, или, альтернативно, промежуточная последовательность может связывать первую последовательность со второй последовательностью. Термин "связанный", "слитый", или "соединенный" означает не только слияние первой аминокислотной последовательности со второй аминокислотной последовательностью на С-конце или N-конце, но также включает вставку целой первой аминокислотной последовательности (или второй аминокислотной последовательности) между любыми двумя аминокислотами второй аминокислотной последовательности (или первой аминокислотной последовательности, соответственно). В одном варианте реализации изобретения первая аминокислотная последовательность может быть присоединена ко второй аминокислотной последовательности с помощью пептидной связи или линкера. Первая нуклеотидная последовательность может быть присоединена ко второй нуклеотидной последовательности с помощью фосфодиэфирной связи или линкера. Линкер может быть пептидом или полипептидом (для полипептидных цепей) или нуклеотидом или нуклеотидной цепью (для нуклеотидных цепей) или любым химическим фрагментом (как для полипептидных, так и для полинуклеотидных цепей). Ковалентная связь иногда обозначается как (-) или черточка.

В используемом в данном документе значении термин "ассоциированный с" относится к ковалентной или нековалентной связи, образованной между первой аминокислотной цепью и второй аминокислотной цепью. В одном варианте реализации изобретения термин "ассоциированный с" означает ковалентную непептидную связь или нековалентную связь. В некоторых вариантах реализации такая связь

обозначается двоеточием, т.е. (:). В другом варианте реализации изобретения он означает ковалентную связь, за исключением пептидной связи. В других вариантах реализации изобретения термин "ковалентно ассоциированный", в используемом в данном документе значении, означает ассоциацию между двумя фрагментами с помощью ковалентной связи, например дисульфидной связи, пептидной связи, или одной или более аминокислот (например, линкера). Например, аминокислота цистеин содержит тиольную группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик с тиольной группой второго цистеинового остатка. У большинства природных молекул IgG, области СН1 и СL соединены дисульфидной связью, и две тяжелые цепи соединены двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих 239 и 242 по системе нумерации Кабат (положения 226 или 229, система нумерации EU). Примеры ковалентных связей включают, без ограничений, пептидную связь, металлическую связь, водородную связь, дисульфидную связь, сигма-связь, пи-связь, дельта-связь, гликозидную связь, агностическую связь, изогнутую связь, дипольную связь, пи-дативное взаимодействие, двойную связь, тройную связь, четверную связь, пятикратную связь, шестикратную связь, конъюгацию, гиперконъюгацию, ароматичность, гаптность или антисвязывание. Неограничивающие примеры нековалентных связей включают ионную связь (например, катион-пи-связь или солевую связь), металлическую связь, водородную связь (например, диводородную связь, диводородный комплекс, низкобарьерную водородную связь, или симметричную водородную связь), вандерваальсовы силы, лондоновские дисперсионные силы, механическую связь, галогенную связь, аурофильность, интеркаляцию, стеклинг (stacking), энтропийные силы или химическую полярность.

В используемом в данном документе значении, термин "сайт расщепления" или "сайт ферментативного расщепления" относится к сайту, распознаваемому ферментом. В одном варианте реализации изобретения полипептид имеет сайт ферментативного расщепления, расщепляемый ферментом, который активируется в каскаде свертывания, так, чтобы расщепление таких сайтов происходило в месте образования сгустка. В другом варианте реализации изобретения линкер FVIII соединяющий белок FVIII и второй гетерологичный фрагмент, может содержать сайт расщепления. Типичные примеры таких сайтов включают, например, сайты, распознаваемые тромбином, фактором XIa или фактором Xa. Типичные примеры сайтов расщепления FXIa включают, например, TQSFNDFTR (SEQ ID NO: 27) и SVSQTSKLTR (SEQ ID NO: 28). Типичные примеры сайтов расщепления тромбином включают, например, DFLAEGGGVR (SEQ ID NO: 29), TTKTKPR (SEQ ID NO: 30), LVPRG (SEQ ID NO: 31) и ALRPR (аминокислоты 1-5 SEQ ID NO: 26). Другие сайты ферментативного расщепления известны в данной области техники. Сайт расщепления, который может расщепляться тромбином, называется в данном документе "сайт расщепления тромбином".

В используемом в данном документе значении, термин "сайт процессинга" или "внутриклеточный сайт процессинга" относится к типу сайта ферментативного расщепления в полипептиде, являющегося мишенью для ферментов, которые функционируют после трансляции полипептида. В одном варианте реализации изобретения такие ферменты функционируют во время транспортировки из полости Гольджи в транс-Гольджи компартмент. Ферменты внутриклеточного процессинга расщепляют полипептиды перед секрецией белка из клетки. Примеры таких сайтов процессинга включают, например, сайты, являющиеся мишенями для семейства эндопептидаз PACE/фурин (где PACE является акронимом от Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme (фермент, расщепляющий спаренные основные аминокислоты)). Эти ферменты локализованы в мембране Гольджи и расщепляют белки со стороны карбоксильного конца от мотива последовательности Arg-[любой остаток]-(Lys или Arg)-Arg. В используемом в данном документе значении семейство "фуриновых" ферментов включает, например, PCSK1 (также известен как PC1/PC3), PCSK2 (также известен как PC2), PCSK3 (также известен как фурин или PACE), PCSK4 (также известен как PC4), PCSK5 (также известен как PC5 или PC6), PCSK6 (также известен как PACE4) или PCSK7 (также известен как PC7/LPC, PC8 или SPC7). Другие сайты процессинга известны в данной области техники. Термин "процессируемый линкер", упоминаемый в данном документе, означает линкер, содержащий сайт внутриклеточного процессинга.

Термин "фурин" относится к ферментам, классифицированным в соответствии с EC (классификация ферментов) как № 3.4.21.75. Фурин представляет собой субтилизин-подобную пропротеинконвертазу, которая также известна как PACE (Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme (фермент, расщепляющий спаренные основные аминокислоты)). Фурин делегирует участки неактивных прекурсорных белков, превращая их в биологически активные белки. Во время внутриклеточной транспортировки, пропептид отщепляется от зрелой молекулы VWF ферментом фурином в (аппарате) Гольджи.

Следует понимать, что в конструктах, содержащих несколько сайтов процессинга или расщепления, такие сайты могут быть одинаковыми или разными. Нарушение гемостаза, в используемом в данном документе значении, означает генетически унаследованное или приобретенное состояние, характеризующееся склонностью к кровоизлиянию, спонтанно или в результате травмы, вследствие нарушенной способности или неспособностью образовывать фибриновый сгусток. Примеры таких расстройств включают гемофилию. Тремя основными формами являющиеся гемофилия А (дефицит фактора VIII), гемофилия В (дефицит фактора IX или "болезнь Кристмаса") и гемофилия С (дефицит фактора XI, слабая склонность к кровотечению). Другие расстройства гемостаза включают, например, болезнь фон Виллебранда, дефицит

фактора XI (дефицит РТА), дефицит фактора XII, недостаточности или структурные аномалии фибриногена, протромбина, фактора V, фактора VII, фактора X или фактора XIII, синдром Бернара-Сулье, который представляет собой дефект или дефицит GPIb. GPIb, представляющий собой рецептор VWF, может быть дефектным и приводить к недостаточности первичного образования сгустка (первичный гемостаз) и повышенной склонности к кровотечениям) и тромбастении Гланцманна-Негели (тромбастения Гланцманна). При печеночной недостаточности (острая и хроническая формы) наблюдается недостаточное продуцирование коагулирующих факторов печенью; это может увеличивать риск кровотечения.

Химерные молекулы по изобретению могут быть использованы профилактично. В используемом в данном документе значении термин "профилактическое лечение" относится к введению молекулы до эпизода кровотечения. В одном варианте реализации изобретения субъект, нуждающийся в гемостатическом средстве общего действия, подвергается, или должен быть подвергнут, хирургии. Химерный белок по изобретению может быть введен до или после хирургии в качестве профилактики. Химерный белок по изобретению может быть введен во время или после хирургии для остановки острого эпизода кровотечения. Хирургия может включать, без ограничений, трансплантацию печени, резекцию печени, зубо-врачебные процедуры или трансплантацию стеновых клеток.

Химерная молекула по изобретению также используется для лечения "по требованию" (также называемого "эпизодическим"). Термин "лечение "по требованию"" или "эпизодическое лечение" относится к введению химерной молекулы в ответ на симптомы эпизода кровотечения или перед активностью, которая может вызвать кровотечение. В одном аспекте лечение "по требованию" (эпизодическое) может быть предоставлено субъекту при начале кровотечения, например после травмы, или при ожидаемом кровотечении, например перед хирургией. В другом аспекте лечение "по требованию" может быть предоставлено до активностей, которые увеличивают риск кровотечения, таких как контактные виды спорта.

В используемом в данном документе значении термин "острое кровотечение" относится к эпизоду кровотечения независимо от вызвавшей его причины. Например, субъект может иметь травму, уремию, наследственное нарушение, сопровождающееся повышенной кровоточивостью (например, дефицит фактора VII), тромбоцитарное расстройство или резистентность вследствие выработки антител к факторам свертывания крови.

Лечить, лечение, лечащий, в используемом в данном документе значении, относятся, например, к снижению тяжести болезни или состояния; уменьшению продолжительности течения болезни; облегчению одного или более симптомов, ассоциированных с болезнью или состоянием; обеспечению полезных эффектов для субъекта с болезнью или состоянием, без обязательного исцеления болезни или состояния, или профилактике одного или более симптомов, ассоциированных с болезнью или состоянием. В одном варианте реализации изобретения термин "лечить" или "лечение" означает поддержание у субъекта минимального уровня перед введением очередной дозы FVIII, равного 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 путем введения химерной молекулы по изобретению. В другом варианте реализации изобретения лечить или лечение означает поддержание минимального уровня FVIII перед введением очередной дозы, имеющего значение 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. Лечение или терапия болезни или состояния может также включать поддержание у субъекта активности FVIII на уровне, сопоставимом с 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% активности FVIII у субъекта без гемофилии. Минимальный уровень перед введением очередной дозы, необходимый для лечения, может быть измерен одним или более известными способами и может быть отрегулирован (увеличен или уменьшен) для каждого субъекта.

## II. Химерные молекулы.

Химерные молекулы по изобретению предназначены для улучшения высвобождения белка VWF или белка FVIII от другого фрагмента, с которым связан белок VWF или белок FVIII. Изобретение обеспечивает расщепляемый тромбином линкер, который может быстро и эффективно расщепляться в месте повреждения. В одном аспекте изобретения химерная молекула может содержать белок фактора фон Виллебранда (VWF), гетерологичный фрагмент (H1), последовательность XTEN и линкер VWF, соединяющий белок VWF с гетерологичным фрагментом, причем линкер VWF содержит полипептид, выбранный из: (i) области a2 из фактора VIII (FVIII); (ii) области a1 из FVIII; (iii) области a3 из FVIII; (iv) сайта расщепления тромбином, содержащего X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любую их комбинацию, и последовательность XTEN соединена с белком VWF, гетерологичным фрагментом (H1), линкером VWF или любой их комбинацией. В другом аспекте изобретения химерная молекула может содержать первую полипептидную цепь, которая содержит белок VWF, гетерологичный фрагмент (H1) и линкер VWF, соединяющий белок VWF и гетерологичный фрагмент (H1), и вторую полипептидную цепь, содержащую белок FVIII и последовательность XTEN, причем линкер VWF в первой полипептидной цепи содержит: (i) область a2 из FVIII; (ii) область a1 из FVIII; (iii) область a3 из FVIII; (iv) сайт расщепления тромбином, содержащий X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой

алифатическую аминокислоту; или (v) любую их комбинацию, и первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь ассоциированы друг с другом.

В других аспектах изобретения химерная молекула содержит полипептидную цепь, содержащую белок FVIII, соединенный с гетерологичным фрагментом с помощью линкера FVIII, причем линкер FVIII содержит: (i) область a2 из FVIII; (ii) область a1 из FVIII; (iii) область a3 из FVIII; (iv) сайт расщепления тромбином, содержащий X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любую их комбинацию.

II.A. Химерные молекулы с VWF, XTEN, линкером VWF.

Настоящее изобретение предусматривает химерную молекулу, содержащую белок VWF, слитый с последовательностью XTEN с помощью линкера VWF, причем линкер VWF содержит полипептид, выбранный из: (i) области a2 из FVIII; (ii) области a1 из FVIII; (iii) области a3 из FVIII; (iv) сайта расщепления тромбином, содержащего X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотива экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любой их комбинации.

В одном варианте реализации изобретения химерная молекула содержит белок VWF, гетерологичный фрагмент (H1), последовательность XTEN и линкер VWF, соединяющий белок VWF с гетерологичным фрагментом, причем последовательность XTEN расположена между белком VWF и линкером VWF, и линкер VWF содержит полипептид, выбранный из: (i) области a2 из фактора VIII (FVIII); (ii) области a1 из FVIII; (iii) области a3 из FVIII; (iv) сайта расщепления тромбином, содержащего X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любой их комбинации. В другом варианте реализации изобретения химерная молекула содержит белок VWF, гетерологичный фрагмент (H1), последовательность XTEN и линкер VWF, соединяющий белок VWF с гетерологичным фрагментом, причем последовательность XTEN расположена между линкером VWF и гетерологичным фрагментом, и линкер VWF содержит полипептид, выбранный из: (i) области a2 из FVIII; (ii) области a1 из FVIII; (iii) области a3 из FVIII; (iv) сайта расщепления тромбином, содержащего X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любой их комбинации. В других вариантах реализации изобретения химерная молекула дополнительно содержит полипептидную цепь, содержащую белок FVIII, причем первая цепь, содержащая белок VWF, и вторая цепь, содержащая белок FVIII, ассоциированы друг с другом. В одном примере ассоциация может быть ковалентной ассоциацией, например, дисульфидной связью. В еще одних вариантах реализации изобретения полипептидная цепь, содержащая белок FVIII дополнительно содержит дополнительную последовательность XTEN. Дополнительная последовательность XTEN может быть связана с N-концом или C-концом белка FVIII или вставлена между двумя соседними аминокислотами FVIII. В других вариантах реализации изобретения цепь, содержащая белок FVIII, дополнительно содержит второй гетерологичный фрагмент (H2). В некоторых вариантах реализации изобретения белок FVIII соединен со вторым гетерологичным фрагментом с помощью линкера FVIII. В определенных вариантах реализации изобретения линкер FVIII идентичен линкеру VWF, соединяющему белок VWF и гетерологичный фрагмент. В других вариантах реализации изобретения линкер FVIII отличается от линкера VWF, соединяющего белок VWF и гетерологичный фрагмент.

В определенных вариантах реализации изобретения химерная молекула имеет формулу, выбранную из: (i) V-L1-X1-H1:H2-L2-X2-C; (ii) V-X1-L1-H1:H2-L2-X2-C; (iii) V-L1-X1-H1:H2-X2-L2-C; (iv) V-X1-L1-H1:H2-X2-L2-C; (v) V-L1-X1-H1:H2-L2-C(X2); (vi) V-X1-L1-H1:H2-L2-C(X2); (vii) C-X2-L2-H2:H1-X1-L1-V; (viii) C-X2-L2-H2:H1-L1-X1-V; (ix) C-L2-X2-H2:H1-L1-X1-V; (x) C-L2-X2-H2:H1-L1-X1-V; (xi) C(X2)-L2-H2:H1-X1-L1-V; или (xii) C(X2)-L2-H2:H1-L1-X1-V; где V обозначает белок VWF; L1 обозначает линкер VWF; L2 обозначает необязательный линкер FVIII; H1 представляет собой первый гетерологичный фрагмент; H2 обозначает второй гетерологичный фрагмент; X1 обозначает последовательность XTEN; X2 обозначает необязательную последовательность XTEN; C обозначает белок FVIII; C(X2) обозначает белок FVIII, слитый с последовательностью XTEN, причем последовательность XTEN вставлена между двумя соседними аминокислотами FVIII; (-) обозначает пептидную связь или одну или более аминокислот; и (:) обозначает ковалентную связь между H1 и H2.

В некоторых вариантах реализации изобретения белок FVIII в химерной молекуле содержит третий гетерологичный фрагмент (H3), который может быть последовательностью XTEN. В других вариантах реализации изобретения белок FVIII химерной молекулы содержит четвертый гетерологичный фрагмент (H4), который может быть последовательностью XTEN. В еще одних вариантах реализации изобретения белок FVIII химерной молекулы содержит пятый гетерологичный фрагмент (H5), который может быть последовательностью XTEN. В других вариантах реализации изобретения белок FVIII химерной молекулы содержит шестой гетерологичный фрагмент (H6), который может быть последовательностью XTEN. В определенных вариантах реализации изобретения один или более из третьего гетерологичного фрагмента (H3), четвертого гетерологичного фрагмента (H4), пятого гетерологичного фрагмента (H5) и шестого гетерологичного фрагмента (H6) способны увеличивать период полувыведения химерной молекулы. В некоторых вариантах реализации изобретения третий гетерологичный фрагмент (H3), четвертый гетерологичный фрагмент (H4), пятый гетерологичный фрагмент (H5) и шестой гетерологичный фрагмент (H6) присоединены к C-концу или N-концу FVIII или вставлены между двумя аминокислотами белка FVIII.



II.B. Химерные молекулы с FVIII, XTEN, белком VWF, линкером VWF.

Настоящее изобретение также предусматривает химерную молекулу, содержащую первую полипептидную цепь, которая содержит белок VWF, гетерологичный фрагмент (H1) и линкер VWF, соединяющий белок VWF и гетерологичный фрагмент (H1), и вторую полипептидную цепь, содержащую белок FVIII и последовательность XTEN, причем линкер VWF в первой полипептидной цепи содержит: (i) область a2 из FVIII; (ii) область a1 из FVIII; (iii) область a3 из FVIII; (iv) сайт расщепления тромбином, содержащий X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любую их комбинацию, и первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь ассоциированы друг с другом. В одном варианте реализации последовательность XTEN присоединена к N-концу или C-концу белка FVIII или вставлена между двумя соседними аминокислотами FVIII. В другом варианте реализации изобретения химерная молекула дополнительно содержит дополнительную последовательность XTEN, которая связана с белком VWF, гетерологичным фрагментом, линкером VWF, или любой их комбинацией. В других вариантах реализации изобретения химерная молекула дополнительно содержит второй гетерологичный фрагмент (H2). В других вариантах реализации изобретения второй гетерологичный фрагмент химерной молекулы соединен с белком FVIII, последовательностью XTEN или обоими. В других вариантах реализации изобретения второй гетерологичный фрагмент химерной молекулы соединен с белком FVIII или последовательностью XTEN с помощью линкера FVIII. В других вариантах реализации изобретения линкер FVIII идентичен линкеру VWF. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер FVIII отличается от линкера VWF. В определенных вариантах реализации изобретения химерная молекула имеет формулу, выбранную из: (i) V-L1-X1-H1:H2-L2-X2-C; (ii) V-X1-L1-H1:H2-L2-X2-C; (iii) V-L1-X1-H1:H2-X2-L2-C; (iv) V-X1-L1-H1:H2-X2-L2-C; (v) V-L1-X1-H1:H2-L2-C(X2); (vi) V-X1-L1-H1:H2-L2-C(X2); (vii) C-X2-L2-H2:H1-X1-L1-V; (viii) C-X2-L2-H2:H1-L1-X1-V; (ix) C-L2-X2-H2:H1-L1-X1-V; (x) C-L2-X2-H2:H1-L1-X1-V; (xi) C(X2)-L2-H2:H1-X1-L1-V; или (xii) C(X2)-L2-H2:H1-L1-X1-V; где V обозначает белок VWF; L1 обозначает линкер VWF; L2 обозначает необязательный линкер FVIII; H1 представляет собой первый гетерологичный фрагмент; H2 обозначает второй гетерологичный фрагмент; X1 обозначает необязательную последовательность XTEN; X2 обозначает последовательность XTEN; C обозначает белок FVIII; C(X2) обозначает белок FVIII, слитый с последовательностью XTEN, причем последовательность XTEN вставлена между двумя соседними аминокислотами FVIII; (-) обозначает пептидную связь или одну или более аминокислот; и (:) обозначает ковалентную связь между H1 и H2. В одном варианте реализации изобретения линкер VWF и линкер FVIII могут быть одинаковыми. В другом варианте реализации изобретения линкер VWF и линкер FVIII являются разными. В определенных вариантах реализации изобретения белок FVIII химерной молекулы содержит третий гетерологичный фрагмент (H3), который может быть последовательностью XTEN. В других вариантах реализации изобретения белок FVIII химерной молекулы содержит четвертый гетерологичный фрагмент (H4), который является последовательностью XTEN. В еще одних вариантах реализации изобретения белок FVIII химерной молекулы содержит пятый гетерологичный фрагмент (H5), который может быть последовательностью XTEN. В других вариантах реализации изобретения белок FVIII содержит шестой гетерологичный фрагмент (H6), который может быть последовательностью XTEN. В определенных вариантах реализации изобретения один или более из третьего гетерологичного фрагмента (H3), четвертого гетерологичного фрагмента (H4), пятого гетерологичного фрагмента (H5) и шестого гетерологичного фрагмента (H6) способны увеличивать период полувыведения химерной молекулы. В некоторых вариантах реализации изобретения третий гетерологичный фрагмент (H3), четвертый гетерологичный фрагмент (H4), пятый гетерологичный фрагмент (H5) и/или шестой гетерологичный фрагмент (H6) присоединены к C-концу или N-концу FVIII или вставлены между двумя аминокислотами белка FVIII.

II.C. Химерные молекулы с FVIII, XTEN и линкером FVIII.

Химерная молекула по изобретению может содержать белок FVIII, последовательность XTEN и гетерологичный фрагмент, присоединенный с помощью линкера FVIII, который содержит (i) область a2 из FVIII; (ii) область a1 из FVIII; (iii) область a3 из FVIII; (iv) сайт расщепления тромбином, содержащий X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любую их комбинацию. В определенных вариантах реализации изобретения химерная молекула содержит две полипептидные цепи - первую цепь, содержащую белок FVIII, соединенный с первой Fc-областью с помощью линкера FVIII, и вторую цепь, содержащую белок VWF (например, домен D' и домен D3 VWF), соединенную с Fc-областью, причем линкер FVIII в первой полипептидной цепи содержит: (i) область a2 из FVIII; (ii) область a1 из FVIII; (iii) область a3 из FVIII; (iv) сайт расщепления тромбином, содержащий X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любую их комбинацию, и первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь ассоциированы друг с другом, и последовательность XTEN присоединена к первому полипептиду (например, к N-концу или C-концу белка FVIII, линкеру или первой Fc-области или внутри белка FVIII), ко второму полипептиду (например, к N-концу или C-концу белка VWF или Fc-области или внутри белка FVIII) или к обоим. В конкретном варианте реализации линкер в первой полипептидной цепи содержит область a2 из FVIII.

В определенных вариантах реализации изобретения химерная молекула имеет формулу, выбранную из: (i) V-L2-X2-H2: H1-L1-X1-C; (ii) V-X2-L2-H2: H1-L1-X1-C; (iii) V-L2-X2-H2: H1-X1-L1-C; (iv) V-X2-L2-H2: H1-X1-L1-C; (v) V-L2-X2-H2: H1-L1-C(X1); (vi) V-X2-L2-H2: H1-L1-C(X1); (vii) C-X1-L1-H1: H2-X2-L2-V; (viii) C-X1-L1-H1: H2-L2-X2-V; (ix) C-L1-X1-H1: H2-L2-X2-V; (x) C-L1-X1-H1: H2-L2-X2-V; (xi) C(X1)-L1-H1: H2-X2-L2-V; или (xii) C(X1)-L1-H1: H2-L2-X2-V, где V обозначает белок VWF; L1 представляет собой линкер FVIII; L2 обозначает необязательный линкер VWF; H1 представляет собой первый гетерологичный фрагмент; H2 обозначает второй гетерологичный фрагмент; X1 обозначает необязательную последовательность XTEN; X2 обозначает необязательную последовательность XTEN; C обозначает белок FVIII; C(X1) обозначает белок FVIII, слитый с последовательностью XTEN, причем последовательность XTEN вставлена между двумя соседними аминокислотами FVIII; (-) обозначает пептидную связь или одну или более аминокислот; и (:) обозначает ковалентную связь между H1 и H2, и где в химерной молекуле присутствует по меньшей мере одна последовательность XTEN. В одном варианте реализации изобретения линкер VWF и линкер FVIII являются одинаковыми. В другом варианте реализации изобретения линкер VWF и линкер FVIII являются разными.

II.D. Компоненты химерных молекул.

II.C.1. Линкер VWF или линкер FVIII.

Линкер VWF или линкер FVIII, пригодный для химерной молекулы по изобретению, представляет собой расщепляемый тромбином линкер, соединяющий белок VWF с гетерологичным фрагментом или белок FVIII с гетерологичным фрагментом. В одном варианте реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит область a1 FVIII. В другом варианте реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит область a2 FVIII. В других вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит область a3 FVIII. В других вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит сайт расщепления тромбином, содержащий X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту.

В одном варианте реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит область a1, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80, около 85, около 90, около 95, около 96, около 97, около 98, около 99 или 100% идентичную участку от Met337 до Arg372, соответствующему полноразмерному зрелому FVIII, где область a1 способна расщепляться тромбином. В другом варианте реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит область a1, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80, около 85, около 90, около 95, около 96, около 97, около 98, около 99 или 100% идентичную аминокислотам 337-374, соответствующим полноразмерному зрелому FVIII, где область a1 способна расщепляться тромбином. В других вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII дополнительно содержит дополнительные аминокислоты, например одну, две, три, четыре, пять, десять или больше. В конкретном варианте реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит ISMKNNEEAE-DYDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSV (SEQ ID NO: 5). В некоторых вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит область a2, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80, около 85, около 90, около 95, около 96, около 97, около 98, около 99 или 100% идентичную участку от Glu720 до Arg740, соответствующему полноразмерному зрелому FVIII, где область a2 способна расщепляться тромбином. В других вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит область a2, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80, около 85, около 90, около 95, около 96, около 97, около 98, около 99% или 100% идентичную аминокислотам 712-743, соответствующим полноразмерному зрелому FVIII. В еще одних вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII дополнительно содержит дополнительные аминокислоты, например одну, две, три, четыре, пять, десять или больше. В конкретном варианте реализации изобретения линкер VWF содержит ISDKNTGDY-YEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRFS (SEQ ID NO: 4).

В определенных вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит область a3, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80, около 85, около 90, около 95, около 96, около 97, около 98, около 99 или 100% идентичную участку от Glu1649 до Arg1689, соответствующему полноразмерному зрелому FVIII, где область a3 способна расщепляться тромбином. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит область a3, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80%, около 85, около 90, около 95, около 96, около 97, около 98, около 99 или 100% идентичную аминокислотам 1649-1692, соответствующим полноразмерному зрелому FVIII, где область a3 способна расщепляться тромбином. В других вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII дополнительно содержит дополнительные аминокислоты, например одну, две, три, четыре, пять, десять или больше. В конкретном варианте реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит ISEITRTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEFDIYDEDENQSPRSFQ (SEQ ID NO: 6).

В других вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит сайт расщепления тромбином, содержащий X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где мотив экзосайта взаимодействия PAR1 содержит S-F-L-L-R-N (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах

реализации изобретения мотив экзосайта взаимодействия PAR1 дополнительно содержит аминокислотную последовательность, выбранную из P, P-N, P-N-D, P-N-D-K (SEQ ID NO: 8), P-N-D-K-Y (SEQ ID NO: 9), P-N-D-K-Y-E (SEQ ID NO: 10), P-N-D-K-Y-E-P (SEQ ID NO: 11), P-N-D-K-Y-E-P-F (SEQ ID NO: 12), P-N-D-K-Y-E-P-F-W (SEQ ID NO: 13), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E (SEQ ID NO: 14), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D (SEQ ID NO: 20), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D-E (SEQ ID NO: 21), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D-E-E (SEQ ID NO: 22), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D-E-E-S (SEQ ID NO: 23) или любой их комбинации. В других вариантах реализации изобретения алифатическую аминокислоту для сайта расщепления тромбином, содержащего X-V-P-R, выбирают из глицина, аланина, валина, лейцина или изолейцина. В конкретном варианте реализации изобретения сайт расщепления тромбином содержит L-V-P-R. В некоторых вариантах реализации изобретения тромбин расщепляет линкер VWF или линкер FVIII быстрее, чем тромбин расщеплял бы сайт расщепления тромбином (например, L-V-P-R), если бы сайт расщепления тромбином (L-V-P-R) замещал линкер VWF или линкер FVIII, соответственно (т.е. без мотива экзосайта взаимодействия PAR1). В некоторых вариантах реализации изобретения тромбин расщепляет линкер VWF или линкер FVIII по меньшей мере в около 10 раз, по меньшей мере в около 20 раз, по меньшей мере в около 30 раз, по меньшей мере в около 40 раз, по меньшей мере в около 50 раз, по меньшей мере в около 60 раз, по меньшей мере в около 70 раз, по меньшей мере в около 80 раз, по меньшей мере в около 90 раз или по меньшей мере в около 100 раз быстрее, чем тромбин расщеплял бы сайт расщепления тромбином (например, L-V-P-R), если бы сайт расщепления тромбином (например, L-V-P-R) замещал линкер VWF или линкер FVIII.

В некоторых вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII, содержащий (i) область a1, (ii) область a2, (iii) область a3 или (iv) сайт расщепления тромбином X-V-P-R и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, дополнительно содержит одну или более аминокислот, имеющих длину по меньшей мере около 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 или 2000 аминокислот. В одном варианте реализации изобретения одна или более аминокислот содержат пептид gly. В другом варианте реализации изобретения одна или более аминокислот содержат GlyGly. В других вариантах реализации изобретения одна или более аминокислот содержат IleSer. В еще одних вариантах реализации изобретения одна или более аминокислот содержат пептид gly/ser. В других вариантах реализации изобретения одна или более аминокислот содержат пептид gly/ser, имеющий формулу (Gly4Ser)<sub>n</sub> или S(Gly4Ser)<sub>n</sub>, где n обозначает положительное целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 100. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более аминокислот содержат (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 89) или (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 90).

#### II.C.2. Белок VWF.

VWF (также известен как F8VWF) представляет собой большой мультимерный гликопротеин, присутствующий в плазме крови и продуцируемый конститутивно в эндотелии (в тельцах Вейбеля-Паладе), мегакариocyтах (а-гранулах тромбоцитов) и субэндотелиальной соединительной ткани. Основной мономер VWF представляет собой белок, состоящий из 2813 аминокислот. Каждый мономер содержит ряд специфических доменов со специфическими функциями - домен D'/D3 (который связывается с фактором VIII), домен A1 (который связывается с рецептором GPIb тромбоцитов, гепарином, и/или возможно коллагеном), домен A3 (который связывается с коллагеном), домен C1 (в котором домен RGD связывается с интегрином тромбоцитов  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 при его активации) и домен "цистеинового узла" на C-конце белка (который VWF делит с фактором роста тромбоцитов (PDGF), трансформирующим фактором роста- $\beta$  (TGF $\beta$ ) и  $\beta$ -хорионическим гонадотропином человека ( $\beta$ HCG)).

Термин "белок VWF" в используемом в данном документе значении включает, без ограничений, полноразмерный белок VWF или функциональные фрагменты VWF, содержащие домен D' и домен D3, способные ингибировать связывание эндогенного VWF с FVIII. В одном варианте реализации изобретения белок VWF связывается с FVIII. В другом варианте реализации изобретения белок VWF блокирует сайт связывания VWF на FVIII, тем самым ингибируя взаимодействие FVIII с эндогенным VWF. В других вариантах реализации изобретения белок VWF не выводится путями клиренса VWF. Белки VWF включают производные, варианты, мутанты или аналоги, сохраняющие такие активности VWF.

Мономерная последовательность человеческого VWF из 2813 аминокислот депонирована в Genbank под номером доступа NP\_000543.2. Нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий VWF, депонирована в Genbank под номером доступа NM\_000552.3. Нуклеотидная последовательность человеческого VWF обозначена как SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 2 представляет собой аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 1. Все домены VWF перечислены в табл. 1.

Таблица 1. Последовательности VWF

Домены VWF	Аминокислотная последовательность
Сигнальный пептид VWF (аминокислоты 1-22 SEQ ID NO: 2)	1 <u>MIPARFAGVL LALALILPGT LC</u> 22
Область D1D2 VWF (аминокислоты 23-763 SEQ ID NO: 2)	23 <b>AEGTRGRS STARCSLFGS</b> <b>DFVNTFDGSM</b> 51 <b>YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE</b> <b>FFDIHLFVNG</b> 101 <b>TVTQGDQRVS MPYASKGLYL ETEAGYKLS GEAYGFVARI</b> <b>DGSGNFQVLL</b> 151 <b>SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS</b> <b>WALSSGEQWC</b> 201 <b>ERASPPSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL</b> <b>VDPEFFVALC</b> 251 <b>EKTLCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDHSA</b> <b>CSPVCPAGME</b> 301 <b>YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG</b> <b>LCVESTECPC</b> 351 <b>VHSGKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV</b> <b>TGQSHFKSFD</b> 401 <b>NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSF SIVIETV QCADDRDAVC</b> <b>TRSVTVRLPG</b> 451 <b>LHNSLVKLVK H GAGVAMDQD IQLPLLKGD L RIQHTVTASV</b> <b>RLSYGEDLQM</b> 501 <b>DWDGRGRLLV KLSFVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG</b> <b>LAEPRVEDFG</b>

	551 <b>NAWKLHGDCQ DLQKQHSDFC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP</b> <b>TFEACHRAVS</b> 601 <b>PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRVRV</b> <b>AWREPGRCEL</b> 651 <b>NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP</b> <b>PGLYMDERGD</b> 701 <b>CVPKAQPCPY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM</b> <b>SGVPGSLLPD</b> 751 <b>AVLSSPLSHR SKR</b> 763
Домен D' VWF	764 <u>SLSRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK</u> <u>TCQNYDLECM</u> 801 <u>SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE</u> <u>TVKIGCNTCY</u> 851 <u>CRDRKWNCTD HVCDAT</u> 866
Домен D3 VWF	867 <u>CSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGEQ</u> <u>YVLVQDYCGS</u> 901 <u>NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELEFDGE</u> <u>VNVKRPMDKDE</u> 951 <u>THFEVVEGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE</u> <u>KVCGLCGNFD</u> 1001 <u>GIQNDLTSS NLQVEEDPVD FGNWVKVSSQ CADTRKVPD</u> <u>SSPATCHNNI</u> 1051 <u>MKQTMVDSSC RILTSDFQD CNKLVDEPEY LDVCIYDTC</u> <u>CESIGDCACF</u> 1101 <u>CDTIAAYAHV CAQHGVVTV RTATLCPQSC EERNLENGY</u> <u>ECEWRYNSCA</u> 1151 <u>PACQVTCQHP EPLACPQCV EGCHAHCPPG KILDELLOT</u> <u>VDPEDCPVCE</u> 1201 <u>VAGRRFASGK KVLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP</u> 1240
Домен A1 VWF	1241 <u>GGLVVPPTDA</u> 1251 <u>PVSPTTYLVE DISEPPLHDF YCSRLLDLVF LLDGSSRLSE</u> <u>AEFEVLKAFV</u> 1301 <u>VDMMERLRIS QKWVRVAVVE YHDGSHAYIG LKDRKRPESEL</u> <u>RRIASQVKYA</u> 1351 <u>GSQVASTSEV LKYTLFQIFS KIDRPEASRI ALLLMASQEP</u> <u>QRMSRNFVRY</u> 1401 <u>VQGLKKKKVI VIPVGIGPHA NLKQIRLIEK QAPENKAFVL</u> <u>SSVDELEQQR</u> 1451 <u>DEIVSYLCDL APEAPPPTLP PDMAQVTVG</u> 1479
	Нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 1)
Полноразмерный VWF	1 <u>ATGATTCCTG CCAGATTGC CGGGGTGCTG</u> <u>CTTGCTCTGG CCCTCATTTT</u> 51 <u>GCCAGGGACC CTTGTGCAG AAGGAACTCG</u> <u>CGGCAGGTCA TCCACGGCCC</u> 101 <u>GATGCAGCCT TTTCGGAAGT GACTTCGTCA</u> <u>ACACCTTTGA TGGGAGCATG</u> 151 <u>TACAGCTTTG CGGGATACTG CAGTTACCTC</u> <u>CTGGCAGGGG GCTGCCAGAA</u> 201 <u>ACGCTCCTTC TCGATTATTG GGGACTTCCA</u> <u>GAATGGCAAG AGAGTGAGCC</u> 251 <u>TCTCCGTGTA TCTGGGGAA TTTTTTGACA</u> <u>TCCATTTGTT TGTCAATGGT</u> 301 <u>ACCGTGACAC AGGGGGACCA AAGAGTCTCC</u> <u>ATGCCCTATG CCTCCAAAGG</u> 351 <u>GCTGTATCTA GAAACTGAGG CTGGGTACTA</u> <u>CAAGCTGTCC GGTGAGGCCT</u> 401 <u>ATGGCTTTGT GGCCAGGATC GATGGCAGCG</u> <u>GCAACTTTCA AGTCCTGCTG</u>

451	TCAGACAGAT	ACTTCAACAA	GACCTGCGGG
CTGTGTGGCA	ACTTTAACAT		
501	CTTGTCTGAA	GATGACTTTA	TGACCCAAGA
AGGGACCTTG	ACCTCGGACC		
551	CTTATGACTT	TGCCAACTCA	TGGGCTCTGA
GCAGTGGAGA	ACAGTGGTGT		
601	GAACGGGCAT	CTCCTCCCAG	CAGCTCATGC
AACATCTCCT	CTGGGAAAT		
651	GCAGAAGGGC	CTGTGGGAGC	AGTGCCAGCT
TCTGAAGAGC	ACCTCGGTGT		
701	TTGCCCGCTG	CCACCCTCTG	GTGGACCCCG
AGCCTTTTGT	GGCCCTGTGT		
751	GAGAAGACTT	TGTGTGAGTG	TGCTGGGGGG
CTGGAGTGCG	CCTGCCCTGC		
801	CCTCCTGGAG	TACGCCCGGA	CCTGTGCCCA
GGAGGGAATG	GTGCTGTACG		
851	GCTGGACCGA	CCACAGCGCG	TGCAGCCAG
TGTGCCCTGC	TGGTATGGAG		
901	TATAGGCAGT	GTGTGTCCCC	TTGCGCCAGG
ACCTGCCAGA	GCCTGCACAT		
951	CAATGAAATG	TGTCAGGAGC	GATGCGTGGA
TGGCTGCAGC	TGCCCTGAGG		
1001	GACAGCTCCT	GGATGAAGGC	CTCTGCGTGG
AGAGCACCGA	GTGTCCCTGC		
1051	GTGCATTCCG	GAAAGCGCTA	CCCTCCCGGC
ACCTCCCTCT	CTCGAGACTG		
1101	CAACACCTGC	ATTTGCCGAA	ACAGCCAGTG
GATCTGCAGC	AATGAAGAAT		
1151	GTCCAGGGGA	GTGCCTTGTC	ACTGGTCAAT
CCCACTTCAA	GAGCTTTGAC		
1201	AACAGATACT	TCACCTTCAG	TGGGATCTGC
CAGTACCTGC	TGGCCCGGGA		
1251	TTGCCAGGAC	CACTCCTTCT	CCATTGTCAT
TGAGACTGTC	CAGTGTGCTG		
1301	ATGACCGCGA	CGCTGTGTGC	ACCCGCTCCG
TCACCGTCCG	GCTGCCTGGC		
1351	CTGCACAACA	GCCTTGTGAA	ACTGAAGCAT
GGGCAGGAG	TTGCCATGGA		
1401	TGGCCAGGAC	ATCCAGCTCC	CCCTCCTGAA
AGGTGACCTC	CGCATCCAGC		
1451	ATACAGTGAC	GGCCTCCGTG	CGCCTCAGCT
ACGGGGAGGA	CCTGCAGATG		
1501	GACTGGGATG	GCCGCGGGAG	GCTGCTGCTG
AAGCTGTCCC	CCGTCTATGC		
1551	CGGGAGGACC	TGCGGCCTGT	GTGGGAATTA
CAATGGCAAC	CAGGGCGACG		
1601	ACTTCTTAC	CCCCTCTGGG	CTGGCRGAGC
CCCGGGTGGG	GGACTTCGGG		
1651	AACGCCCTGGA	AGCTGCACGG	GGACTGCCAG
GACCTGCAGA	AGCAGCACAG		
1701	CGATCCCTGC	GCCCTCAACC	CGGCATGAC
CAGGTTCTCC	GAGGAGGCGT		
1751	GCGCGTCCT	GACGTCCCCC	ACATTGAGG
CCTGCCATCG	TGCCGTCAGC		
1801	CCGCTGCCT	ACCTGCGGAA	CTGCCGCTAC
GACGTGTGCT	CCTGCTCGGA		
1851	CGGCCGCGAG	TGCCTGTGCG	GCGCCCTGGC
CAGCTATGCC	GCGCCCTGCG		
1901	CGGGGAGAGG	CGTGCGCGTC	GCGTGGCGCG
AGCCAGGCCG	CTGTGAGCTG		
1951	AACTGCCCGA	AAGGCCAGGT	GTACCTGCAG
TGCGGGACCC	CCTGCAACCT		
2001	GACCTGCCGC	TCTCTCTCTT	ACCCGGATGA
GGAATGCAAT	GAGGCCTGCC		

2051	TGGAGGGCTG	CTTCTGCCCC	CCAGGGCTCT
ACATGGATGA	GAGGGGGGAC		
2101	TGCGTGCCCA	AGGCCAGTG	CCCCTGTTAC
TATGACGGTG	AGATCTTCCA		
2151	GCCAGAAGAC	ATCTTCTCAG	ACCATCACAC
CATGTGCTAC	TGTGAGGATG		
2201	GCTTCATGCA	CTGTACCATG	AGTGGAGTCC
CCGGAAGCTT	GCTGCCTGAC		
2251	GCTGTCTCTCA	GCAGTCCCCT	GTCTCATCGC
AGCAAAAGGA	GCCTATCCTG		
2301	TCGGCCCCC	ATGGTCAAGC	TGGTGTGTCC
CGCTGACAAC	CTGCGGGCTG		
2351	AAGGGCTCGA	GTGTACCAA	ACGTGCCAGA
ACTATGACCT	GGAGTGCATG		
2401	AGCATGGGCT	GTGTCTCTGG	CTGCCTCTGC
CCCCCGGCA	TGGTCCGGCA		
2451	TGAGAACAGA	TGTGTGGCCC	TGAAAAGGTG
TCCCTGCTTC	CATCAGGGCA		
2501	AGGAGTATGC	CCCTGGAGAA	ACAGTGAAGA
TTGGCTGCAA	CACTTGTGTC		
2551	TGTCGGGACC	GAAAGTGGAA	CTGCACAGAC
CATGTGTGTG	ATGCCACGTG		
2601	CTCCACGATC	GGCATGGCCC	ACTACCTCAC
CTTCGACGGG	CTCAAATACC		
2651	TGTTCCCCGG	GGAGTGCCAG	TACGTTCTGG
TGCAGGATTA	CTGCGGCAGT		
2701	AACCCTGGGA	CCTTTCGGAT	CCTAGTGGGG
AATAAGGGAT	GCAGCCACCC		
2751	CTCAGTGAAG	TGCAAGAAAC	GGTCCACCAT
CCTGGTGGAG	GGAGGAGAGA		
2801	TTGAGCTGTT	TGACGGGGAG	GTGAATGTGA
AGAGGCCCAT	GAAGGATGAG		
2851	ACTCACTTTG	AGGTGGTGGGA	GTCTGGCCGG
TACATCATTC	TGCTGCTGGG		
2901	CAAAGCCCTC	TCCGTGGTCT	GGGACCGCCA
CCTGAGCATC	TCCGTGGTCC		
2951	TGAAGCAGAC	ATACCAGGAG	AAAGTGTGTG
GCCTGTGTGG	GAATTTTGAT		
3001	GGCATCCAGA	ACAATGACCT	CACCAGCAGC
AACCTCCAAG	TGGAGGAAGA		
3051	CCCTGTGGAC	TTTGGGAACT	CCTGGAAAAGT
GAGCTCGCAG	TGTGCTGACA		
3101	CCAGAAAAGT	GCCTCTGGAC	TCATCCCCTG
CCACCTGCCA	TAACAACATC		
3151	ATGAAGCAGA	CGATGGTGGGA	TTCCTCCTGT
AGAATCCTTA	CCAGTGACGT		
3201	CTTCCAGGAC	TGCAACAAGC	TGGTGGACCC
CGAGCCATAT	CTGGATGTCT		
3251	GCATTTACGA	CACCTGTCTC	TGTGAGTCCA
TTGGGGACTG	CGCCTGCTTC		
3301	TGCGACACCA	TTGCTGCCTA	TGCCACGTG
TGTGCCAGC	ATGGCAAGGT		
3351	GGTGACCTGG	AGGACGGCCA	CATGTGTGCC
CCAGAGCTGC	GAGGAGAGGA		
3401	ATCTCCGGGA	GAACGGGTAT	GAGTGTGAGT
GGCGTATAA	CAGCTGTGCA		
3451	CCTGCCTGTC	AAGTCACGTG	TCAGCACCTT
GAGCCACTGG	CCTGCCCTGT		
3501	GCAGTGTGTG	GAGGGCTGCC	ATGCCCACTG
CCCTCCAGGG	AAAATCCTGG		
3551	ATGAGCTTTT	GCAGACCTGC	GTTGACCCTG
AAGACTGTCC	AGTGTGTGAG		
3601	GTGGCTGGCC	GGCGTTTTCG	CTCAGGAAAG
AAAGTCACCT	TGAATCCCAG		

3651	TGACCTGAG	CACTGCCAGA	TTTGCCACTG
TGATGTTGTC	AACCTCACCT		
3701	GTGAAGCCTG	CCAGGAGCCG	GGAGGCCTGG
TGGTGCCCTCC	CACAGATGCC		
3751	CCGGTGAGCC	CCACCACTCT	GTATGTGGAG
GACATCTCGG	AACCGCCGTT		
3801	GCACGATTC	TACTGCAGCA	GGCTACTGGA
CCTGGTCTTC	CTGCTGGATG		
3851	GCTCCTCCAG	GCTGTCCGAG	GCTGAGTTTG
AAGTGCTGAA	GGCCTTTGTG		
3901	GTGGACATGA	TGGAGCGGCT	GCGCATCTCC
CAGAAGTGGG	TCCGCGTGGC		
3951	CGTGGTGGAG	TACCACGACG	GCTCCCACGC
CTACATCGGG	CTCAAGGACC		
4001	GGAAGCGACC	GTCAGAGCTG	CGGCGCATTG
CCAGCCAGGT	GAAGTATGCG		
4051	GGCAGCCAGG	TGGCCTCCAC	CAGCGAGGTC
TTGAAATACA	CACTGTTCCA		
4101	AATCTTCAGC	AAGATCGACC	GCCCTGAAGC
CTCCCGCATC	GCCCTGTCTC		
4151	TGATGGCCAG	CCAGGAGCCC	CAACGGATGT
CCCGGAACTT	TGTCGGCTAC		
4201	GTCCAGGGCC	TGAAGAAGAA	GAAGGTCATT
GTGATCCCGG	TGGGCATTGG		
4251	GCCCCATGCC	AACCTCAAGC	AGATCCGCTT
CATCGAGAAG	CAGGCCCTG		
4301	AGAACAAGGC	CTTCGTGCTG	AGCAGTGTGG
ATGAGCTGGA	GCAGCAAAGG		
4351	GACGAGATCG	TTAGCTACCT	CTGTGACCTT
GCCCCTGAAG	CCCCTCTCTC		
4401	TACTCTGCCC	CCCGACATGG	CACAAGTCAC
TGTGGGCCCG	GGGCTCTTGG		
4451	GGGTTTCGAC	CCTGGGGCCC	AAGAGGAACT
CCATGGTTCT	GGATGTGGCG		
4501	TTCGTCCTGG	AAGGATCGGA	CAAAATTGGT
GAAGCCGACT	TCAACAGGAG		
4551	CAAGGAGTTC	ATGGAGGAGG	TGATTCAGCG
GATGGATGTG	GGCCAGGACA		
4601	GCATCCACGT	CACGGTGCTG	CAGTACTCCT
ACATGGTGAC	CGTGGAGTAC		
4651	CCCTTCAGCG	AGGCACAGTC	CAAAGGGGAC
ATCCTGCAGC	GGGTGCGAGA		
4701	GATCCGCTAC	CAGGGCGGCA	ACAGGACCAA
CACTGGGCTG	GCCCTGCGGT		
4751	ACCTCTCTGA	CCACAGCTTC	TTGGTCAGCC
AGGGTGACCG	GGAGCAGGCG		
4801	CCCAACCTGG	TCTACATGGT	CACCGGAAAT
CCTGCCTCTG	ATGAGATCAA		
4851	GAGGCTGCCT	GGAGACATCC	AGGTGGTGCC
CATTGGAGTG	GGCCCTAATG		
4901	CCAACGTGCA	GGAGCTGGAG	AGGATTGGCT
GGCCCAATGC	CCCTATCCTC		
4951	ATCCAGGACT	TTGAGACGCT	CCCCCGAGAG
GCTCCTGACC	TGGTGCTGCA		
5001	GAGGTGCTGC	TCCGGAGAGG	GGCTGCAGAT
CCCCACCCTC	TCCCCTGCAC		
5051	CTGACTGCAG	CCAGCCCCTG	GACGTGATCC
TTCTCCTGGA	TGGCTCCTCC		
5101	AGTTTCCCAG	CTTCTTATTT	TGATGAAATG
AAGAGTTTCG	CCAAGGCTTT		
5151	CATTTCAAAA	GCCAATATAG	GGCCTCGTCT
CACTCAGGTG	TCAGTGTCTC		
5201	AGTATGGAAG	CATCACCACC	ATTGACGTGC
CATGGAACGT	GGTCCCGGAG		



5251	AAAGCCCAT	TGCTGAGCCT	TGTGGACGTC
ATGCAGCGGG	AGGGAGGCC		
5301	CAGCCAAATC	GGGGATGCCT	TGGGCTTTGC
TGTGCGATAC	TTGACTTCAG		
5351	AAATGCATGG	TGCCAGGCCG	GGAGCCCAA
AGGCGGTGGT	CATCCTGGTC		
5401	ACGGACGTCT	CTGTGGATTC	AGTGGATGCA
GCAGCTGATG	CCGCCAGGTC		
5451	CAACAGAGTG	ACAGTGTTC	CTATTGGAAT
TGGAGATCGC	TACGATGCAG		
5501	CCCAGCTACG	GATCTTGGCA	GGCCCAGCAG
GCGACTCCAA	CGTGGTGAAG		
5551	CTCCAGCGAA	TCGAAGACCT	CCCTACCATG
GTCACCTTGG	GCAATTCCTT		
5601	CCTCCAAAA	CTGTGCTCTG	GATTTGTTAG
GATTTGCATG	GATGAGGATG		
5651	GGAAATGAGAA	GAGGCCCGGG	GACGTCTGGA
CCTTGCCAGA	CCAGTGCCAC		
5701	ACCGTGACTT	GCCAGCCAGA	TGGCCAGACC
TTGCTGAAGA	GTCATCGGGT		
5751	CAACTGTGAC	CGGGGGCTGA	GGCCTTCGTG
CCCTAACAGC	CAGTCCCTTG		
5801	TTAAAGTGGAA	AGAGACCTGT	GGCTGCCGCT
GGACCTGCC	CTGYGTGTGC		
5851	ACAGGCAGCT	CCACTCGGCA	CATCGTGACC
TTTGATGGGC	AGAATTTCAA		
5901	GCTGACTGGC	AGCTGTCTTT	ATGTCCTATT
TCAAAACAAG	GAGCAGGACC		
5951	TGGAGGTGAT	TCTCCATAAT	GGTGCCTGCA
GCCCTGGAGC	AAGGCAGGCC		
6001	TGCATGAAAT	CCATCGAGGT	GAAGCACAGT
GCCCTCTCCG	TCGAGSTGCA		
6051	CAGTGACATG	GAGGTGACGG	TGAATGGGAG
ACTGGTCTCT	GTTCTTACG		
6101	TGGGTGGGAA	CATGGAAGTC	AACGTTTATG
GTGCCATCAT	GCATGAGGTC		
6151	AGATTCAATC	ACCTTGGTCA	CATCTTCACA
TTCCTCCAC	AAAACATGA		
6201	GTTCCAATG	CAGCTCAGCC	CCAAGACTTT
TGCTTCAAAG	ACGTATGGTC		
6251	TGTGTGGGAT	CTGTGATGAG	AACGGAGCCA
ATGACTTCAT	GCTGAGGGAT		
6301	GGCACAGTCA	CCACAGACTG	GAAAACACTT
GTTCAGGAAT	GGACTGTGCA		
6351	GCGGCCAGGG	CAGACGTGCC	AGCCCATCCT
GGAGGAGCAG	TGTCTTGTCC		
6401	CCGACAGCTC	CCACTGCCAG	GTCCTCTCT
TACCACTGTT	TGCTGAATGC		
6451	CACAAGGTCC	TGGCTCCAGC	CACATTCTAT
GCCATCTGCC	AGCAGGACAG		
6501	TTGCCACCAG	GAGCAAGTGT	GTGAGGTGAT
CGCCTTTAT	GCCCACCTCT		
6551	GTCGGACCAA	CGGGGTCTGC	GTTGACTGGA
GGACACCTGA	TTTCTGTGCT		
6601	ATGTCATGCC	CACCATCTCT	GGTCTACAAC
CACTGTGAGC	ATGGCTGTCC		
6651	CCGGCACTGT	GATGGCAACG	TGAGCTCCTG
TGGGACCAT	CCCTCCGAAG		
6701	GCTGTTTCTG	CCCTCCAGAT	AAAGTCATGT
TGGAAGGCAG	CTGTGTCCCT		
6751	GAAGAGGCC	GCACTCAGTG	CATTGGTGAG
GATGGAGTCC	AGCACCAGTT		
6801	CCTGGAAGCC	TGGGTCCCGG	ACCACCAGCC
CTGTCAGATC	TGCACATGCC		

6851	TCAGCGGGCG	GAAGGTCAAC	TGCACAACGC
AGCCCTGCCC	CACGGCCAAA		
6901	GCTCCACAGT	GTGGCCTGTG	TGAAGTAGCC
CGCCTCCGCC	AGAATGCAGA		
6951	CCAGTGTGTC	CCCGAGTATG	AGTGTGTGTG
TGACCCAGTG	AGCTGTGACC		
7001	TGCCCCAGT	GCCTCACTGT	GAACGTGGCC
TCCAGCCAC	ACTGACCAAC		
7051	CCTGGCGAGT	GCAGACCCAA	CTTCACCTGC
GCCTGCAGGA	AGGAGGAGTG		
7101	CAAAAGAGTG	TCCCCACCCT	CCTGCCCCCC
GCACCGTTTG	CCCACCCTTC		
7151	GGAAGACCCA	GTGCTGTGAT	GAGTATGAGT
GTGCCTGCAA	CTGTGTCAAC		
7201	TCCACAGTGA	GCTGTCCCCT	TGGTACTTGT
GCCTCAACCG	CCACCAATGA		
7251	CTGTGGCTGT	ACCACAACCA	CCTGCCTTCC
CGACAAGGTG	TGTGTCCACC		
7301	GAAGCACCAT	CTACCCTGTG	GGCCAGTTCT
GGGAGGAGGG	CTGCGATGTG		
7351	TGCACCTGCA	CCGACATGGA	GGATGCCGTG
ATGGGCCTCC	GCGTGGCCCA		
7401	GTGCTCCAG	AAGCCCTGTG	AGGACAGCTG
TGGTCCGGGC	TTCACCTACG		
7451	TTCTGCATGA	AGGCGAGTGC	TGTGGAAGGT
GCCTGCCATC	TGCCTGTGAG		
7501	GTGGTGACTG	GCTCACCGCG	GGGGACTTCC
CAGTCTTCCCT	GGAAGAGTGT		
7551	CGGCTCCAG	TGGGCCTCCC	CGGAGAACCC
CTGCCTCATC	AATGAGTGTG		
7601	TCCGAGTGAA	GGAGGAGGTC	TTTATACAAC
AAAGGAACGT	CTCCTGCCCC		
7651	CAGCTGGAGG	TCCCTGTCTG	CCCCTCGGGC
TTTCAGCTGA	GCTGTAAGAC		
7701	CTCAGCGTGC	TGCCAAGCT	GTGCTGTGA
GCGCATGGAG	GCCTGCATGC		
7751	TCAATGGCAC	TGTCATGGG	CCCGGAAGA
CTGTGATGAT	CGATGTGTGC		
7801	ACGACCTGCC	GCTGCATGGT	GCAGGTGGGG
GTCATCTCTG	GATTCAGCT		
7851	GGAGTGCAGG	AAGACCACCT	GCAACCCCTG
CCCCCTGGGT	TACAAGGAAG		
7901	AAAATAACAC	AGGTGAATGT	TGTGGGAGAT
GTTTGCCTAC	GGCTTGCACC		
7951	ATTCAGCTAA	GAGGAGGACA	GATCATGACA
CTGAAGCGTG	ATGAGACGCT		
8001	CCAGGATGGC	TGTGATACTC	ACTTCTGCAA
GGTCAATGAG	AGAGGAGAGT		
8051	ACTTCTGGGA	GAAGAGGGTC	ACAGGCTGCC
CACCCTTTGA	TGAACACAAG		
8101	TGTCTTGCTG	AGGGAGGTAA	AATTATGAAA
ATTCCAGGCA	CCTGCTGTGA		
8151	CACATGTGAG	GAGCCTGAGT	GCAACGACAT
CACTGCCAGG	CTGCAGTATG		
8201	TCAAGGTGGG	AAGCTGTAAG	TCTGAAGTAG
AGGTGGATAT	CCACTACTGC		
8251	CAGGGCAAAT	GTGCCAGCAA	AGCCATGTAC
TCCATTGACA	TCAACGATGT		
8301	GCAGGACCAG	TGCTCCTGCT	GCTCTCCGAC
ACGGACGGAG	CCCATGCAGG		
8351	TGGCCCTGCA	CTGCACCAAT	GGCTCTGTTG
TGTACCATGA	GGTCTCAAT		
8401	GCCATGGAGT	GCAATGCTC	CCCAGGAAG
GA	TGCAGCAAGT		

Белок VWF, в используемом в данном документе значении, может содержать домен D' и домен D3 VWF, причем белок VWF связывается с FVIII и ингибирует связывание эндогенного VWF (полноразмерного VWF) с FVIII. Белок VWF, содержащий домен D' и домен D3, может дополнительно содержать домен VWF, выбранный из домена A1, домена A2, домена A3, домена D1, домена D2, домена D4, домена B1, домена B2, домена B3, домена C1, домена C2, домена CK, одного или более их фрагментов, или любую их комбинацию. В одном варианте реализации изобретения белок VWF содержит, состоит, по существу, из, или состоит из: (1) доменов D' и D3 VWF или их фрагментов; (2) доменов D1, D' и D3 VWF или их фрагментов; (3) доменов D2, D' и D3 VWF или их фрагментов; (4) доменов D1, D2, D' и D3 VWF или их фрагментов; или (5) доменов D1, D2, D', D3 или A1 VWF или их фрагментов. Белок VWF, описанный в данном документе, не содержит сайта связывания рецептора клиренса VWF. Белок VWF по настоящему изобретению может содержать любые другие последовательности, связанные с или слитые с белком VWF. Например, белок VWF, описанный в данном документе, может дополнительно содержать сигнальный пептид.

В одном варианте реализации изобретения белок VWF связывается с или ассоциирован с белком FVIII. Благодаря связыванию с или ассоциации с белком FVIII, белок VWF по изобретению может защищать FVIII от расщепления протеазами и активации FVIII, стабилизирует тяжелую цепь и легкую

цепь FVIII и предотвращает клиренс FVIII фагоцитарными рецепторами. В другом варианте реализации изобретения белок VWF связывается с или ассоциирует с белком FVIII и блокирует или предотвращает связывание белка FVIII с фосфолипидом и активированным белком С. В результате предотвращения или ингибирования связывания белка FVIII с эндогенным полноразмерным VWF, белок VWF по изобретению уменьшает клиренс FVIII рецепторами клиренса эндогенного VWF и, таким образом, увеличивает период полувыведения белка FVIII. Увеличение периода полувыведения белка FVIII, таким образом, вызвано ассоциацией белка FVIII с белком VWF с отсутствующим сайтом связывания рецептора клиренса VWF и, тем самым, экранирования и/или защиты белка FVIII от эндогенного VWF, который содержит сайт связывания рецептора клиренса VWF. Белок FVIII, связанный с или защищенный белком VWF, может также обеспечить возможность рециркуляции белка FVIII. Благодаря устранению сайтов связывания рецепторов пути клиренса VWF в полноразмерной молекуле VWF, гетеродимеры FVIII/VWF по изобретению защищены от пути клиренса VWF, что дополнительно увеличивает период полувыведения FVIII.

В одном варианте реализации изобретения белок VWF по настоящему изобретению содержит домен D' и домен D3 VWF, причем домен D' является по меньшей мере на около 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичным аминокислотам 764-866 SEQ ID NO: 2, и белок VWF предотвращает связывание эндогенного VWF с FVIII. В другом варианте реализации изобретения белок VWF содержит домен D' и домен D3 VWF, причем домен D3 является по меньшей мере на 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичным аминокислотам 867-1240 SEQ ID NO: 2, и белок VWF предотвращает связывание эндогенного VWF с FVIII. В некоторых вариантах реализации изобретения белок VWF, описанный в данном документе, содержит, состоит по существу из, или состоит из домена D' и домена D3 VWF, которые являются по меньшей мере на 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичными аминокислотам 764-1240 SEQ ID NO: 2, и белок VWF предотвращает связывание эндогенного VWF с FVIII. В других вариантах реализации изобретения белок VWF содержит, состоит, по существу, из, или состоит из доменов D1, D2, D' и D3, по меньшей мере на 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичных аминокислотам 23-1240 SEQ ID NO: 2, и белок VWF предотвращает связывание эндогенного VWF с FVIII. В еще одних вариантах реализации изобретения белок VWF дополнительно содержит функционально связанный с ним сигнальный пептид. В некоторых вариантах реализации изобретения белок VWF по изобретению состоит, по существу, из или состоит из (1) домена D'D3, домена D1D'D3, домена D2D'D3 или домена D1D2D'D3, и (2) дополнительной последовательности VWF, содержащей до около 10 аминокислот (например, любых последовательностей от аминокислоты 764-1240 SEQ ID NO: 2 до аминокислоты 764-1250 SEQ ID NO: 2), до около 15 аминокислот (например, любых последовательностей от аминокислоты 764-1240 SEQ ID NO: 2 до аминокислоты 764-1255 SEQ ID NO: 2), до около 20 аминокислот (например, любых последовательностей от аминокислоты 764-1240 SEQ ID NO: 2 до аминокислоты 764-1260 SEQ ID NO: 2), до около 25 аминокислот (например, любых последовательностей от аминокислоты 764-1240 SEQ ID NO: 2 до аминокислоты 764-1265 SEQ ID NO: 2), или до около 30 аминокислот (например, любых последовательностей от аминокислоты 764-1240 SEQ ID NO: 2 до аминокислоты 764-1260 SEQ ID NO: 2). В конкретном варианте реализации изобретения белок VWF, содержащий или состоящий по существу из домена D' и домена D3, не является аминокислотами 764-1274 SEQ ID NO: 2 или полноразмерным зрелым VWF. В некоторых вариантах реализации изобретения домен D1D2 экспрессируется в транс-конфигурации с доменом D'D3. В некоторых вариантах реализации изобретения домен D1D2 экспрессируется в цис-конфигурации с доменом D'D3.

В других вариантах реализации изобретения белок VWF, содержащий домены D'D3, связанные с доменами D1D2, дополнительно содержит внутриклеточный сайт процессинга, например, (сайт процессинга PACE (фурина) или PC5), что обеспечивает возможность отщепления доменов D1D2 от доменов D'D3 после экспрессии. Неограничивающие примеры внутриклеточных сайтов процессинга раскрыты в других разделах данного документа.

В других вариантах реализации изобретения белок VWF содержит домен D' и домен D3, но не содержит аминокислотной последовательности, выбранной из (1) аминокислот 1241-2813 SEQ ID NO: 2, (2) от аминокислоты 1270 до аминокислоты 2813 SEQ ID NO: 2, (3) от аминокислоты 1271 до аминокислоты 2813 SEQ ID NO: 2, (4) от аминокислоты 1272 до аминокислоты 2813 SEQ ID NO: 2, (5) от аминокислоты 1273 до аминокислоты 2813 SEQ ID NO: 2, (6) от аминокислоты 1274 до аминокислоты 2813 SEQ ID NO: 2, или любую их комбинацию.

В еще одних вариантах реализации изобретения белок VWF по настоящему изобретению содержит, состоит, по существу, из, или состоит из аминокислотной последовательности, соответствующей домену D', домену D3 и домену A1, причем аминокислотная последовательность является по меньшей мере на 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной аминокислотам 764-1479 SEQ ID NO: 2, и белок VWF предотвращает связывание эндогенного VWF с FVIII. В конкретном варианте реализации изобретения белок VWF не является аминокислотами 764-1274 SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения белок VWF по изобретению содержит домен D' и домен D3, но не содержит по меньшей мере одного домена VWF, выбранного из (1) домена A1, (2) домена A2, (3) домена A3, (4) домена D4, (5) домена B1, (6) домена B2, (7) домена B3, (8) домена C1, (9) домена C2, (10) домена CK, (11) домена CK и домена C2, (12) домена CK, домена C2 и домена C1, (13) до-

мена СК, домена С2, домена С1, домена В3, (14) домена СК, домена С2, домена С1, домена В3, домена В2, (15) домена СК, домена С2, домена С1, домена В3, домена В2 и домена В1, (16) домена СК, домена С2, домена С1, домена В3, домена В2, домена В1 и домена D4, (17) домена СК, домена С2, домена С1, домена В3, домена В2, домена В1, домена D4 и домена А3, (18) домена СК, домена С2, домена С1, домена В3, домена В2, домена В1, домена D4, домена А3 и домена А2, (19) домена СК, домена С2, домена С1, домена В3, домена В2, домена В1, домена D4, домена А3, домена А2 и домена А1, или (20) любую их комбинацию.

В других вариантах реализации изобретения белок VWF содержит домены D'D3 и один или более доменов или модулей. Примеры таких доменов или модулей включают, без ограничений, домены и модули, раскрытые в Zhou et al., Blood, интернет-публикация 6 апреля 2012 г: DOI 10.1182/blood-2012-01-405134. Например, белок VWF, может содержать домен D'D3 и один или более доменов или модулей, выбранных из домена А1, домена А2, домена А3, модуля D4N, модуля VWD4, модуля С8-4, модуля TIL-4, модуля С1, модуля С2, модуля С3, модуля С4, модуля С5, модуля С5, модуля С6 или любую их комбинацию.

В определенных вариантах реализации изобретения белок VWF по изобретению образует мультимер, например димер, тример, тетрамер, пентамер, гексамер, гептамер или мультимеры более высокого порядка. В других вариантах реализации изобретения белок VWF представляет собой мономер, содержащий только один белок VWF. В некоторых вариантах реализации изобретения белок VWF по настоящему изобретению может иметь одно или более аминокислотных замещений, делеций, добавлений или модификаций. В одном варианте реализации изобретения белок VWF может включать аминокислотные замещения, делеций, добавления или модификации, так чтобы белок VWF был неспособен образовывать дисульфидную связь или образовывать димер или мультимер. В другом варианте реализации изобретения аминокислотное замещение находится внутри домена D' и домена D3. В конкретном варианте реализации изобретения белок VWF по изобретению содержит по меньшей мере одно аминокислотное замещение в остатке, соответствующем остатку 1099, остатку 1142, или обоим остаткам 1099 и 1142 SEQ ID NO: 2. По меньшей мере одно аминокислотное замещение может быть любыми аминокислотами, которые не встречаются в природных условиях в VWF дикого типа. Например, аминокислотное замещение может быть любыми аминокислотами, отличными от цистеина, например изолейцином, аланином, лейцином, аспарагином, лизином, аспарагиновой кислотой, метионином, фенилаланином, глутаминовой кислотой, треонином, глутамином, триптофаном, глицином, валином, пролином, серином, тирозином, аргинином или гистидином. В другом примере, аминокислотное замещение содержит одну или более аминокислот, препятствующих или ингибирующих образование мультимеров белками VWF.

В некоторых вариантах реализации изобретения белок VWF содержит аминокислотное замещение цистеина на аланин в положении остатка 336, соответствующего домену D'D3 VWF (остаток 1099 SEQ ID NO: 2) и аминокислотное замещение цистеина на аланин в положении остатка 379, соответствующего домену D'D3 VWF (остаток 1142 SEQ ID NO: 2), или оба.

В определенных вариантах реализации изобретения белок VWF, пригодный для использования по данному документу, может быть дополнительно модифицирован с целью улучшения его взаимодействия с FVIII, например для улучшения аффинности связывания с FVIII. В качестве неограничивающего примера, белок VWF содержит остаток серина в положении остатка, соответствующего аминокислоте 764 SEQ ID NO: 2 и остаток лизина в положении остатка, соответствующего аминокислоте 773 SEQ ID NO: 2. Остатки 764 и/или 773 могут вносить свой вклад в аффинность связывания белков VWF с FVIII. В других вариантах реализации изобретения белок VWF, пригодный для использования по изобретению, может иметь другие модификации, например белок может быть пегилированным, гликозилированным, гэкилированным или полисиалилированным.

### II.C.3. Гетерологичный фрагмент.

Гетерологичный фрагмент, который может быть связан с белком VWF с помощью линкера VWF или с белком FVIII с помощью линкера FVIII, может быть гетерологичным полипептидом или гетерологичным неполипептидным фрагментом. В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент представляет собой молекулу, увеличивающую период полувыведения, которая известна в данной области техники и содержит полипептид, неполипептидный фрагмент, или комбинацию их обоих. Гетерологичный полипептидный фрагмент может содержать белок FVIII, константную область иммуноглобулина или ее участок, альбумин или его фрагмент, альбуминсвязывающий фрагмент, трансферрин или его фрагмент, последовательность PAS, последовательность NAP, их производное или вариант, С-концевой пептид (СТР)  $\beta$ -субъединицы хорионического гонадотропина человека, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах реализации изобретения неполипептидный связывающий фрагмент содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту, гидроксипропилкрахмал (ГЭК), их производное, или любую их комбинацию. В определенных вариантах реализации изобретения могут присутствовать один, два, три или больше гетерологичных фрагментов, которые могут быть все одинаковыми или разными молекулами.

#### II.C.3.a Константная область иммуноглобулина или ее часть.

Константная область иммуноглобулина состоит из доменов, обозначенных как домены СН (Con-

stant Heavy - константные тяжелые) (CH1, CH2 и т.д.). В зависимости от изогиота, (т.е. IgG, IgM, IgA, IgD или IgE), константная область может состоять из трех или четырех доменов CH. Константные области некоторых изогиотов (например, IgG) также содержат шарнирную область. См. Janeway et al. 2001, Immunobiology, Garland Publishing, N.Y., N.Y.

Константная область иммуноглобулина или ее участок для получения химерного белка по настоящему изобретению могут быть получены из ряда разных источников. В некоторых вариантах реализации изобретения константную область иммуноглобулина или ее участок выделяют из человеческого иммуноглобулина. Следует понимать, однако, что константная область иммуноглобулина или ее часть может быть выделены из иммуноглобулина другого вида млекопитающих, включая, например, грызуна (например, мышь, крысу, кролика, морскую свинку) или вида не являющегося человеком примата (например, шимпанзе, макак). Кроме того, константная область иммуноглобулина или ее часть могут быть выделены из иммуноглобулина любого класса, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изогиота иммуноглобулина, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В одном варианте реализации изобретения используется человеческий изотип IgG1. Различные генные последовательности константной области иммуноглобулина (например, генные последовательности человеческой константной области) являются доступными в форме публично доступных депозитариев. Могут быть выбраны последовательности доменов константной области, имеющие конкретную эффекторную функцию (или с отсутствующей конкретной эффекторной функцией), или с конкретной модификацией для снижения иммуногенности. Было опубликовано большое количество последовательностей антител и антитело-кодирующих генов, и пригодные последовательности константной области Ig (например, последовательности шарнира, CH2 и/или CH3, или их частей) могут быть выделены из таких последовательностей с использованием общепризнанных в данной области техники методов. Генетический материал, полученный с использованием любых из вышеописанных способов, может быть затем изменен или синтезирован для получения полипептидов по настоящему изобретению. Дополнительно следует понимать, что объем данного изобретения охватывает аллели, варианты и мутации последовательностей ДНК константной области. Последовательности константной области иммуноглобулина или ее части могут быть клонированы, например, с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и праймеров, выбранных для амплификации домена, представляющего интерес. Для клонирования последовательности константной области иммуноглобулина или ее части из антитела, мРНК может быть выделена из гибридомы, селезенки или лимфатических клеток, подвергнута обратной транскрипции в ДНК, и гены антитела могут быть амплифицированы методом ПНР. Способы амплификации с использованием ПЦР описаны подробно в патентах США № 4683195; 4683202; 4800159; 4965188; и, например, в "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications" Innis et al. eds., Academic Press, San Diego, CA (1990); Ho et al. 1989. Gene 77:51; Horton et al. 1993. Methods Enzymol. 217:270). Константная область иммуноглобулина, используемая в данном документе, может включать все домены и шарнирную область или их части. В одном варианте реализации изобретения константная область иммуноглобулина или ее часть содержит домен CH2, домен CH3 и шарнирную область, т.е. Fc-область или партнер связывания FcRn. В используемом в данном документе значении термин "Fc-область" определен как часть полипептида, соответствующая Fc-области нативного иммуноглобулина, т.е. образующаяся в результате димерной ассоциации соответствующих Fc-доменов ее двух тяжелых цепей. Нативная Fc-область образует гомодимер с другой Fc-областью. В одном варианте реализации изобретения "Fc-область" относится к части одной тяжелой цепи иммуноглобулина, начинающейся в шарнирной области сразу за сайтом расщепления папаином против хода транскрипции (т.е. остатком 216 в IgG, считая 114 первым остатком константной области тяжелой цепи), и заканчивающейся на С-конце антитела. Соответственно, полный домен Fc содержит, по меньшей мере, шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3. Fc-область константной области иммуноглобулина, в зависимости от изогиота иммуноглобулина, может включать домены CH2, CH3 и CH4, а также шарнирную область. Химерные белки, содержащие Fc-область иммуноглобулина, обладают несколькими желательными для химерных белков свойствами, включая повышенную стабильность, увеличенный период полувыведения из сыворотки (см. Caron et al., 1989, Nature 337:525), а также связывание с Fc-рецепторами, такими как неонатальный Fc-рецептор (FcRn) (патенты США № 6086875, 6485726, 6030613; WO 03/077834; US2003-0235536A1), которые включены в данный документ в качестве ссылок в полном объеме. Константная область иммуноглобулина или ее часть может быть партнером связывания FcRn. FcRn является активным в эпителиальных тканях взрослых и экспрессируется в полости кишечника, дыхательных путях легких, на носовых поверхностях, влажных поверхностях, поверхностях ободочной и прямой кишки (патент США № 6485726). Партнер связывания FcRn представляет собой часть иммуноглобулина, которая связывается с FcRn. Рецептор FcRn был выделен у нескольких видов млекопитающих, включая человека. Последовательности FcRn человека, FcRn обезьяны, FcRn крысы и FcRn мыши являются известными (Storgy et al. 1994, J. Exp. Med. 180:2377). Рецептор FcRn связывает IgG (но не другие классы иммуноглобулина, такие как IgA, IgM, IgD и IgE) при относительно низких pH, активно транспортирует IgG трансцеллюлярно в направлении от полости к сыворотке и затем высвобождает IgG при относительно более высоком pH, наблюдающемся во внутритканевых жидкостях. Он экспрессируется в эпителиальной ткани взрослых особей (патенты США № 6485726, 6030613, 6086875; WO 03/077834; US2003-0235536A1), включая эпи-

телий легкого и кишечника (Israel et al. 1997, *Immunology* 92:69), эпителий проксимальных почечных канальцев (Kobayashi et al. 2002, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282:F358), а также назальный эпителий, вагинальные поверхности и поверхности желчных протоков.

Партнеры связывания FcRn, пригодные для использования по настоящему изобретению, охватывают молекулы, которые могут специфически связываться FcRn-рецептором, включая цельный IgG, Fc-фрагмент IgG и другие фрагменты, которые включают полную область связывания рецептора FcRn. Область Fc-участка IgG, которая связывается с FcRn-рецептором, была описана на основе данных рентгеновской кристаллографии (Burmeister et al. 1994, *Nature* 372:379). Основной участок контакта Fc с FcRn находится возле места соединения доменов CH2 и CH3. Все контакты Fc-FcRn находятся на одной тяжелой цепи Ig. Партнеры связывания FcRn включают цельный IgG, Fc-фрагмент IgG и другие фрагменты IgG, которые включают полную область связывания FcRn. Основные контактные сайты включают аминокислотные остатки 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 и 314 домена CH2 и аминокислотные остатки 385-387, 428 и 433-436 домена CH3. Все приведенные указания нумерации аминокислот иммуноглобулинов или фрагментов или областей иммуноглобулинов основаны на системе Kabat et al. 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md.

Fc-области или партнеры связывания FcRn, связанные с FcRn, могут быть эффективно перемещены через эпителиальные барьеры с помощью FcRn, тем самым обеспечивая неинвазивные средства для системного введения желательной терапевтической молекулы. Дополнительно, слитые белки, содержащие Fc-область или партнера связывания FcRn, подвергаются эндоцитозу клетками, экспрессирующими FcRn. Но вместо того, чтобы служить метками для деградации, такие слитые белки снова высвобождаются в циркуляцию, тем самым увеличивая *in vivo* период полувыведения таких белков. В определенных вариантах реализации изобретения частями константной области иммуноглобулинов являются Fc-область или партнер связывания FcRn, которые типично ассоциируются, с помощью дисульфидных связей и других неспецифических взаимодействий, с другой Fc-областью или другим партнером связывания FcRn с образованием димеров и мультимеров более высокого порядка.

Область партнера связывания FcRn представляет собой молекулу или ее часть, которая может специфически связываться рецептором FcRn с последующим активным транспортом рецептором FcRn Fc-области. Специфически связанный относится к двум молекулам, образующим комплекс, являющийся относительно стабильным в физиологических условиях. Специфическое связывание характеризуется высокой аффинностью и от низкой до умеренной емкостью, в отличие от неспецифического связывания, которое обычно имеет низкую аффинность с емкостью от умеренной до высокой. Типично, связывание считается специфическим, если константа аффинности  $K_A$  имеет значение выше  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , или выше  $10^8 \text{ M}^{-1}$ . При необходимости, неспецифическое связывание может быть снижено без существенного влияния на специфическое связывание путем изменения условий связывания. Соответствующие условия связывания, такие как концентрация молекул, ионная сила раствора, температура, время связывания, концентрация блокирующего агента (например, сывороточный альбумин, казеин молока) и т.д., могут быть оптимизированы квалифицированным специалистом с использованием обычных методик.

Множество мутантов, фрагментов, вариантов и производных описаны, например, в публикациях РСТ № WO 2011/069164 A2, WO 2012/006623 A2, WO 2012/006635 A2 или WO 2012/006633 A2, которые все включены в данный документ в качестве ссылок в полном объеме.

#### II.C.3.b. Альбумин или его фрагмент или вариант.

В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент, связанный с белком VWF с помощью линкера VWF или связанный с белком FVIII с помощью линкера FVIII, представляет собой альбумин или его функциональный фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения альбумин, слитый с белком VWF, ковалентно ассоциирован с альбумином, слитым с белком FVIII. Человеческий сывороточный альбумин (HSA или HA), белок, состоящий из 609 аминокислот в его полноразмерной форме, отвечает за значительную часть осмотического давления сыворотки, а также выполняет функции носителя эндогенных и экзогенных лигандов. Термин "альбумин", в используемом в данном документе значении, включает полноразмерный альбумин или его функциональный фрагмент, вариант, производное или аналог. Примеры альбумина или его фрагментов или вариантов раскрыты в публикациях патентов США № 2008/0194481 A1, 2008/0004206 A1, 2008/0161243 A1, 2008/0261877 A1 или 2008/0153751 A1 или публикациях заявок РСТ № 2008/033413 A2, 2009/058322 A1 или 2007/021494 A2, которые включены в данный документ в качестве ссылок в полном объеме.

#### II.C.3.c. Альбуминсвязывающий фрагмент.

В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент, связанный с белком VWF с помощью линкера VWF или с белком FVIII с помощью линкера FVIII, представляет собой альбуминсвязывающий фрагмент, который содержит альбуминсвязывающий пептид, бактериальный альбуминсвязывающий домен, альбуминсвязывающий фрагмент антитела, или любую их комбинацию. Например, альбуминсвязывающий белок может быть бактериальным альбуминсвязывающим белком, антителом или фрагментом антитела, включая домен антитела (см. патент США № 6696245). Альбуминсвязывающий белок, например, может быть бактериальным альбуминсвязывающим доменом, таким как принадлежащий стрептококковому белку G (Konig, T. and Skerra, A. (1998) *J. Immunol. Methods* 218, 73-

83). Другими примерами альбуминсвязывающих пептидов, которые могут быть использованы в качестве партнера конъюгации, являются, например, пептиды, имеющие консенсусную последовательность Cys-Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Cys, где Xaa<sub>1</sub> обозначает Asp, Asn, Ser, Thr или Trp; Xaa<sub>2</sub> обозначает Asn, Gln, His, Ile, Leu или Lys; Xaa<sub>3</sub> обозначает Ala, Asp, Phe, Trp или Tyr; и Xaa<sub>4</sub> обозначает Asp, Gly, Leu, Phe, Ser или Thr, как описано в патентной заявке США 2003/0069395 или Dennis et al. (Dennis et al. (2002) J. Biol. Chem. 277, 35035-35043).

#### II.C.3.d. Последовательность PAS.

В других вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент, связанный с белком VWF с помощью линкера VWF или с белком FVIII с помощью линкера FVIII, представляет собой последовательность PAS. В одном варианте реализации изобретения химерная молекула содержит белок VWF, описанный в данном документе, слитый с последовательностью PAS с помощью линкера VWF. В другом варианте реализации изобретения химерная молекула по изобретению содержит первую цепь, содержащую белок VWF, слитый с последовательностью PAS с помощью линкера VWF, и вторую цепь, содержащую белок FVIII и дополнительную необязательную последовательность PAS, причем последовательность PAS экранирует или защищает сайт связывания VWF белка FVIII, тем самым ингибируя или предотвращая взаимодействие белка FVIII с эндогенным VWF. Две последовательности PAS могут быть ковалентно ассоциированы друг с другом.

Последовательность PAS, в используемом в данном документе значении, означает аминокислотную последовательность, содержащую преимущественно остатки аланина и серина, или содержащую преимущественно остатки аланина, серина и пролина, причем аминокислотная последовательность имеет в физиологических условиях конформацию случайного клубка. Соответственно, последовательность PAS представляет собой функциональный блок, аминокислотный полимер, или кассету последовательностей, содержащие, состоящие по существу из, или состоящие из аланина, серина и пролина, которые могут быть использованы как часть гетерологичного фрагмента в химерном белке. При этом, квалифицированный специалист понимает, что аминокислотный полимер также может принимать конформацию случайного клубка, если в последовательность PAS добавить остатки, отличные от аланина, серина и пролина в качестве неосновного компонента. Термин "неосновной компонент", в используемом в данном документе значении, означает, что аминокислоты, отличные от 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%, т.е. около 10 из 100 аминокислот последовательности PAS, до около 9%, т.е. около 9 из 100 аминокислот, до около 8%, т.е. около 8 из 100 аминокислот, около 6%, т.е. около 6 из 100 аминокислот, около 5%, т.е. около 5 из 100 аминокислот, около 4%, т.е. около 4 из 100 аминокислот, около 3%, т.е. около 3 из 100 аминокислот, около 2%, т.е. около 2 из 100 аминокислот, около 1%, т.е. около 1 из 100 аминокислот. Аминокислоты, отличные от аланина, серина и пролина, могут быть выбраны из группы, состоящей из Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr и Val.

В физиологических условиях, отрезок последовательности PAS образует конформацию случайного клубка и, тем самым, может медирировать повышенную *in vivo* и/или *in vitro* стабильность VWF фактора или белка, проявляющего активность при коагуляции. Поскольку домен случайного клубка сам по себе не образует стабильной структуры или не проявляет функции, то биологическая активность, медируемая белком VWF или белком FVIII, с которым он связан, в значительной степени сохраняется. В других вариантах реализации изобретения последовательности PAS, которые образуют домен случайного клубка, являются биологически инертными, особенно по отношению к протеолизу в плазме крови, иммуногенности, изоэлектрической точке/электростатическим свойствам, связыванию с рецепторами клеточной поверхности или интернализации изобретения, но остаются биodeградируемыми, что обеспечивает явные преимущества по сравнению с синтетическими полимерами, такими как ПЭГ.

Неограничивающие примеры последовательностей PAS, образующих конформацию случайного клубка, включают аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из ASPAA-PAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO: 32), AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (SEQ ID NO: 33), APSSPSPAPSSPSPASPSS (SEQ ID NO: 34), APSSPSPAPSSPSPASPS (SEQ ID NO: 35), SSPSAPSPSSPASPSSPA (SEQ ID NO: 36), AASPAAPSAPPAASPAAPSAPPA (SEQ ID NO: 37) и ASAAA-PAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO: 38) или любую их комбинацию. Дополнительные примеры последовательностей PAS известны, например, из публикации патента США № 2010/0292130 A1 и публикации заявки РСТ № WO 2008/155134 A1.

#### II.C.3.e. Последовательность НАР.

В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент, связанный с белком VWF с помощью линкера VWF или с белком FVIII с помощью линкера FVIII, представляет собой глицин-богатый гомоаминокислотный полимер (НАР). Последовательность НАР может содержать повторяющуюся последовательность глицина, имеющую длину 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 одном варианте реализации изобретения последовательность НАР способна увели-

чивать период полувыведения фрагмента, слитого с или связанного с последовательностью НАР. Неограничивающие примеры последовательности НАР включают, без ограничений,  $(\text{Gly})_n$ ,  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$  или  $\text{S}(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ , где  $n$  равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В одном варианте реализации изобретения  $n$  равен 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40. В другом варианте реализации изобретения  $n$  равен 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.C.3.f. Трансферрин или его фрагмент.

В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент, связанный с белком VWF с помощью линкера VWF или с белком FVIII с помощью линкера FVIII, представляет собой трансферрин или его фрагмент. Любой трансферрин может быть использован для получения химерных молекул по изобретению. В качестве примера, человеческий Tf (Tf) дикого типа представляет собой белок из 679 аминокислот, около 75 кДа (без учета гликозилирования), с двумя основными доменами - N (около 330 аминокислот) и C (около 340 аминокислот), который, по-видимому, образуется в результате дупликации гена. См. GenBank, номера доступа NM001063, XM002793, M12530, XM039845, XM 039847 и S95936 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)), которые все включены в данный документ в качестве ссылок в полном объеме. Трансферрин содержит два домена - N-домен и C-домен. N-домен содержит два субдомена - домен N1 и домен N2, и C-домен содержит два субдомена - домен C1 и домен C2.

В одном варианте реализации изобретения трансферриновая часть химерной молекулы включает сплайсинговый вариант трансферрина. В одном примере, сплайсинговый вариант трансферрина может быть сплайсинговым вариантом человеческого трансферрина, например Genbank, номер доступа AAA61140. В другом варианте реализации изобретения трансферриновая часть химерной молекулы включает один или более доменов последовательности трансферрина, например N-домен, C-домен, домен N1, домен N2, домен C1, домен C2 или любую их комбинацию.

#### II.C.3.g. Полимер, например полиэтиленгликоль (ПЭГ).

В других вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент, соединенный с белком VWF с помощью линкера VWF или с белком FVIII с помощью линкера FVIII, представляет собой растворимый полимер, известный в данной области техники, включая, без ограничений, полиэтиленгликоль, сополимеры этиленгликоль/пропиленгликоль, карбоксиметилцеллюлозу, декстран или поливиниловый спирт. Гетерологичный фрагмент, такой как растворимый полимер, может быть присоединен к любому положению в химерной молекуле.

В определенных вариантах реализации изобретения химерная молекула содержит белок VWF, связанный с гетерологичным фрагментом (например, Fc-областью) с помощью линкера VWF, причем белок VWF дополнительно связан с ПЭГ. В другом варианте реализации изобретения химерная молекула содержит белок VWF, соединенный с Fc-областью с помощью линкера VWF, и белок FVIII, которые ассоциированы друг с другом, причем белок FVIII соединен с ПЭГ.

Изобретение также предусматривает химически модифицированные производные химерной молекулы по изобретению, которые могут обеспечивать дополнительные преимущества, такие как повышенная растворимость, стабильность и время циркуляции полипептида, или пониженная иммуногенность (см. патент США № 4179337). Химические фрагменты для модификации могут быть выбраны из водорастворимых полимеров, включая, без ограничений, полиэтиленгликоль, сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран или поливиниловый спирт. Химерная молекула может быть модифицирована в случайных положениях внутри молекулы или на N- или C-конце, или в предварительно определенных положениях внутри молекулы, и могут включать один, два, три или больше присоединенных химических фрагментов.

Полимер может иметь любой молекулярный вес и могут быть разветвленным или неразветвленным. Для полиэтиленгликоля, в одном варианте реализации изобретения молекулярный вес имеет значение между около 1 кДа и около 100 кДа для простоты обращения и производства. Могут быть использованы другие размеры, в зависимости от желательного профиля (например, продолжительности желательного пролонгированного высвобождения, влияния, если оно наблюдается, на биологическую активность, простоты обращения, степени антигенности или ее отсутствия и других известных эффектов воздействия полиэтиленгликоля на белок или аналог). Например, полиэтиленгликоль может иметь средний молекулярный вес около 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10000, 10500, 11000, 11500, 12000, 12500, 13000, 13500, 14000, 14500, 15000, 15500, 16000, 16500, 17000, 17500, 18000, 18500, 19000, 19500, 20000, 25000, 30000, 35000, 40000, 45000, 50000, 55000, 60000, 65000, 70000, 75000, 80000, 85000, 90000, 95000 или 100000 кДа.

В некоторых вариантах реализации изобретения полиэтиленгликоль может иметь разветвленное строение. Разветвленные полиэтиленгликоли описаны, например, в патенте США № 5643575; Mognurgo et al, Appl. Biochem. Biotechnol. 56:59-72 (1996); Vorobjev et al., Nucleosides Nucleotides 18:2745-2750 (1999); и Caliceti et al, Bioconj. Chem. 10:638-646 (1999), которые все включены в данный документ в качестве ссылок в полном объеме.

Число фрагментов полиэтиленгликоля, присоединенных к каждой химерной молекуле (т.е. степень



замещения) также может меняться. Например, пегелированные белки по изобретению могут быть связаны в среднем с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20 или больше молекулами полиэтиленгликоля. Аналогично, средняя степень замещения (может иметь значение) в диапазоне, таком как 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 5-7, 6-8, 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15, 14-16, 15-17, 16-18, 17-19, или 18-20 фрагментов полиэтиленгликоль на молекулу белка. Способы определения степени замещения описаны, например, в Delgado et al, Crit. Rev. Them. Drug Carrier Sys. 9:249-304 (1992).

В других вариантах реализации изобретения белок FVIII, используемый в изобретении, конъюгирован с одним или более полимерами. Полимер может быть водорастворимым и ковалентно или нековалентно присоединенным к фактору VIII или другим фрагментам, конъюгированным с фактором VIII. Неограничивающими примерами полимера могут быть полиалкиленоксид, поливинилпирролидон, поливиниловый спирт, полиоксазолин или полиакрилоилморфолин. Дополнительные типы полимер-конъюгированного FVIII раскрыты в патенте США № 7199223.

II.C.3.b. Гидроксиэтилкрахмал (ГЭК).

В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент, связанный с белком VWF с помощью линкера VWF или с белком FVIII с помощью линкера FVIII, представляет собой полимер, например гидроксиэтилкрахмал (ГЭК) или его производное.

Гидроксиэтилкрахмал (ГЭК) представляет собой производное природного амилопектина и деградируется в организме альфа-амилазой. ГЭК представляет собой замещенное производное углеводного полимера амилопектина, который присутствует в кукурузном крахмале в концентрации до 95 мас.%. ГЭК проявляет полезные биологические свойства и используется как объемный кровезаменитель и в гемодилюционной терапии в клинических условиях (Sommermeyer et al., Krankenhauspharmazie, 8(8), 271-278 (1987); и Weidler et al., Arzneim.-Forschung/Drug Res., 41, 494-498 (1991)).

Амилопектин содержит фрагменты глюкозы, причем в основной цепи присутствуют альфа-1,4-гликозидные связи, а в узлах ветвления находятся альфа-1,6-гликозидные связи. Физико-химические свойства этой молекулы преимущественно определяются типом гликозидных связей. Вследствие одноцепочечных разрывов альфа-1,4-гликозидных связей образуются спиральные структуры с около шестью глюкозными мономерами на виток. Физико-химические, а также биохимические свойства полимера могут быть модифицированы путем замещения. Введение гидроксиэтильной группы может быть осуществлено путем щелочного гидроксиэтилирования. Изменяя реакционные условия, можно использовать разную реакционную способность соответствующей гидроксильной группы в незамещенном глюкозном мономере по отношению к гидроксиэтилированию. Благодаря этому, квалифицированный специалист способен, в ограниченной степени, влиять на характер замещения.

ГЭК преимущественно характеризуется распределением молекулярного веса и степенью замещения. Степень замещения, обозначаемая как DS, относится к молярному замещению, как известно квалифицированным специалистам. См. Sommermeyer et al., Krankenhauspharmazie, 8(8), 271-278 (1987), указанный выше, особенно на с. 273. В одном варианте реализации изобретения гидроксиэтилкрахмал имеет средний молекулярный вес (средневзвешенный) от 1 до 300 кДа, от 2 до 200 кДа, от 3 до 100 кДа, или от 4 до 70 кДа. Гидроксиэтилкрахмал может дополнительно обладать молярной степенью замещения от 0,1 до 3, предпочтительно от 0,1 до 2, более предпочтительно от 0,1 до 0,9, предпочтительно от 0,1 до 0,8, и соотношением между C2:C6 замещением в диапазоне значений от 2 до 20 по отношению к гидроксиэтильным группам. Неограничивающим примером ГЭК, имеющего средний молекулярный вес около 130 кДа, является ГЭК со степенью замещения от 0,2 до 0,8, такой как 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 или 0,8, предпочтительно от 0,4 до 0,7, такой как 0,4, 0,5, 0,6 или 0,7. В конкретном варианте реализации изобретения ГЭК со средним молекулярным весом около 130 кДа является продуктом VOLUVEN® фирмы Fresenius. VOLUVEN® представляет собой искусственный коллоид, применяемый, например, для объемного замещения, используемый по терапевтическим показаниям в терапии и профилактике гиповолемии. VOLUVEN характеризуется средним молекулярным весом 130000+/-20000 Да, молярным замещением 0,4 и соотношением C2:C6, равным около 9:1. В других вариантах реализации изобретения диапазоны значений среднего молекулярного веса гидроксиэтилкрахмала составляют, например, от 4 до 70 кДа, или от 10 до 70 кДа, или от 12 до 70 кДа, или от 18 до 70 кДа, или от 50 до 70 кДа, или от 4 до 50 кДа, или от 10 до 50 кДа, или от 12 до 50 кДа, или от 18 до 50 кДа, или от 4 до 18 кДа, или от 10 до 18 кДа, или от 12 до 18 кДа, или от 4 до 12 кДа, или от 10 до 12 кДа, или от 4 до 10 кДа. В еще других вариантах реализации изобретения средний молекулярный вес используемого гидроксиэтилкрахмала находится в диапазоне значений от более чем 4 кДа до менее чем 70 кДа, например около 10 кДа, или в диапазоне значений от 9 до 10 кДа или от 10 до 11 кДа или от 9 до 11 кДа, или около 12 кДа, или в диапазоне значений от 11 до 12 кДа) или от 12 до 13 кДа или от 11 до 13 кДа, или около 18 кДа, или в диапазоне значений от 17 до 18 кДа или от 18 до 19 кДа или от 17 до 19 кДа, или около 30 кДа, или в диапазоне значений от 29 до 30 или от 30 до 31 кДа, или около 50 кДа, или в диапазоне значений от 49 до 50 кДа или от 50 до 51 кДа или от 49 до 51 кДа. В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент может быть смесями гидроксиэтилкрахмалов, имеющих разные средние молекулярные веса и/или разные степени замещения и/или разные соотношения C2:C6 замещения. Таким образом, могут быть использованы сме-

си гидроксипроцеллюлоз, имеющих разные средние молекулярные веса и разные степени замещения и разные соотношения С2:С6 замещения, или имеющих имеющих разные средние молекулярные веса и разные степени замещения и одинаковые или примерно одинаковые соотношения С2:С6 замещения, или имеющих разные средние молекулярные веса и одинаковые или примерно одинаковые степени замещения и разные соотношения С2:С6 замещения, или имеющих одинаковый или примерно одинаковый средний молекулярный вес и разные степени замещения и разные соотношения С2:С6 замещения, или имеющих разные средние молекулярные веса и одинаковые или примерно одинаковые степени замещения и одинаковые или примерно одинаковые соотношения С2:С6 замещения, или имеющих одинаковые или примерно одинаковые средние молекулярные веса и разные степени замещения и одинаковые или примерно одинаковые соотношения С2:С6 замещения, или имеющих одинаковый или примерно одинаковый средний молекулярный вес и одинаковые или примерно одинаковые степени замещения и разные соотношения С2:С6 замещения, или имеющих примерно одинаковый средний молекулярный вес и примерно одинаковое соотношение С2:С6 замещения.

#### II.C.3.i. Полисиаловые кислоты (ПСК).

В определенных вариантах реализации изобретения непептидный гетерологичный фрагмент, связанный с белком VWF с помощью линкера VWF или с белком FVIII с помощью линкера FVIII, представляет собой полимер, например полисиаловые кислоты (ПСК) или их производное. Полисиаловые кислоты (ПСК) являются природными неразветвленными полимерами сиаловой кислоты, продуцируемыми определенными бактериальными штаммами и у млекопитающих в определенных клетках. 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. Они могут быть получены с различными степенями полимеризации от  $n \approx 80$  или больше остатков сиаловой кислоты и в меньшую сторону до  $n=2$ , путем ограниченного кислотного гидролиза, или путем ферментативного разложения нейраминидазами, или фракционированием природных бактериально вырабатываемых форм полимера. Композиция разных полисиаловых кислот также меняется таким образом, что существуют гомополимерные формы, т.е. альфа-2,8-связанная полисиаловая кислота, содержащая капсульный полисахарид штамма K1 E. coli и менингококков группы B, который также присутствует в эмбриональной форме молекулы адгезии нервных клеток (N-CAM). Существуют также гетерополимерные формы - такие как чередующаяся альфа-2,8 альфа-2,9 полисиаловая кислота штамма K92 E. coli и полисахариды группы C N. meningitidis. Сиаловая кислота может также присутствовать в чередующихся сополимерах с мономерами, отличными от сиаловой кислоты, такими как группа W135 или группа Y N. meningitidis. Полисиаловые кислоты обладают важными биологическими функциями, включая избежание воздействия иммунной системы и системы комплемента патогенными бактериями и регуляцию глиальной адгезивности незрелых нейронов во время развития плода (в которой полимер выполняет антиадгезивную функцию) Cho and Troy, P.N.A.S., USA, 91 (1994) 11427-11431, хотя рецепторы полисиаловой кислоты у млекопитающих неизвестны. Альфа-2,8-связанная полисиаловая кислота штамма K1 E. coli также известна как "коломиновая кислота" и используется (с различными длинами) для иллюстрации настоящего изобретения. Были описаны различные способы присоединения или конъюгации полисиаловых кислот к полипептиду (например, см. патент США № 5846951; WO-A-0187922 и US 2007/0191597 A1, которые включены в данный документ в качестве ссылок в полном объеме.

#### II.C.4. Последовательность XTEN.

В используемом в данном документе значении, "последовательность XTEN" относится к полипептидам увеличенной длины с неприродными, по существу неповторяющимися последовательностями, которые состоят преимущественно из малых гидрофильных аминокислот, с последовательностью, имеющей низкую степень или не имеющей вторичной или третичной структуры в физиологических условиях. В качестве партнера химерного белка, XTEN может служить носителем, обеспечивая определенные желательные фармакокинетические, физико-химические и фармацевтические свойства при связывании с белком VWF или белком FVIII по изобретению для получения химерного белка. Такие желательные свойства включают, без ограничений, улучшенные фармакокинетические параметры и характеристики растворимости. В используемом в данном документе значении, "XTEN" определено исключает антитела или фрагменты антител, такие как одноцепочечные антитела или Fc-фрагменты легкой цепи или тяжелой цепи.

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность XTEN по изобретению представляет собой пептид или полипептид, содержащий более чем около 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 определенных вариантах реализации изобретения XTEN представляет собой пептид или полипептид, содержащий 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 остатки, или от более чем 120 до около 400 остатков.

Последовательность ХТЕН по изобретению, может содержать один или более мотивов последовательности, состоящих из от 9 до 14 аминокислотных остатков, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную мотиву последовательности, причем мотив содержит, состоит, по существу, из, или состоит из 4-6 типов 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 реализации изобретения ХТЕН содержит неперекрывающиеся мотивы последовательности, 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 звеньев неперекрывающихся последовательностей, выбранных из одного семейства мотивов, выбранных из табл. 2А, с образованием последовательности семейства. В используемом в данном документе значении, "семейство" означает, что ХТЕН имеет мотивы, выбранные только из одной категории мотивов из табл. 2А; т.е. ХТЕН AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC или BD, и что любые другие аминокислоты в ХТЕН, не принадлежащие к мотивам семейства, выбирают для достижения требуемого свойства, такого как обеспечение возможности включения сайта рестрикции с помощью кодирующих нуклеотидов, включения расщепляемой последовательности, или достижение лучшей связи с FVIII или VWF. В некоторых вариантах реализации семейств ХТЕН, последовательность ХТЕН содержит множество звеньев неперекрывающихся мотивов последовательности 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, причем полученный ХТЕН демонстрирует диапазон значений гомологии, описанный выше. В других вариантах реализации изобретения ХТЕН содержит множество звеньев последовательностей мотива из двух или больше семейств мотивов из табл. 2А. Такие последовательности могут быть выбраны для достижения желательных физических/химических характеристик, включая такие свойства, как суммарный заряд, гидрофильность, отсутствие вторичной структуры, или отсутствие повторяемости, которые обеспечиваются аминокислотным составом мотивов, описанных более подробно ниже. В вариантах реализации изобретения описанных выше в данном абзаце, мотивы, включенные в ХТЕН, могут быть выбраны и собраны с использованием способов, описанных в данном документе, для получения ХТЕН, состоящего из от около 36 до около 3000 аминокислотных остатков.

Таблица 2А. Мотивы последовательности ХТЕН, состоящие из 12 аминокислот, и семейства мотивов

Семейство мотива*	Последовательность мотива
AD	GESPGGSSGSES (SEQ ID NO: 49)
AD	GSEGSSGPGESS (SEQ ID NO: 50)
AD	GSSSEGSSEGGP (SEQ ID NO: 51)
AD	GSGGEPSESGSS (SEQ ID NO: 52)
AE, AM	GSPAGSPTSTEE (SEQ ID NO: 53)
AE, AM, AQ	GSEPATSGSETP (SEQ ID NO: 54)
AE, AM, AQ	GTSESATPESGP (SEQ ID NO: 55)
AE, AM, AQ	GTSTEPSEGSAP (SEQ ID NO: 56)
AF, AM	GSTSESPSGTAP (SEQ ID NO: 57)
AF, AM	GTSTPESGSASP (SEQ ID NO: 58)
AF, AM	GTSPSGESSTAP (SEQ ID NO: 59)
AF, AM	GSTSSTAESP GP (SEQ ID NO: 60)
AG, AM	GTPGSGTASSSP (SEQ ID NO: 61)
AG, AM	GSSTPSGATGSP (SEQ ID NO: 62)
AG, AM	GSSPSASTGTGP (SEQ ID NO: 63)
AG, AM	GASPGTSSTGSP (SEQ ID NO: 64)
AQ	GEPAGSPTSTSE (SEQ ID NO: 65)
AQ	GTGEPSSTPASE (SEQ ID NO: 66)
AQ	GSGPSTESAPTE (SEQ ID NO: 67)
AQ	GSETPSGPSETA (SEQ ID NO: 68)
AQ	GPSETSTSEPGA (SEQ ID NO: 69)
AQ	GSPSEPTG TSA (SEQ ID NO: 70)
BC	GSGASEPTSTEP (SEQ ID NO: 71)
BC	GSEPATSGTEPS (SEQ ID NO: 72)
BC	GTSEPSTSEPGA (SEQ ID NO: 73)
BC	GTSTEPSEPGSA (SEQ ID NO: 74)
BD	GSTAGSETSTEA (SEQ ID NO: 75)
BD	GSETATSGSETA (SEQ ID NO: 76)
BD	GTSESATSESGA (SEQ ID NO: 77)
BD	GTSTEASEGSAS (SEQ ID NO: 78)

Обозначает последовательности индивидуальных мотивов, которые, при использовании вместе с различными перестановками, приводят к "последовательности семейства" XTEN могут также иметь различную длину для вставки в или связывания с FVIII или VWF, или любыми другими компонентами химерной молекулы. В одном варианте реализации изобретения длину последовательности (последовательностей) XTEN выбирают на основании свойства или функции, которые должны быть достигнуты у слитого белка. В зависимости от предполагаемого свойства или функции, XTEN может быть последовательностью короткой или промежуточной длины или более длинной последовательностью, которые могут служить носителями. В определенных вариантах реализации изобретения XTEN включает короткие сегменты, состоящие из от около 6 до около 99 аминокислотных остатков, с промежуточной длиной от около 100 до около 399 аминокислотных остатков, и с еще большими длинами от около 400 до около 1000 и до около 3000 аминокислотных остатков. Таким образом, XTEN, вставленный в или связанный с FVIII или VWF, может иметь длину 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 других вариантах реализации изобретения последовательности XTEN имеют длину от около 6 до около 50, около от 50 до 100, около от 100 до 150, около от 150 до 250, около от 250 до 400, от около 400 до около 500, от около 500 до около 900, около от 900 до 1500, около от 1500 до 2000 или от около 2000 до около 3000 аминокислотных остатков. Точная длина XTEN, вставленного в или связанного с FVIII или VWF, может меняться без нежелательного влияния на активность FVIII или VWF. В одном варианте реализации изобретения один или более из XTEN, используемых в данном документе, имеет длину 36 аминокислот, 42 аминокислоты, 72 аминокислоты, 144 аминокислоты, 288 аминокислот, 576 аминокислот или 864 аминокислоты, и может быть выбран из одной или более из последовательностей семейства XTEN; т.е. AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC или BD.

В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность XTEN, используемая в 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 и AG2004. См. US 2010-0239554 A1. В одном варианте реализации 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 AE42, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288, AG144 и любых их комбинаций. В другом варианте реализации изобретения последовательность XTEN выбирают из группы, состоящей из AE42, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288, AG144 и любых их комбинаций. В конкретном варианте реализации изобретения последовательность XTEN представляет собой AE288. Аминокислотные последовательности для определенных последовательностей XTEN по изобретению приведены в табл. 2B.

Таблица 2В. Последовательности ХТЕН

ХТЕН	Аминокислотная последовательность
AE42 SEQ ID NO: 39	GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS
AE72 SEQ ID NO: 40	GAP TSESATPESG PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG TSTEPSEGSА PGASS
AE144 SEQ ID NO: 41	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESA PESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
AG144 SEQ ID NO: 42	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPASPGTSS GSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSGSPGSSPSA STGTGPGTTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP
AE288 SEQ ID NO: 43	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG288 SEQ ID NO: 44	PGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPSSPSASTGTGPASPGTSSGSPGTTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPSSPSASTGTGPASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPASPGTSSGSPGSSPSASTGTGPGTTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS
AE576 SEQ ID NO: 45	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSА PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG576 SEQ ID NO: 46	PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTPGSGTASS SSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSPSASTGTGPGTTPGSGTA SSSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSGSPGTTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTTPGSGTASSSPGASPG TSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTTPGSGTASSSPGSS PSGATGSPGTTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSGSPGTTPGSGTASSSPGS
AE864 SEQ ID NO: 47	STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSG GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSА PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG864 SEQ ID NO: 48	GASPGTSSGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPASPGTSSGSPGTTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTTPGSGTASS SPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSPGTSST GSPGTTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTTPGSGT ASSSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSPSASTGTGPGTTPGSG TASSSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSGSPGTTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSS PSGATGSPGSSPSASTGTGPASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTTPGSGTASSSPGAS PGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGASPGTSSGSPGTTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGTTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPASPGTSSGSPGTTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPASPGTSSGSPGASPGTSSGSP PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPASPGTSSGSPGSSPSASTGTGPGTTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSGSP

В тех вариантах реализации изобретения, где в используемом компоненте ХТЕН менее 100% аминокислот состоит из 4, 5 или 6 типов аминокислот, выбранных из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), или менее 100% последовательностей, состоящих из последовательностей мотивов из табл. 2А или последовательностей ХТЕН табл. 2В, а другие аминокислотные остатки ХТЕН выбраны из любых других 14 природных L-аминокислот, но предпочтительно выбраны из гидрофильных аминокислот таким образом, чтобы последовательность ХТЕН содержала по меньшей мере около 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% или по меньшей мере около 99% гидрофильных аминокислот. Аминокислоты ХТЕН, не являющиеся глицином (G), аланином (A), серином (S), треонином (T), глутаматом (E) и пролином (P) или разбросаны по последовательности ХТЕН, или расположены внутри или между мотивами последовательностей, или сконцентрированы в одном или более коротких отрезках последовательности ХТЕН, например, для создания линкера между ХТЕН и другими компонентами; например белком VWF. В тех случаях, когда компонент ХТЕН содержит аминокислоты, отличные от глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), предпочтительно менее чем около 2% или менее около 1% аминокислот являются гидрофобными остатками так, чтобы полученные последовательности в общем не имели вторичной структуры, например имели не более 2% альфа-спиралей или 2% бета-листов, при определении способами, раскрытыми в данном документе. Гидрофобные остатки, являющиеся менее благоприятными для конструирования ХТЕН, включают триптофан, фенилаланин, тирозин, лейцин, изолейцин, валин и метионин. Дополнительно, можно спроектировать последовательности ХТЕН, которая содержит менее 5, или менее 4, или менее 3, или менее 2, или менее 1%, или вообще не содержит следующие аминокислоты: цистеин (чтобы избежать образования дисульфидных связей и окисления), метионин (во избежание окисления), аспарагин и глутамин (во избежание дезамидирования). Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения ХТЕН, содержащий другие аминокислоты помимо глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), имеет последовательность с менее чем 5% остатков, участвующих в образовании альфа-спиралей и бета-листов, при измерении по алгоритму Чоу-Фасмана, и на по меньшей мере 90%, или по меньшей мере около 95% или больше образуют случайный клубок, при измерении по алгоритму GOR.

В дополнительных вариантах реализации изобретения последовательность ХТЕН, используемая в изобретении, влияет на физическое или химическое свойство, например фармакокинетическую, химерного белка по настоящему изобретению. Последовательность ХТЕН, используемая в настоящем изобретении, может проявлять одно или более из следующих предпочтительных свойств: конформационная гибкость, повышенная растворимость в воде, высокая степень стойкости к протеазе, низкая иммуногенность, низкое связывание с рецепторами млекопитающего, или увеличенные гидродинамические (или стоковые) радиусы. В конкретном варианте реализации изобретения последовательность ХТЕН, связанная с белком FVIII в данном изобретении улучшает фармакокинетические свойства, такие как более длительный период полувыведения в конечной фазе или увеличенная площадь под кривой (AUC), так чтобы химерный белок, описанный в данном документе, оставался *in vivo* в течение более длительного периода времени по сравнению с FVIII дикого типа. В дополнительных вариантах реализации изобретения последовательность ХТЕН, используемая в данном изобретении, улучшает фармакокинетические свойства, такие как более длительный период полувыведения в конечной фазе или увеличенная площадь под кривой (AUC), так чтобы белок FVIII оставался *in vivo* в течение более длительного периода времени по сравнению с FVIII дикого типа.

Различные способы и методы анализа могут применяться для определения физических/химических свойств белков, содержащих последовательность ХТЕН. Такие способы включают, без ограничений, аналитическое центрифугирование, ЭПР, ВЭЖХ-ионный обмен, ВЭЖХ-эксклюзионную хроматографию, ВЭЖХ-обращенная фаза, светорассеяние, капиллярный электрофорез, круговой дихроизм, дифференциальную сканирующую калориметрию, флуоресценцию, ВЭЖХ-ионный обмен, ВЭЖХ-эксклюзионную хроматографию, ИК, ЯМР, рамановскую спектроскопию, рефрактометрию и УФ/видимую спектроскопию. Дополнительные способы раскрыты в Amau et al, *Prot Expr and Purif* 48, 1-13 (2006).

Дополнительные примеры последовательностей ХТЕН, которые могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением, раскрыты в публикациях патентов США № 2010/0239554 A1, 2010/0323956 A1, 2011/0046060 A1, 2011/0046061 A1, 2011/0077199 A1 или 2011/0172146 A1, или международных патентных публикациях № WO 2010091122 A1, WO 2010144502 A2, WO 2010144508 A1, WO 2011028228 A1, WO 2011028229 A1, WO 2011028344 A2 или WO2013123457 A1, или международных заявках № PCT/US2013/049989.

#### II.C.5. Белок FVIII.

"Белок FVIII", в используемом в данном документе значении, означает функциональный полипептид FVIII в его нормальной роли в коагуляции, если не указано иное. Термин белок FVIII включает его функциональный фрагмент, вариант, аналог или производное, которые сохраняют функцию полноразмерного фактора VIII дикого типа в пути коагуляции. "Белок FVIII" используется взаимозаменяемо с полипептидом (или протеином) FVIII или FVIII. Примеры функций FVIII включают, без ограничений, способность активировать коагуляцию, способность выступать в роли кофактора для фактора IX, или способность образовывать теназный комплекс с фактором IX в присутствии  $Ca^{2+}$  и фосфолипидов, кото-

рый затем превращает фактор X в активированную форму Xa. Белок FVIII может быть человеческим, свиным, собачьим, крысиным или мышинным белком FVIII. Кроме того, сравнения между FVIII, полученным от людей и от других видов, позволили идентифицировать консервативные остатки, которые вероятно необходимы для обеспечения его функции (Cameron et al., Thromb. Haemost. 79:317-22 (1998); US 6251632).

Имеется ряд тестов для оценки функции системы коагуляции: тест на активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), хромогенный анализ, анализ методом ротационной тромбоэластометрии (ROTEM), тест на протромбиновое время (PT) (также используемый для определения INR), тестирование на фибриноген (часто по методу Клауса), подсчет тромбоцитов, тестирование функции тромбоцитов (часто методом PFA-100), ТСТ, время кровотечения, тест на смешение (исправляется ли аномалия, если плазму пациента смешивают с нормальной плазмой), анализы коагулирующего фактора, антифосфолипидные антитела, D-димер, генетические тесты (например, фактор V Лейдена, мутация протромбина G20210A), время разбавленного яда гадюки Рассела (dRWT), различные тесты функции тромбоцитов, тромбоэластография (ТЭГ или Sonoclot), тромбоэластометрия (ТЭМ®, например, ROTEM®), или зуглобулиновое время лизиса (ELT).

Тест АЧТВ представляет собой показатель эффективности, измеряющий эффективность как "внутреннего" (также называемого контактным путем активации), так и общего путей коагуляции. Этот тест обычно используется для измерения активности свертывания коммерчески доступных рекомбинантных факторов свертывания крови, например FVIII или FIX. Он используется в сочетании с протромбиновым временем (PT), которое измеряет внешний путь.

Анализ ROTEM дает информацию о кинетике гемостаза в целом: время свертывания, образование сгустка, стабильность сгустка и лизис. Разные параметры в тромбоэластометрии зависят от активности системы плазматической коагуляции, функции тромбоцитов, фибринолиза или большого количества факторов, влияющих на эти взаимодействия. Этот анализ может обеспечить целостную картину вторичного гемостаза. Полипептид FVIII и полинуклеотидные последовательности известны, как и многие функциональные фрагменты, мутанты и модифицированные варианты. Примеры человеческих последовательностей FVIII (полноразмерных) приведены как субпоследовательности в SEQ ID NO: 16 или 18.

Таблица 3. Полноразмерный FVIII (сигнальный пептид FVIII подчеркнут; тяжелая цепь FVIII подчеркнута двойной линией; В-домен выделен наклонным шрифтом; и легкая цепь FVIII представлена обычным шрифтом)  
Сигнальный пептид: (SEQ ID NO: 15)  
MQIELSTCFFLCLLRFCFS

Зрелый фактор VIII (SEQ ID NO: 16)\*

ATRRYYLGAVELSDWYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPPFNTSVVYKKTLEFVEFTDHLFNIAKPRPPWMLLGPTIQ  
AEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCL  
TYSYLSHVVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMODRDAASARAWPKM  
HTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLMLDGLGQFL  
FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSFSFIQIRSVAKKHPKTWVHY  
IAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLYGEVGDTLL  
IIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNM  
ERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFOASNIMHS

INGVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMYEDTLTLFPFSGETVFMSENPGLWILGCH  
 NSDFRNRGMTALLKVVSSCDKNTGDYEDSYEDI SAYLLSKNNAIEPRFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD  
 PWFARHTPMPKIQNVSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKEYETFSDDPS PGAI DSNNSLSEMTFRPQLHHS GDM  
 VFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNL I STI PSDNLAAGTDNTSSLGPPSPMPVHYDSQLD T T L F G K  
 KSSPLTESGGPLSLSEENNSKLLSEGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHG PALLTKDNALFKVISLLKTN  
 KTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENS PSVWQNI L ESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHSNKTTSKKNMEMVQ  
 QKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGK  
 EFTKDVGLKEMVFPSSRNFLFTNLNLHENNTHNQEKIQEEIEKKE TLIQENVVLPQIHTVTGTFKNFMKNLFLST  
 RQNVESGYD GAYAPVLQDFRSLNDSNRTRKHTAHFSKKGEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQ  
 RSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPSLDCLTRSHSIPQANRS  
 PLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNLSLAILTLEMTGDQREVGS LG  
 TSATNSVTKYKVENTVLPKPDLPKTSKGVLEL PKVHIYQKDLFPETSNGPSGLHLDLVEGSL LQGTGEGAIKWNEANR  
 PGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWSQEKSPKTAFAKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQ  
 NKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPVLRKQREITR T T L Q S D Q E E I D Y D D T I S V E M K K E D F D I Y D E D E N Q S P R S F Q K K  
 TRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPQFKKVVFEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNI  
 MVTFRNQASRPYSFYSSLSIYEEDQRQGAEPKRNFKVKNETKTYFVKVQHHPMPTKDEFDC KAWAYFS D V D L E K D V H  
 SGLIGPLL VCHTNTL NPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRPHAINGYI  
 MDTLPLGLVMAQDQRI RWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEBYKMALYNLYPGVFETVEMLP SKAGIWRVECLI  
 GEHLHAGMSTLFLVYSNKQCTPLGMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPM  
 I IHGIKTQGARQKFSLSYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGLMVFFGNVDS SGIKHNI FN P P I I A R Y I R L H P T H Y  
 SIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAI SDAQITASSYFTNM FATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVD  
 FQKTMKVTGVTQGVKSLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFGNQDSFTPVVNSLDPLLLTRYLRHP  
 QSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

Таблица 4. Нуклеотидная последовательность, кодирующая  
полноразмерный FVIII (SEQ ID NO: 17)\*

				ATG	CAAATAGAGC	TCTCCACCTG
661						
721	CTTCTTTCTG	TGCCTTTTGC	GATTCTGCTT	TAGTGCCACC	AGAAGATACT	ACCTGGGTGC
781	AGTGGAACTG	TCATGGGACT	ATATGCAAAG	TGATCTCGGT	GAGCTGCCTG	TGGACGCAAG
841	ATTTCCCTCCT	AGAGTGCCAA	AATCTTTTCC	ATTCAACACC	TCAGTCGTGT	ACAAAAGAC
901	TCTGTTTGTA	GAATTCACGG	ATCACCTTTT	CAACATCGCT	AAGCCAAGGC	CACCCTGGAT
961	GGGTCTGCTA	GGTCTACCA	TCCAGGCTGA	GGTTTATGAT	ACAGTGGTCA	TTACACTTAA
1021	GAACATGGCT	TCCCATCCTG	TCAGTCTTCA	TGCTGTTGGT	GTATCCTACT	GGAAAGCTTC
1081	TGAGGGAGCT	GAATATGATG	ATCAGACCAG	TCAAAGGGAG	AAAGAAGATG	ATAAAGTCTT
1141	CCCTCCTCCA	ACCCATACAT	ATGCTGGCCA	CCTCCTGAAA	GAGAATGCTC	CAATGCCCTC
1201	TGACCCACTG	TGCCTTACCT	ACTCATATCT	TTCTCATGTG	GACCTGGTAA	AAGACTTGAA
1261	TTCAGGCCTC	ATTGGAGCCC	TACTAGTATG	TAGAGAAGGG	AGTCTGGCCA	AGGAAAAGAC
1321	ACAGACCTTG	CACAAATTTA	TACTACTTTT	TGCTGTATTT	GATGAAGGGA	AAAGTTGGCA
1381	CTCAGAAACA	AAGAACTCCT	TGATGCAGGA	TAGGGATGCT	GCATCTGCTC	GGGCCTGGCC
1441	TAAAATGCAC	ACAGTCAATG	GTATGTAAA	CAGGTCTCTG	CCAGGTCTGA	TTGGATGCCA
1501	CAGGAAATCA	GTCTATTGGC	ATGTGATTGG	AATGGGCACC	ACTCCTGAAG	TGCACTCAAT
1561	ATTCTTCGAA	GGTCACACAT	TTCTTGTGAG	GAACCATCGC	CAGGCGTCTC	TGGAAATCTC
1621	GCCAATAACT	TTCCTTACTG	CTCAAACACT	CTTGATGGAC	CTTGGACAGT	TTCTACTGTT
1681	TTGTATATATC	TCTTCCCACC	AACATGATGG	CATGGAAGCT	TATGTCAAAG	TAGACAGCTG
1741	TCCAGAGGAA	CCCCAACTAC	GAATGAAAA	TAATGAAGAA	CGGGAAGACT	ATGATGATGA
1801	TCTTACTGAT	TCTGAAATGG	ATGTGGTCAG	GTTTGATGAT	GACAACCTC	CTTCTTTTAT
1861	CCAAATTCGC	TCAGTTGCCA	AGAAGCATCC	TAAAACCTGG	GTACATTACA	TTGCTGCTGA
1921	AGAGGAGGAC	TGGGACTATG	CTCCCTTAGT	CCTCGCCCC	GATGACAGAA	GTTATAAAAG
1981	TCAATATTTG	AACAATGGCC	CTCAGCGGAT	TGGTAGGAAG	TACAAAAAAG	TCCGATTTAT
2041	GGCATAACACA	GATGAAACCT	TTAAGACTCG	TGAAGCTATT	CAGCATGAAT	CAGGAATCTT
2101	GGGACCTTTA	CTTTATGGGG	AAGTTGGAGA	CACACTGTTG	ATTATATTTA	AGAATCAAGC
2161	AAGCAGACCA	TATAACATCT	ACCCTCACGG	AATCACTGAT	GTCCGTCCTT	TGTATTCAAG



2221 GAGATTACCA AAAGGTGTAA AACATTTGAA GGATTTTCCA ATTCTGCCAG GAGAAATATT  
 2281 CAAATATAAA TGGACAGTGA CTGTAGAAGA TGGGCCAACT AAATCAGATC CTCGGTGCCT  
 2341 GACCCGCTAT TACTCTAGTT TCGTTAATAT GGAGAGAGAT CTAGCTTCAG GACTCATTGG  
 2401 CCCTCTCCTC ATCTGCTACA AAGAATCTGT AGATCAAAGA GGAACCAGA TAATGTCAGA  
 2461 CAAGAGGAAT GTCATCCTGT TTTCTGTATT TGATGAGAAC CGAAGCTGGT ACCTCACAGA  
 2521 GAATATACAA CGCTTTCTCC CCAATCCAGC TGGAGTGCAG CTTGAGGATC CAGAGTTCCA  
 2581 AGCCTCCAAC ATCATGCACA GCATCAATGG CTATGTTTTT GATAGTTTGC AGTTGTCAGT  
 2641 TTGTTTGATG GAGGTGGCAT ACTGGTACAT TCTAAGCATT GGAGCACAGA CTGACTTCCT  
 2701 TTCTGTCTTC TTCTCTGGAT ATACCTTCAA ACACAAAATG GTCTATGAAG ACACACTCAC  
 2761 CCTATTCCCA TTCTCAGGAG AAACCTGTCTT CATGTGCGATG GAAAACCCAG GTCTATGGAT  
 2821 TCTGGGGTGC CACAACCTCAG ACTTTCGGAA CAGAGGCATG ACCGCCTTAC TGAAGGTTTC  
 2881 TAGTTGTGAC AAGAACACTG GTGATTATTA CGAGGACAGT TATGAAGATA TTTCAGCATA  
 2941 CTTGCTGAGT AAAAAAATG CCATTGAACC AAGAAGCTTC TCCCAGAATT CAAGACACCC  
 3001 TAGCACTAGG CAAAAGCAAT TTAATGCCAC CACAATTTCCA GAAAATGACA TAGAGAAGAC  
 3061 TGACCCCTGG TTTGCACACA GAACACCTAT GCCTAAAATA CAAAATGTCT CCTCTAGTGA  
 3121 TTTGTTGATG CTCTTGCGAC AGAGTCTTAC TCCACATGGG CTATCCTTAT CTGATCTCCA  
 3181 AGAAGCCAAA TATGAGACTT TTTCTGATGA TCCATCACCT GGAGCAATG ACAGTAATAA  
 3241 CAGCCTGTCT GAAATGACAC ACTTTCAGGC ACAGCTCCAT CACAGTGGGG ACATGGTATT  
 3301 TACCCCTGAG TCAGGCCTCC AATTAAGATT AAATGAGAAA CTGGGGACAA CTGCAGCAAC  
 3361 AGAGTTGAAG AAACCTGATT TCAAAGTTTC TAGTACATCA AATAATCTGA TTTCAACAAT  
 3421 TCCATCAGAC AATTTGGCAG CAGGTACTGA TAATACAAGT TCCTTAGGAC CCCCAAGTAT  
 3481 GCCAGTTCAT TATGATAGTC AATTAGATAC CACTCTATTT GGCAAAAAGT CATCTCCCT  
 3541 TACTGAGTCT GGTGGACCTC TGAGCTTGAG TGAAGAAAAT AATGATTCAA AGTTGTTAGA  
 3601 ATCAGGTTTA ATGAATAGCC AAGAAAGTTC ATGGGGAAAA AATGTATCGT CAACAGAGAG  
 3661 TGGTAGGTTA TTTAAAGGGA AAAGAGCTCA TGGACCTGCT TTTGTTGACTA AAGTAATGC  
 3721 CTTATTCAAA GTTAGCATCT CTTTGTTAAA GACAAACAAA ACTTCCAATA ATTCAGCAAC  
 3781 TAATAGAAAG ACTCACAATG ATGGCCATC ATTATTAATT GAGAATAGTC CATCAGTCTG  
 3841 GCAAAATATA TTAGAAAGTG ACCTGAGTT TAAAAAAGTG ACACCTTTGA TTTAGGACAG  
 3901 AATGCTTATG GACAAAAATG CTACAGCTTT GAGGCTAAAT CATATGTCAA ATAAAACTAC  
 3961 TTTATCAAAA AACATGGAAA TGGTCCAACA GAAAAAAGAG GGCCCATTC CACCAGATGC  
 4021 ACAAAATCCA GATATGTCTG TCTTAAAGAT GCTATTTCTG CCAGAATCAG CAAGGTGGAT  
 4081 ACAAAGGACT CATGAAAAGA ACTCTCTGAA CTCTGGGCAA GGCCCCAGTC CAAAGCAATT  
 4141 AGTATCCTTA GGACCAGAAA AATCTGTGGA AGGTCAGAAT TTCTTGTCTG AGAAAAACAA  
 4201 AGTGGTAGTA GGAAAGGGTG AATTTACAAA GGACGTAGGA CTCAAAGAGA TGGTTTTTCC  
 4261 AAGCAGCAGA AACCTATTTT TTAATAACTT GGATAATTTA CATGAAAATA ATACACACAA  
 4321 TCAAGAAAAA AAAATTCAGG AAGAAAATGA AAAGAAGGAA ACATTAATCC AAGAGAATGT  
 4381 AGTTTTGCCT CAGATACATA CAGTGACTGG CACTAAGAAT TTTATGAAGA ACCTTTTCTT  
 4441 ACTGAGCACT AGGCAAAAATG TAGAAGGTTT ATATGACGGG GCATATGCTC CAGTACTTCA  
 4501 AGATTTTAGG TCATTAATG ATTCAACAAA TAGAACAAAG AAACACACAG TCTATTTCTC  
 4561 AAAAAAAGGG GAGGAAGAAA ACTTGGAAGG CTTGGGAAAT CAAACCAAGC AAATTTGTAGA  
 4621 GAAATATGCA TGCACCACAA GGATATCTCC TAATACAAGC CAGCAGAATT TTGTACAGCA  
 4681 ACGTAGTAAG AGAGCTTTGA AACAAATCAG ACTCCCACTA GAAGAAACAG AACTTGAAAA  
 4741 AAGGATAAAT GTGGATGACA CCTCAACCCA GTGGTCCAAA AACATGAAAC AATTTGACCC  
 4801 GAGCACCTC ACACAGATAG ACTACAATGA GAAGGAGAAA GGGGCCATTA CTCAGTCTCC  
 4861 CTTATCAGAT TGCCTTACGA GGAGTCTATG CATCCCTCAA GCAAAATAGAT CTCCATTACC  
 4921 CATTGCAAG GTATCATCAT TTTCCATCTAT TAGACCTATA TATCTGACCA GGTCTCTATT  
 4981 CCAGACAAC TCTTCTCATC TTCCAGCAGC ATCTTATAGA AAGAAAAGATT CTGGGGTCCA  
 5041 AGAAAGCAGT CATTTCTTAC AAGGAGCCAA AAAAAATAAC CTTTCTTTAG CCATTCTAAC  
 5101 CTTGGAGATG ACTGGTGATC AAAGAGAGGT TGGCTCCCTG GGGACAAGTG CCACAATTC  
 5161 AGTCACATAC AAGAAAGTTG AGAACACTGT TCTCCCGAAA CCAGACTTGC CCAAAACATC  
 5221 TGGCAAAGTT GAATTGCTTC CAAAAGTTCA CATTATATCAG AAGGACCTAT TCCCTACGGA  
 5281 AACTAGCAAT GGGTCTCCTG GCCATCTGGA TCTCGTGGAA GGGAGCCTTC TTCAGGGAAC  
 5341 AGAGGGAGCG ATTAAGTGGG ATGAAGCAA CAGACCTGGA AAAGTTCCCT TTCTGAGAGT  
 5401 AGCAACAGAA AGCTCTGCAA AGACTCCCTC CAAGCTATTG GATCCTCTTG CTTGGGATAA  
 5461 CCACTATGGT ACTCAGATAC CAAAAGAAGA GTGGAAATCC CAAGAGAAGT CACCAGAAAA  
 5521 AACAGCTTTT AAGAAAAAGG ATACCATTTT GTCCCTGAAC GCTTGTGAAA GCAATCATGC  
 5581 AATAGCAGCA ATAAATGAGG GACAAAATAA GCCCGAAAATA GAAGTCAGCT GGGCAAAGCA  
 5641 AGGTAGGACT GAAAGGCTGT GCTCTCAAAA CCCACCAGTC TTGAAACGCC ATCAACGGGA  
 5701 AATAACTCGT ACTACTCTTC AGTCAGATCA AGAGGAAAT TACTATGATG ATACCATATC  
 5761 AGTTGAAATG AAGAAGGAAG ATTTTGACAT TTATGATGAG GATGAAAATC AGAGCCCCCG  
 5821 CAGCTTTCAA AAGAAAACAC GACACTATTT TATTGCTGCA GTGGAGAGGC TCTGGGATTA  
 5881 TGGGATGAGT AGCTCCCCAC ATGTTCTAAG AAACAGGGCT CAGAGTGGCA GTGTCCCTCA  
 5941 GTTCAAGAAA GTTGTTTTCC AGGAATTTAC TGATGGCTCC TTTACTCAGC CCTTATACCG  
 6001 TGGAGAACTA AATGAACATT TGGGACTCCT GGGGCCATAT ATAAGAGCAG AAGTTGAAGA

```

6061 TAATATCATG GTAACTTTCA GAAATCAGGC CTCTCGTCCC TATTCCTTCT ATTCTAGCCT
6121 TATTTCTTAT GAGGAAGATC AGAGGCAAGG AGCAGAACCT AGAAAAAACT TTGTCAAGCC
6181 TAATGAAACC AAAACTTACT TTTGGAAAGT GCAACATCAT ATGGCACCCA CTAAGATGA
6241 GTTTGACTGC AAAGCCTGGG CTTATTTCTC TGATGTTGAC CTGGAAAAAG ATGTGCACTC
6301 AGGCCTGATT GGACCCTTTC TGGTCTGCCA CACTAACACA CTGAACCTCG CTCATGGGAG
6361 ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT TTTCACCATC TTTGATGAGA CCAAAAGCTG
6421 GTACTTCACT GAAAATATGG AAAGAAACTG CAGGGCTCCC TGCAATATCC AGATGGAAGA
6481 TCCCACTTTT AAAGAGAATT ATCGCTTCCA TGCAATCAAT GGCTACATAA TGGATACACT
6541 ACSTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG GATTCGATGG TATCTGTCTA GCATGGGCGAG
6601 CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTTCAG TGGACATGTG TTTCACTGTAC GAAAAAAGA
6661 GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA TCCAGGTGTT TTTGAGACAG TGGAAATGTT
6721 ACCATCCAAA GCTGGAATTT GCGGGTGGG ATGCCTTAT TGGCAGCATC TACATGCTGG
6781 GATGAGCACA STTTTCTGG TGACAGCAA TAAGTGTCTAG ACTCCCCTGG GAATGGCTTC
6841 TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA TATGGACAGT GGGCCCCAAA
6901 GCTGGCCAGA STTCATTTAT CCGGATCAAT CAATGCCTGG AGCACCAAGG AGCCCTTTTC
6961 TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACCAAT GATTATTCAC GGCATCAAGA CCCAGGGTGC
7021 CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC ATCATGTATA GTCTTGATGG
7081 GAAGAAAGTG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC TTAATGGTCT TCTTTGGCAA
7141 TGTGGATFCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTTAACCCT CCAATTATTG STCGATACAT
7201 CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCG CAGCACTCTT CGCATGGAGT TGATGGGCTG
7261 TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG AATGGAGAGT AAAGCAATAT CAGATGCACA
7321 GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC TGGTCTCSTT CAAAAGCTCG
7381 ACTTCACSTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACSTCAG GTGAATAATC CAAAAGAGTG
7441 GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA GTAACTACTC AGGGAGTAAA
7501 ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC TCCAGCAGTC AAGATGGCCA
7561 TCAGTGGACT STCTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTCAGGGAA ATCAAGACTC
7621 STTCACACST GTGGTGAACT CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGSTACC TTCGAATTCA
7681 CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT GCGAGGCACA
7741 GGACCTCTAC

```

\* подчеркнутые нуклеиновые кислоты кодируют сигнальный пептид.

Полипептиды FVIII включают полноразмерный FVIII, полноразмерный FVIII минус Met на N-конце, зрелый FVIII (минус сигнальная последовательность), зрелый FVIII с дополнительным Met на N-конце и/или FVIII с полной или частичной делецией В-домена. В определенных вариантах реализации изобретения варианты FVIII включают делеции В-домена, которые могут быть частичными или полными делециями.

Человеческий ген FVIII был выделен и экспрессирован в клетках млекопитающих (Toole, J. J., et al., Nature 312:342-347 (1984); Gitschier, J., et al, Nature 312:326-330 (1984); Wood, W. I, et al, Nature 312:330-337 (1984); Vehar, G. A., et al, Nature 312:337-342 (1984); WO 87/04187; WO 88/08035; WO 88/03558; и патент США № 4757006). Аминокислотная последовательность FVIII была определена по кДНК, как показано в патенте США № 4965199. Кроме того, FVIII с частичной или полной делецией В-домена представлена в патентах США № 4994371 и 4868112. В некоторых вариантах реализации изобретения В-домен человеческого FVIII замещен на В-домен человеческого фактора V, как описано в патенте США № 5004803. Последовательность кДНК, кодирующая человеческий фактор VIII, и его аминокислотная последовательность приведены в SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно, в патенте США № 7211559.

Свинная последовательность FVIII опубликована в Toole, J. J., et al, Proc.Natl. Acad. Sci. USA 83:5939-5942 (1986). Дополнительно, полная последовательность свиной кДНК, полученной в результате ПЦР-амплификации последовательности FVIII из библиотеки кДНК свиной селезенки была описана у Healey, J. F., et al, Blood 88:4209-4214 (1996). Гибридный человеческий/свиной FVIII, имеющий замещение во всех доменах, всех субъединицах, и специфические аминокислотные последовательности были раскрыты в патенте США № 5364771, на имя Lollar и Runge, и в WO 93/20093. Недавно, нуклеотидные и соответствующие аминокислотные последовательности доменов A1 и A2 свиного FVIII и химерного FVIII со свиными доменами A1 и/или A2, замещающими соответствующие человеческие домены, были описаны в WO 94/11503. Патент США № 5859204, на имя Lollar, J. S., также раскрывает свиную кДНК и расшифрованные аминокислотные последовательности. Патент США № 6458563 раскрывает свиной FVIII с делецией В-домена.

Патент США № 5859204, на имя Lollar, J. S., описывает функциональные мутанты FVIII, имеющие пониженную антигенность и пониженную иммунореактивность. Патент США № 6376463, на имя Lollar, J. S., также описывает мутанты FVIII, имеющие пониженную иммунореактивность. Публикация заявки США № 2005/0100990, на имя Saenko et al., описывает функциональные мутации в домене A2 FVIII. В одном варианте реализации изобретения белок FVIII (или относящаяся к FVIII часть химерного белка) может быть по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичным аминокислотной последовательности FVIII, представленной аминокислотами 1-1438 SEQ ID NO: 18 или аминокислотами 1-2332 SEQ ID NO: 16 (без сигнальной последовательности), причем FVIII обладает свертывающей активностью, например активизирует фактор IX в качестве кофактора для превращения фактора X в активированный фактор X. FVIII (или относящаяся к FVIII часть химерного белка) может быть идентичным аминокислотной последовательности FVIII, представленной аминокислотами 1-1438 SEQ ID NO: 18 или аминокислотами 1-2332 SEQ ID NO: 16 (без сигнальной последовательности). Белок FVIII может дополнительно содержать сигнальную последовательность.

"В-домен" FVIII, в используемом в данном документе значении, является таким же, как и В-домен, известный в данной области техники, определенный по идентичности внутренних аминокислотных последовательностей и сайтов протеолитического расщепления, например остатков Ser741-Arg1648 полно-размерного человеческого FVIII. Другие домены человеческого FVIII определяются по следующим аминокислотным остаткам: A1 - остатки Ala1-Arg372; A2 - остатки Ser373-Arg740; A3-остатки Ser1690-Asn2019; C1 - остатки Lys2020-Asn2172; C2 - остатки Ser2173-Tyr2332. Последовательность A3-C1-C2 включает остатки Ser1690-Tyr2332. Оставшаяся часть последовательности, остатки Glu1649-Arg1689, обычно называется кислотной областью а3. Положения границ всех доменов, включая В-домены, для свинной, мышинной и собачьей FVIII также известны в данной области техники. В одном варианте реализации изобретения В-домен FVIII делетирован ("фактор VIII с делецией В-домена" или "BDD FVIII"). Примером BDD FVIII является REFACTO® (рекомбинантный BDD FVIII), имеющий такую же последовательность, как и относящаяся к фактору VIII часть последовательности в табл. 5. (тяжелая цепь BDD FVIII подчеркнута двойной линией; В-домен выделен наклонным шрифтом; и легкая цепь BDD FVIII представлена обычным шрифтом).

Таблица 5. BDD FVIII (SEQ ID NO: 18)

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVRPKSFPFNTSVVYKKTFLVEFTDHLFNI AKPRPPWMLLGLPTIQ  
AEVYDVTVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSOREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCL  
TYSYLSHVLDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNLSLMQDRDAASARAWPKM  
HTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLMLDLGQFLI  
FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCEPEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSMDVVRFDNNSPSFTIQRISVAKKHPKTWVHY  
IAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSOYLNNGPQRIGRKYKVRFMAYTDEFKTRAIQHESGILGPLYGEVGDITLL  
LIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNM  
ERDLASGLIGPLLIICYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFOASNIMHS  
INGYVFDLQLSVCLHEVAWYIILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVEDTLTLFFPFGSETVFMSENPGLWILGCH  
NSDFRNRGMTALLKVVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSONPPVLRKHQREITRTTLQSDQEEIDY  
DDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNRAQSGSVFPQFKKVVVFQEFDTG  
SFTQPLRYGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKTYFWK  
VQHNMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFFTIFDETKSWYFTENM  
ERNCRAPNCIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRIRWYLLSMGNSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYK  
MALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCCQPLGMA SGHIRDFQITASGQYQGWAPK  
LARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI IHGIKTQGARQKFSLSYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGLMVF  
FGNVDS SGIKHNIFNFPPIIARYIRLHPHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNM FATW  
SFSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTQGVKSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKV  
KVFOGNQDSFTFVNVSLDPPLLTRYLRIRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

Таблица 6. Нуклеотидная последовательность,  
кодирующая BDD FVIII (SEQ ID NO: 19)\*

661		A	TGCAATAGA	GCTCTCCACC	TGCTTCTTTC
721	TGTGCCTTTT	GCGATCTGCG	TTTAGTGCCA	CCAGAAGATA	CTACCTGGGT
781	TGTCATGGGA	СТАТАТGCAA	AGTGATCTCG	GTGAGCTGCC	TGTGGACGCA
841	СТАGAGTGCC	AAAAТСТТТТ	CCATТСААСА	ССТСАGТCGT	GTACAAAAAG
901	TAGAATTСAC	GGATCACCTT	TTCAACATCG	СТАAGCCAAG	GCCACCCTGG
961	TAGGTССТАС	CATCCAGGCT	GAGGTTTATG	ATACAGTGGT	СATTACACTT
1021	СТТСССАТСС	TGTCAGTCTT	CATGCTGTTG	GTGTATCCTA	CTGGAAAAGCT
1081	СТГААТАТГА	TGATCAGACC	AGTCAAAGGG	AGAAAGAAGA	TGATAAAGTC
1141	GAAGCCATAC	ATATGTCTGG	CAGGTCTTGA	AAGAGAATGG	TCCAATGGCC
1201	TGTGCCTTAC	СТАСТСАТАТ	СТТТСТСАТG	TGGACCTGGT	AAAAGACTTG
1261	ТСАТТGGAGC	ССТАСТAGТА	TGTAGAGAAG	GGAGTCTGGC	CAAGGAAAAG
1321	TGCACAAATT	TATACTACTT	TTTGCTGTAT	TTGATGAAGG	GAAAAGTTGG

1381 CAAAGAACTC CTTGATGCAG GATAGGGATG CTGCATCTGC TCGGGCCTGG CCTAAAATGC  
1441 ACACAGTCAA TGGTTATGTA AACAGGTCTC TGCCAGGTCT GATTGGATGC CACAGGAAAT  
1501 CAGTCTATTG GCATGTGATT GGAATGGGCA CCCTCCTGA AGTGCACTCA ATATCTCTCG  
1561 AAGGTCACAC ATTTCTTGTG AGGAACCATC GCCAGGCGTC CTTGGAAATC TCGCCAATAA  
1621 CTTTCCCTTAC TGCTCAAACA CTCTTGATGG ACCTTGGACA GTTCTTACTG TTTTGTCCATA  
1681 TCTCTTCCCA CCAACATGAT GGCATGGAAG CTTATGTCAA AGTAGACAGC TGTCCAGAGG  
1741 AACCCCAACT ACGAATGAAA AATAATGAAG AAGCGGAAGA CTATGATGAT GATCTTACTG  
1801 ATCTGAAAT GGATGTGGTC AGGTTTGATG ATGACAACCT TCCTTCTCTT ATCCAATATC  
1861 GCTCAGTTGC CAAGAAGCAT CCTAAAACCT GGGTACATTA CATTGTGTGCT GAAGAGGAGG  
1921 ACTGGGACTA TGCTCCCTTA GTCTCGGCC CCGATGACAG AAGTTATAAA AGTCAATATT  
1981 TGAACAATGG CCCTCAGCGG ATTGGTAGGA AGTACAAAAA AGTCCGATTT ATGGCATAACA  
2041 CAGATGAAAC CTTTAAGACT CGTGAAGCTA TTCAGCATGA ATCAGGAATC TTGGGACCTT  
2101 TACTTTATGG GGAAGTTGGA GACACACTGT TGATTATATT TAAGAATCAA GCAAGCAGAC  
2161 CATATAACAT CTACCCTCAC GGAATCACTG ATGTCCGTCC TTTGTATTCA AGGAGATTAC  
2221 CAAAAGGTGT AAAACATTTG AAGGATTTTC CAATCTGCC AGGAGAAATA TTCAAATATA  
2281 AATGGACAGT GACTGTAGAA GATGGGCCAA CTAATCAGA TCCTCGGTGC CTGACCCGCT  
2341 ATTACTCTAG TTTTGGTTAAT ATGGAGAGAG ATCTAGCTTC AGGACTCATT GGCCTCTCC  
2401 TCATCTGCTA CAAAGAATCT GTAGATCAAA GAGGAAACCA GATAATGTCA GACAAGAGGA  
2461 ATGTCATCCT GTTTTCTGTA TTTGATGAGA ACCGAAGCTG GTACCTCACA GAGAATATAC  
2521 AACGCTTTCT CCCCAATCCA GCTGGAGTGC AGCTTGAGGA TCCAGAGTTC CAAGCCTCCA  
2581 ACATCATGCA CAGCATCAAT GGCTATGTTT TTGATAGTTC GCAGTTGTCA GTTTGTTTGC  
2641 ATGAGGTGGC ATACTGGTAC ATTCTAAGCA TTGGAGCACA GACTGACTTC CTTCTGTCT  
2701 TCTTCTCTGG ATATACCTTC AAACAACAAA TGGTCTATGA AGACACACTC ACCSATATCC  
2761 CATCTCAGG AGAAACTGTC TTCATGTCGA TGGAAAACCC AGGTCTATGG ATCTGGGGT  
2821 GCCACAATC AGACTTTCGG AACAGAGGCA TGACCCCTT ACTGAAGGTT TCTAGTTGTG  
2881 ACAAGAACAC TGGTGATTAT TACGAGGACA GTTATGAAGA TATTTAGCA TACTTGCTGA  
2941 GTAAAAACAA TGCCATTGAA CCAAGAAGCT TCTCTCAAAA CCCACCAGTC TTGAAACGCC  
3001 ATCAACGGGA AATAACTCGT ACTACTCTTC AGTCAGATCA AGAGGAAATG AACTATGATG  
3061 ATACCATATC AGTTGAAATG AAGAAGGAAG ATTTTGACAT TTATGATGAG GATGAAAATC  
3121 AGAGCCCCCG CAGCTTTCAA AAGAAAACAC GACACTATTT TATTGTGCTCA GTGGAGAGGC  
3181 TCTGGGATTA TGGGATGAGT AGCTCCCCAC ATGTCTTAAG AAACAGGGCT CAGATGGCA  
3241 GTGTCCCTCA GTTCAAGAAA GTTGTTTTCC AGGAATTTAC TGATGGCTCC TTTACTCAGC  
3301 CCTTATACCG TGGAGAACCT AATGAACATT TGGGACTCCT GGGGCCATAT ATAAGAGCAG  
3361 AAGTTGAAGA TAATATCATG GTAACTTTCA GAAATCAGGC CTCTCGTCCC TATTCCTTCT  
3421 ATCTAGCCT TATTTCTAT GAGGAAGATC AGAGGCAAGG AGCAGAACCT AGAAAAACT  
3481 TTGTCAAGCC TAATGAAACC AAAACTTACT TTTGAAAGT GCAACATCAT ATGGCACCCA  
3541 STAAAAGATG GTTTGACTGC AAAGCCTGGG CTTATTTCTC TGATGTTGAC CTGAAAAAAG  
3601 ATGTGCATC AGGCCTGATT GGACCCCTTC TGGTCTGCCA CACTAACACA CTGAACCTG  
3661 TCATGGGAG ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT TTTACCATC TTTGATGAGA  
3721 CCAAAAAGCTG GTACTTCACT GAAAATATGG AAAGAAACTG CAGGGCTCCC TGCATATCC  
3781 AGATGGAAGA TCCCCTTTT AAAGAGAATT ATCGCTTCCA TGCAATCAAT GGCTACATAA  
3841 TGGATACACT ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG GATTCGATGG TATCTGCTCA  
3901 GCATGGGCG CAATGAAAC ATCCATCTA TTCATTTAG TGGACATGTG TTCACTGTAC  
3961 GAAAAAAGA GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA TCCAGGTGTT TTTGAGACAG  
4021 TGGAAATGTT ACCATCCAAA GCTGGAATTT GGGGGTGGGA ATGCTTATT ATGGAGCATC  
4081 TACATGCTGG GATGAGCACA CTTTTCTGG TGACAGCAA TAAGTGTGAG ACTCCCTGG  
4141 GAATGGCTTC TGGACACATT AGAGATTTTC AGATACAGC TTCAGGACAA TATGGACAGT  
4201 GGGCCCCAAA GCTGGCCAGA CTTCATTTT CCGGATCAAT CAATGCCTGG AGCACCAGG  
4261 AGCCCTTTTC TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACCAAT GATTATTCAC GGCATCAAGA  
4321 CCCAGGCTGC CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC ATCATGTATA  
4381 GTCTTGATGG GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC TTAATGGTCT  
4441 TCTTTGGCAA TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTTAAACCT CCAATTTATG  
4501 CTCGATACAT CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCG CAGCACTCTT CCGATGGAGT  
4561 TGATGGGCTG TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG AATGGAGAGT AAAGCAATAT  
4621 CAGATGCACA GATTACTGCT TCATCTACTT TACCAATAT GTTTGCCACC TGGTCTCSTT  
4681 CAAAAGCTCG ACTTCACTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG GTGAATAATC  
4741 CAAAAGAGTG GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA GTAACACTC  
4801 AGGGAGTAAA ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCTCTATC TCCAGCAGTC  
4861 AAGATGGCCA TCAGTGGACT CTCTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTCCAGGAA  
4921 ATCAAGACTC CTTACACCT GTGGTGAAC CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGCTACC  
4981 TTCGAATTCA CCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT  
5041 GCGAGGCACA GGACTCTAC

\* подчеркнутые нуклеиновые кислоты кодируют сигнальный пептид.

"FVIII с делецией В-домена" может иметь полные или частичные делеции, раскрытые в патентах США № 6316226, 6346513, 7041635, 5789203, 6060447, 5595886, 6228620, 5972885, 6048720, 5543502, 5610278, 5171844, 5112950, 4868112 и 6458563. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность FVIII с делецией В-домена по настоящему изобретению содержит любую из делеций, раскрытых от колонки 4, строка 4, до колонки 5, строка 28, и в примерах 1-5 патента США № 6316226 (также в US 6346513). В другом варианте реализации изобретения фактор VIII с делецией В-домена представляет собой фактор VIII с делецией В-домена S743/Q1638 (SQ BDD FVIII) (например, фактор VIII, имеющий делецию от аминокислоты 744 до аминокислоты 1637, например, фактор VIII, содержащий аминокислоты 1-743 и аминокислоты 1638-2332 SEQ ID NO: 16, т.е. SEQ ID NO: 18). В некоторых вариантах реализации изобретения FVIII с делецией В-домена по настоящему изобретению имеет делецию, раскрытую в колонке 2, строки 26-51, и примерах 5-8 патента США № 5789203 (также US 6060447, US 5595886 и US 6228620). В некоторых вариантах реализации изобретения фактор VIII с делецией В-домена имеет делецию, описанную от колонки 1, строка 25, до колонки 2, строка 40 патента США № 5972885; в колонке 6, строки 1-22, и примере 1 патента США № 6048720; в колонке 2, строки 17-46,

патента США № 5543502; от колонки 4, строка 22, до колонки 5, строка 36, патента США № 5171844; в колонке 2, строки 55-68, на фигуре 2 и в примере 1 патента США № 5112950; от колонки 2, строка 2, до колонки 19, строка 21, и в таблице 2 патента США № 4868112; от колонки 2, строка 1, до колонки 3, строка 19, от колонки 3, строка 40, до колонки 4, строка 67, от колонки 7, строка 43, до колонки 8, строка 26, и от колонки 11, строка 5, до колонки 13, строка 39, патента США № 7041635; или в колонке 4, строки 25-53, патента США № 6458563.

В некоторых вариантах реализации изобретения FVIII с делецией В-домена имеет делецию большей части В-домена, но при этом содержит аминоконцевые последовательности В-домена, являющиеся существенными для *in vivo* протеолитического процессинга первичного продукта трансляции в две полипептидные цепи, как раскрыто в WO 91/09122. В некоторых вариантах реализации изобретения FVIII с делецией В-домена сконструирован с делецией аминокислот 747-1638, т.е. по существу, с полной делецией В-домена. Hoesben R.C., et al. *J. Biol. Chem.* 265 (13): 7318-7323 (1990). Фактор VIII с делецией В-домена может также содержать делецию аминокислот 771-1666 или аминокислот 868-1562 FVIII. Meulien P., et al. *Protein Eng.* 2(4): 301-6 (1988). Дополнительные делеции В-домена, являющиеся частью изобретения, включают: делеция аминокислот 982-1562 или 760-1639 (Toole et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1986) 83, 5939-5942)), 797-1562 (Eaton, et al. *Biochemistry* (1986) 25:8343-8347)), 741-1646 (Kaufman (опубликованная заявка PCT № WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver, et al, *DNA* (1987) 6:553-564)), 741-1648 (Pasek (заявка PCT № 88/00831)), или 816-1598 или 741-1648 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988) No 82:16-25, EP 295597)). В других вариантах реализации изобретения BDD FVIII включает полипептид FVIII, содержащий фрагменты В-домена, сохраняющие один или более N-связанных сайтов гликозилирования, например остатки 757, 784, 828, 900, 963 или, необязательно, 943, которые соответствуют аминокислотной последовательности полноразмерной последовательности FVIII. Примеры фрагментов В-домена включают 226 аминокислот или 163 аминокислоты В-домена, как раскрыто в Miao, H.Z., et al, *Blood* 103(a): 3412-3419 (2004), Kasuda, A, et al, *J. Thromb. Haemost.* 6: 1352-1359 (2008) и Pipe, S.W., et al., *J. Thromb. Haemost.* 9: 2235-2242 (2011) (т.е. сохраняются первые 226 аминокислот или 163 аминокислоты В-домена). В некоторых вариантах реализации изобретения FVIII с частичным В-доменом представляет собой FVIII198. FVIII198 представляет собой одноцепочечную молекулу FVIII<sub>FC</sub>-226N<sub>6</sub>, содержащую частичный В-домен. 226 обозначает N-концевую аминокислоту 226 В-домена FVIII, и N<sub>6</sub> обозначает шесть сайтов N-гликозилирования в В-доме. В еще одних вариантах реализации изобретения BDD FVIII дополнительно содержит точковую мутацию в положении остатка 309 (от Phe до Ser) для улучшения экспрессии BDD-белка FVIII. См. Miao, H.Z., et al., *Blood* 103(a): 3412-3419 (2004). В еще одних вариантах реализации изобретения BDD FVIII включает полипептид FVIII, содержащий часть В-домена, но не содержащий одного или более фуриновых сайтов расщепления (например, Arg1313 и Arg 1648). См. Pipe, S.W., et al., *J. Thromb. Haemost.* 9: 2235-2242 (2011). Каждая из вышеупомянутых делеций может быть выполнена в любой последовательности FVIII.

Белок FVIII, пригодный для использования по настоящему изобретению, может включать FVIII, имеющий одну или более дополнительных гетерологических последовательностей или химических или физических модификаций в нем, которые не влияют на коагулирующую активность FVIII. Такие гетерологические последовательности или химические или физические модификации могут быть слиты с С-концом или N-концом белка FVIII или вставлены между одной или более парами аминокислотных остатков в белке FVIII. Такие вставки в белке FVIII не влияют на коагулирующую активность FVIII или функцию FVIII. В одном варианте реализации изобретения вставки улучшают фармакокинетические свойства белка FVIII (например, период полувыведения). В другом варианте реализации изобретения вставки могут быть сделаны в более чем двух, трех, четырех, пяти или шести сайтах.

В одном варианте реализации изобретения FVIII расщепляется сразу за аргинином в положении аминокислоты 1648 (в полноразмерном факторе VIII или SEQ ID NO: 16), аминокислоты 754 (в факторе VIII с делецией В-домена S743/Q1638 или SEQ ID NO: 16), или соответствующим аргининовым остатком (в других вариантах), с образованием в результате тяжелой цепи и легкой цепи. В другом варианте реализации изобретения FVIII содержит тяжелую цепь и легкую цепь, которые связаны или ассоциированы с помощью медируемой ионом металла нековалентной связи. В других вариантах реализации изобретения FVIII представляет собой одноцепочечный FVIII, который не был расщеплен сразу за аргинином в положении аминокислоты 1648 (в полноразмерном FVIII или SEQ ID NO: 16), аминокислоты 754 (в FVIII с делецией В-домена S743/Q1638 или SEQ ID NO: 18), или соответствующим аргининовым остатком (в других вариантах). Одноцепочечный FVIII может содержать одно или более аминокислотных замещений. В одном варианте реализации изобретения аминокислотное замещение находится в остатке, соответствующем остатку 1648, остатку 1645, или обоим, полноразмерного зрелого полипептида фактора VIII (SEQ ID NO: 16) или остатку 754, остатку 751, или обоим, SQ BDD фактора VIII (SEQ ID NO: 18). Аминокислотное замещение может быть любыми аминокислотами, отличными от аргинина, например изолейцином, лейцином, лизином, метионином, фенилаланином, треонином, триптофаном, валином, аланином, аспарагином, аспарагиновой кислотой, цистеином, глутаминовой кислотой, глутамином, глицином, пролином, селеноцистеином, серином, тирозином, гистидином, орнитином, пирролизинном или таурином. FVIII дополнительно может быть расщеплен тромбином и затем активирован как FVIIIa, слу-

жащий кофактором для активированного фактора IX (FIXa). Активированный FIX вместе с активированным FVIII образует комплекс Xase и превращает фактор X в активированный фактор X (FXa). Для активации, FVIII расщепляется тромбином после трех аргининовых остатков, в положениях аминокислот 372, 740 и 1689 (соответствующих аминокислотам 372, 740 и 795 в последовательности FVIII с делецией В-домена), образуя в результате расщепления FVIIIa, имеющий цепи 50 кДа A1, 43 кДа A2 и 73 кДа A3-C1-C2. В одном варианте реализации изобретения белок FVIII, пригодный для использования в настоящем изобретении, представляет собой неактивный FVIII. В другом варианте реализации изобретения белок FVIII представляет собой активированный FVIII. Белок, имеющий полипептид FVIII, связанный с или ассоциированный с белком VWF, может содержать последовательность, по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную SEQ ID NO: 16 или 18, причем последовательность обладает свертывающей активностью FVIII, например, активирует фактор IX в качестве кофактора для превращения фактора X в активированный фактор X (FXa).

В некоторых вариантах реализации изобретения белок FVIII дополнительно содержит один или более гетерологичных фрагментов, слитых с С-концом или N-концом белка FVIII или вставленных между двумя соседними аминокислотами в белок FVIII. В других вариантах реализации изобретения гетерологичные фрагменты содержат аминокислотную последовательность, состоящую из по меньшей мере около 50 аминокислот, по меньшей мере около 100 аминокислот, по меньшей мере около 150 аминокислот, по меньшей мере около 200 аминокислот, по меньшей мере около 250 аминокислот, по меньшей мере около 300 аминокислот, по меньшей мере около 350 аминокислот, по меньшей мере около 400 аминокислот, по меньшей мере около 450 аминокислот, по меньшей мере около 500 аминокислот, по меньшей мере около 550 аминокислот, по меньшей мере около 600 аминокислот, по меньшей мере около 650 аминокислот, по меньшей мере около 700 аминокислот, по меньшей мере около 750 аминокислот, по меньшей мере около 800 аминокислот, по меньшей мере около 850 аминокислот, по меньшей мере около 900 аминокислот, по меньшей мере около 950 аминокислот или по меньшей мере около 1000 аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения период полувыведения химерной молекулы увеличивается по меньшей мере в около 1,5 раза, по меньшей мере в около 2 раз, по меньшей мере в около 2,5 раза, по меньшей мере в около 3 раз, по меньшей мере в около 4 раз, по меньшей мере в около 5 раз, по меньшей мере в около 6 раз, по меньшей мере в около 7 раз, по меньшей мере в около 8 раз, по меньшей мере в около 9 раз, по меньшей мере в около 10 раз, по меньшей мере в около 11 раз или по меньшей мере в около 12 раз, по сравнению с FVIII дикого типа.

Другие типичные примеры вариантов FVIII также раскрыты в публикации США № US2013/0017997, опубликованной 17 января 2013 г., международной публикации № WO 2013/122617, опубликованной 22 августа 2013 г., или международной публикации № WO 2014/011819, опубликованной 16 января 2014 г., или международной публикации № WO2013123457 A1, или международной заявке № PCT/US2013/049989.

### III. Полинуклеотиды, векторы и способы получения.

Изобретение также предусматривает полинуклеотид, кодирующий химерную молекулу, описанную в данном документе. В тех случаях, когда белок VWF соединен с гетерологичным фрагментом с помощью линкера VWF и с белком FVIII и последовательностью XTEN в химерном белке в виде одной полипептидной цепи, изобретение относится к одному полинуклеотиду, кодирующему одну полипептидную цепь. В тех случаях, когда химерный белок содержит первую и вторую полипептидные цепи, первая полипептидная цепь, содержащая белок VWF, последовательность XTEN и первый гетерологичный фрагмент (например, первую Fc-область), присоединенный с помощью линкера VWF, и вторая полипептидная цепь, содержащая белок FVIII и второй гетерологичный фрагмент (например, вторую Fc-область), полинуклеотид может содержать первую нуклеотидную область и вторую нуклеотидную область. В одном варианте реализации изобретения первая нуклеотидная область и вторая нуклеотидная область находятся в одном и том же полинуклеотиде. В другом варианте реализации изобретения первая нуклеотидная область и вторая нуклеотидная область находятся в двух разных полинуклеотидах (например, разных векторах). В определенных вариантах реализации изобретения настоящее изобретение касается набора полинуклеотидов, содержащих первую нуклеотидную цепь и вторую нуклеотидную цепь, причем первая нуклеотидная цепь кодирует белок VWF, последовательность XTEN, линкер VWF и гетерологичный фрагмент химерного белка, и вторая нуклеотидная цепь кодирует белок FVIII и второй гетерологичный фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения настоящее изобретение касается набора полинуклеотидов, содержащих первую нуклеотидную цепь и вторую нуклеотидную цепь, причем первая нуклеотидная цепь кодирует белок VWF и гетерологичный фрагмент химерного белка, и вторая нуклеотидная цепь кодирует белок FVIII, соединенный со вторым гетерологичным фрагментом с помощью линкера FVIII, причем по меньшей мере одна последовательность XTEN слита с химерным белком. В других вариантах реализации изобретения настоящее изобретение касается набора полинуклеотидов, содержащих первую нуклеотидную цепь и вторую нуклеотидную цепь, причем первая нуклеотидная цепь кодирует белок VWF, линкер VWF и гетерологичный фрагмент химерного белка, и вторая нуклеотидная цепь кодирует белок FVIII, линкер FVIII и второй гетерологичный фрагмент, причем по меньшей мере одна последовательность XTEN слита с химерным белком.

В других вариантах реализации изобретения набор полинуклеотидов дополнительно содержит дополнительную нуклеотидную цепь (например, вторую нуклеотидную цепь, когда химерный полипептид кодируется одной полинуклеотидной цепью, или третью нуклеотидную цепь, когда химерный белок кодируется двумя полинуклеотидными цепями), которые кодируют протеинконвертазу. Протеинконвертаза может быть выбрана из пропротеинконвертазы субтилизин/кексин типа 5 (PCSK5 или PC5), пропротеинконвертазы субтилизин/кексин типа 7 (PCSK7 или PC5), Кех 2 дрожжей, пропротеинконвертазы субтилизин/кексин типа 3 (PACE или PCSK3), или комбинаций двух или больше из них. В некоторых вариантах реализации изобретения протеинконвертаза представляет собой PACE, PC5 или PC7. В конкретном варианте реализации изобретения протеинконвертаза представляет собой PC5 или PC7. См. международную заявку № PCT/US2011/043568, которая включена в данный документ в качестве ссылки. В другом варианте реализации изобретения протеинконвертаза представляет собой PACE/фурин.

В определенных вариантах реализации изобретения изобретение включает набор полинуклеотидов, содержащий первую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок VWF, содержащий домен D' и домен D3 VWF, слитый с первым гетерологичным фрагментом с помощью линкера VWF, вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок FVIII и второй гетерологичный фрагмент, и третью нуклеотидную последовательность, кодирующую домен D1 и домен D2 VWF, где последовательность XTEN присутствует в первой цепи или во второй цепи. В этом варианте реализации изобретения домен D1 и домен D2 экспрессируются раздельно (не связаны с доменом D'D3 белка VWF) для обеспечения надлежащего образования дисульфидной связи и укладки доменов D'D3. Экспрессия домена D1D2 может происходить в цис- или трансконфигурации.

В используемом в данном документе значении экспрессионный вектор относится к любому конструкту нуклеиновой кислоты, который содержит элементы, необходимые для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей последовательности или, в случае вирусного РНК-вектора, необходимые элементы для репликации и трансляции, при введении в пригодную клетку-хозяина. Экспрессионные векторы могут включать плазмиды, фагмиды, вирусы и их производные.

Экспрессионные векторы по изобретению будут включать полинуклеотиды, кодирующие химерную молекулу.

В одном варианте реализации изобретения кодирующая последовательность химерной молекулы функционально связана с контрольной последовательностью экспрессии. В используемом в данном документе значении, две последовательности нуклеиновой кислоты функционально связаны, когда они ковалентно связаны таким образом, чтобы позволить каждой составляющей последовательности нуклеиновой кислоты сохранять свою функциональность. Говорят, что кодирующая последовательность и контрольная последовательность генной экспрессии функционально связаны, когда они ковалентно связаны таким образом, чтобы поместить экспрессию или транскрипцию и/или трансляцию кодирующей последовательности под влияние или контроль контрольной последовательности генной экспрессии. Говорят, что две ДНК-последовательности функционально связаны, если индукция промотора в 5'-последовательности генной экспрессии приводит к транскрипции кодирующей последовательности, и если природа связи между двумя последовательностями ДНК (1) не приводит к введению мутации со сдвигом рамки, (2) не влияет на способность промоторной области направлять транскрипцию кодирующей последовательности, или (3) не влияет на способность соответствующего РНК-транскрипта транслироваться в белок. Таким образом, последовательность генной экспрессии будет функционально связана с кодирующей последовательностью нуклеиновой кислоты, если последовательность генной экспрессии будет способна вызывать транскрипцию этой кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты таким образом, чтобы полученный транскрипт транслировался в желательный белок или полипептид.

Контрольная последовательность генной экспрессии, в используемом в данном документе значении, представляет собой любую регуляторную нуклеотидную последовательность, такую как промоторная последовательность или комбинация промотор-энхансер, которая способствует эффективной транскрипции и трансляции кодирующей нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана. Контрольная последовательность генной экспрессии может, например, быть промотором млекопитающего или вирусным промотором, таким как конститутивный или индуцируемый промотор. Конститутивные промоторы млекопитающих включают, без ограничений, промоторы следующих генов: гипоксантин-фосфорибозилтрансфераза (HPRT), аденозиндеаминаза, пируваткиназа, промотор бета-актина и другие конститутивные промоторы. Типичные примеры вирусных промоторов, которые конститутивно функционируют в эукариотических клетках, включают, например, промоторы цитомегаловируса (CMV), обезьяньего вируса (например, SV40), папилломавируса, аденовируса, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса саркомы Рауса, цитомегаловируса, длинные концевые повторы (LTR) вируса лейкоза Молони и других ретровирусов, и промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса. Другие конститутивные промоторы известны рядовым специалистам в данной области техники. Промоторы, пригодные для использования в качестве последовательностей генной экспрессии по изобретению, также включают индуцируемые промоторы. Индуцируемые промоторы экспрессируются в присутствии индуцирующего агента. Например, промотор металлотионеина индуцируется для промотирования транскрипции и транс-

ляции в присутствии определенных ионов металлов. Другие индуцируемые промоторы известны рядовым специалистам в данной области техники.

В общем, контрольная последовательность генной экспрессии будет включать, по мере необходимости, 5'-нетранскрибируемые и 5'-нетранслируемые последовательности, принимающие участие в инициации транскрипции и трансляции, соответственно, такие как ТАТА-бокс, кэпирующая последовательность, последовательность СААТ и т.п. В частности, такие 5' нетранскрибируемые последовательности будут включать промоторную область, которая включает промоторную последовательность для контроля транскрипции функционально присоединенной кодирующей нуклеиновой кислоты. Последовательности генной экспрессии необязательно включают энхансерные последовательности или, при необходимости, расположенную против хода транскрипции активаторные последовательности.

Вирусные векторы включают, без ограничений, нуклеиновые последовательности следующих вирусов: ретровируса, такого как вирус мышинного лейкоза Молони, вирус мышинной саркомы Харви, мышинный фактор опухоли молочных желез и вирус саркомы Рауса; аденовируса, аденоассоциированного вируса; вирусов типа SV40; полиомавирусов; вирусов Эпштейна-Барр; папилломавирусов; вируса герпеса; вируса коровьей оспы; вируса полиомиелита; и РНК-вируса, такого как ретровирус. Могут быть легко использованы другие векторы, хорошо известные в данной области техники. Определенные вирусные векторы основаны на нецитопатических эукариотических вирусах, в которых несущественные гены были замещены на ген, представляющий интерес. Нечитопатические вирусы включают ретровирусы, жизненный цикл которых включает обратную транскрипцию геномной вирусной РНК в ДНК с последующей провирусной интеграцией в ДНК клетки-хозяина. Ретровирусы были разрешены для проведения испытаний генной терапии человека. Наиболее пригодными являются ретровирусы, дефицитные по репликации (т.е. способные направлять синтез желательных белков, но неспособные производить инфекционные частицы). Такие генетически измененные ретровирусные экспрессионные векторы находят широкое применение в высокоэффективной трансдукции генов *in vivo*. Стандартные протоколы получения дефицитных по репликации ретровирусов (включая стадии включения экзогенного генетического материала в плазмиду, трансфекции упаковывающей клеточной линии плазмидой, продуцирования рекомбинантных ретровирусов упаковывающей клеточной линией, сбор вирусных частиц из среды тканевой культуры и инфицирование клеток-мишеней вирусными частицами) приведены в Kriegler, M., *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, W.H. Freeman Co., New York (1990) и Murry, E. J., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J. (1991).

В одном варианте реализации изобретения вирус представляет собой аденоассоциированный вирус, являющийся двухцепочечным ДНК-вирусом. Аденоассоциированный вирус может быть методами генной инженерии сделан дефицитным по репликации и способен инфицировать широкий спектр клеточных типов и видов. Дополнительно, он обладает такими преимуществами, как теплостойкость и стойкость к действию липидного растворителя; высокая частота трансдукции в клетках различной генеалогии, включая гемопоэтические клетки; и отсутствие ингибирования суперинфекции, тем самым обеспечивая возможность множественных серий трансдукции. Как сообщается, аденоассоциированный вирус может сайт-специфически интегрироваться в клеточную ДНК человека, тем самым минимизируя возможность инсерционного мутагенеза и вариабельность характеристик экспрессии вставленных генов ретровирусной инфекции. Кроме того, инфекции аденоассоциированных вирусов дикого типа прослеживались в тканевых культурах на протяжении более чем 100 пассажей в отсутствие давления отбора, что говорит о том, что геномная интеграция аденоассоциированного вируса представляет собой относительно стабильное явление. Аденоассоциированный вирус может также функционировать внехромосомально.

Другие векторы включают плазмидные векторы. Плазмидные векторы подробно описаны в данной области техники и хорошо известны квалифицированным специалистам в данной области техники. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. В последние несколько лет было обнаружено, что плазмидные векторы являются особенно предпочтительными для доставки генов в клетки *in vivo* благодаря их неспособности к репликации внутри хозяина и интеграции в его геном. Такие плазмиды, однако, имеющие промотор, совместимый с клеткой-хозяином, могут экспрессировать пептид из гена, функционально кодируемого в плазмиде. Некоторые широко используемые плазмиды, доступные от коммерческих поставщиков, включают pBR322, pUC18, pUC19, различные pcDNA-плазмиды, pRC/CMV, различные pCMV-плазмиды, pSV40 и pBlueScript. Дополнительные примеры конкретных плазмид включают pcDNA3.1, номер по каталогу V79020; pcDNA3.1/hygro, номер по каталогу V87020; pcDNA4/myc-His, номер по каталогу V86320; и pBudCE4.1, номер по каталогу V53220, все от фирмы Invitrogen (Carlsbad, CA.). Другие плазмиды хорошо известны рядовым специалистам в данной области техники. Дополнительно, плазмиды могут быть сконструированы на заказ с использованием стандартных методов молекулярной биологии для удаления и/или добавления конкретных фрагментов ДНК.

В одной системе экспрессии на основе насекомых, которая может быть использована для получения белков по изобретению, вирус ядерного полиэдроза (polyhidrosis) *Autographa californica* (AcNPV) используется в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов. Вирус выращивается в клетках *Spodoptera frugiperda*.



Кодирующая последовательность может быть клонирована в несущественные области (например, ген полиэдрана) вируса и помещен под контроль промотора ACNPV (например, промотор полиэдрана). Успешная вставка кодирующей последовательности будет приводить к инаktivации гена полиэдрана и продуцированию неокклюдируемого рекомбинантного вируса (т.е. вируса, не имеющего белковой оболочки, кодируемой геном полиэдрана). Такие рекомбинантные вирусы затем используются для инфицирования клеток *Spodoptera frugiperda*, в которых экспрессируется вставленный ген. (см., например, Smith et al. (1983) *J Virol* 46:584; патент США № 4215051). Дополнительные примеры этой системы экспрессии можно найти в Ausubel et al., eds. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience.

Другая система, которая может быть использована для экспрессии белков по изобретению, представляет собой систему экспрессии гена глутаминсинтетазы, также называемую "экспрессионной системой GS" (Lonza Biologies PLC, Berkshire UK). Эта система экспрессии описана подробно в патенте США № 5981216.

В клетках-хозяевах млекопитающих может быть использован ряд систем экспрессии на основе вирусов. В тех случаях, когда в качестве экспрессионного вектора используется аденовирус, кодирующая последовательность может быть лигирована с комплексом контроля транскрипции/трансляции аденовируса, например поздним промотором и тройственной лидерной последовательностью. Этот химерный ген может быть затем вставлен в геном аденовируса путем *in vitro* или *in vivo* рекомбинации. Вставка в несущественную область вирусного генома (например, область E1 или E3) будет приводить к получению рекомбинантного вируса, который является жизнеспособным и способен экспрессировать пептид в инфицированных хозяевах. См., например, Logan & Shenk (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3655). Альтернативно, может быть использован промотор 7,5 К коровьей оспы. См., например, Mackett et al. (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7415; Mackett et al. (1984) *J Virol* 49:857; Panicali et al. (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* 79:4927.

Для повышения эффективности продуцирования, полинуклеотиды могут быть сконструированы таким образом, чтобы они кодировали множество звеньев белка по изобретению, разделенных сайтами ферментативного расщепления. Полученный полипептид может быть расщеплен (например, путем обработки пригодным ферментом) для выделения полипептидных звеньев. Это может увеличивать выход полипептидов, управляемый одним промотором. В случае использования в пригодных системах вирусной экспрессии, управление трансляцией каждого полипептида, кодируемого мРНК, осуществляется внутри транскрипта; например, внутренним рибосомо-связывающим сайтом, IRES. Таким образом, полицистронный конструктор направляет транскрипцию отдельной большой полицистронной мРНК, которая, в свою очередь, управляет трансляцией множества индивидуальных полипептидов. Этот подход устраняет продуцирование и ферментативный процессинг полипротеинов и может значительно увеличить выход полипептидов, управляемый одним промотором.

Векторы, используемые для трансформации, будут обычно содержать селективируемый маркер, используемый для идентификации трансформантов. В бактериальных системах, они могут включать ген резистентности к антибиотикам, такому как ампициллин или канамицин. Селективируемые маркеры для использования в культивируемых клетках млекопитающего включают гены, придающие резистентность к лекарственным средствам, таким как неомизин, гиромизин и метотрексат. Селективируемый маркер может быть амплифицируемым селективируемым маркером. Одним из амплифицируемых селективируемых маркеров является ген дигидрофолатредуктазы (DHFR). Simonsen C C et al. (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2495-9. Обзор селективируемых маркеров выполнен Thilly (1986) *Mammalian Cell Technology*, Butterworth Publishers, Stoneham, Mass, и выбор селективируемых маркеров легко доступен рядовому специалисту в данной области техники.

Селективируемые маркеры могут быть введены в клетку на отдельной плазмиде в то же время, что и ген, представляющий интерес, или они могут быть введены на той же самой плазмиде. При использовании одной и той же самой плазмиды, селективируемый маркер и ген, представляющий интерес, могут находиться под контролем разных промоторов или одного и того же промотора, причем в последнем случае продуцируется дицистронная мРНК. Конструкции этого типа известны в данной области техники (например, патент США № 4713339).

Экспрессионные векторы могут кодировать метки, позволяющие легко очищать рекомбинантно полученный белок. Примеры включают, без ограничений, вектор pUR278 (Ruther et al. (1983) *EMBO J* 2:1791), в котором кодирующие последовательности белка, который должен экспрессироваться, могут быть лигированы в вектор в рамке с кодирующей областью *lac z*, так чтобы был получен меченый слитый белок; векторы pGEX могут быть использованы для экспрессии белков по изобретению с меткой глутатион-S-трансферазы (GST). Такие белки обычно являются растворимыми и могут быть легко очищены от клеток путем адсорбции на глутатион-агарозных бусинах с последующей элюцией в присутствии свободного глутатиона. Векторы включают сайты расщепления (тромбином или протеазой фактора Ха или PRESSION PRONEASE™ (Pharmacia, Reasack, N. J.)) для простоты удаления метки после очистки.

Экспрессионный вектор или векторы затем трансфицируют или котрансфицируют в пригодную клетку-мишень, которая экспрессирует полипептиды. Методы трансфекции, известные в данной области

техники, включают, без ограничений, осаждение фосфата кальция (Wigler et al. (1978) Cell 14:725), электропорацию (Neumann et al. (1982) EMBO J 1:841) и использование реагентов на основе липосом. Различные системы хозяин-экспрессионный вектор могут быть использованы для экспрессии белков, описанных в данном документе, включая как прокариотические, так и эукариотические клетки. Они включают, без ограничений, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli*), трансформированные экспрессионными векторами на основе ДНК рекомбинантного бактериофага или плазмидной ДНК, содержащими пригодную кодирующую последовательность; дрожжи или нитчатые грибы, трансформированные экспрессионными векторами рекомбинантных дрожжей или грибов, содержащими пригодную кодирующую последовательность; системы на основе клеток насекомых, инфицированных экспрессионными векторами на основе рекомбинантного вируса (например, бакуловируса) содержащими пригодную кодирующую последовательность; системы растительных клеток, инфицированных экспрессионными векторами на основе рекомбинантного вируса (например, вируса мозаики цветной капусты или вируса мозаики табака), или трансформированных экспрессионными векторами на основе рекомбинантной плазмиды (например, T1-плазмиды), содержащими пригодную кодирующую последовательность; или системы клеток животных, включая клетки млекопитающего (например, клетки НЕК 293, CHO, Cos, HeLa, HKB11 и ВНК).

В одном варианте реализации изобретения клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку. В используемом в данном документе значении, эукариотическая клетка относится к любой животной или растительной клетке, имеющей определенное ядро. Эукариотические клетки животных включают клетки позвоночных, например млекопитающих и клетки беспозвоночных, например насекомых. Эукариотические клетки растений могут включать, в частности, без ограничений, дрожжевые клетки. Эукариотическая клетка отличается от прокариотической клетки, например, бактерий. В определенных вариантах реализации изобретения эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего. Клетка млекопитающего является любой клеткой, полученной от млекопитающего. Клетки млекопитающего конкретно включают, без ограничений, клеточные линии млекопитающих. В одном варианте реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой человеческую клетку. В другом варианте реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку НЕК 293, которая является клеточной линией почки эмбриона человека. Клетки НЕК 293 доступны как CRL-1533 из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, Manassas, VA) и как клетки 293-H, № кат. 11631-017, или клетки 293-F, № кат. 11625-019, от фирмы Invitrogen (Carlsbad, Calif.). В некоторых вариантах реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку PER.C6, которая является человеческую клеточную линию, выделенную из сетчатки. Клетки PER.C6 доступны от фирмы Scudell (Leiden, Netherlands). В других вариантах реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO). Клетки CHO доступны от Американской коллекции типовых культур (Manassas, VA) (например, CHO-K1; CCL-61). В еще одних вариантах реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку почки детеныша хомяка (ВНК). Клетки ВНК доступны от Американской коллекции типовых культур (Manassas, Va.) (например, CRL-1632). В некоторых вариантах реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку НКВ11, которая является гибридной клеточной линией клетки НЕК293 и человеческой В-клеточной линии. Mei et al, Mol. Biotechnol. 34(2): 165-78 (2006). В одном варианте реализации изобретения плазида, кодирующая белок VWF, линкер VWF, гетерологичный фрагмент или химерный белок по изобретению, дополнительно включает селективируемый маркер, например, резистентности к зеоцину, и трансфицируется в клетки НЕК 293 для продуцирования химерного белка. В еще одних вариантах реализации изобретения трансфицированные клетки являются стабильно трансфицированными. Такие клетки могут быть селективированы и поддерживаться в виде стабильной клеточной линии с использованием обычных методик, известных квалифицированным специалистам в данной области техники. Клетки-хозяева, содержащие ДНК-конструкты белка, выращивают в пригодной питательной среде. В используемом в данном документе значении, термин "пригодная питательная среда" означает среду, содержащую питательные вещества, требующиеся для роста клеток. Питательные вещества, необходимые для роста клеток, могут включать источник углерода, источник азота, незаменимые аминокислоты, витамины, минеральные вещества и факторы роста. Необязательно, среды могут содержать один или более факторов селекции. Необязательно, среды могут содержать сыворотку теленка или сыворотку плода коровы (FCS). В одном варианте реализации изобретения среды по существу не содержат IgG. Питательную среду обычно подвергают селективированию на клетки, содержащие ДНК-конструкт, например, с помощью лекарственного средства или дефицита необходимого питательного вещества, которые дополняются селективируемым маркером на ДНК-конструкте, или ко-трансфицированные ДНК-конструктом. Культивируемые клетки млекопитающих обычно выращивают в коммерчески доступных содержащих сыворотку или бессывороточных средах (например, MEM, DMEM, DMEM/F12). В одном варианте реализации изобретения среда представляет собой CD293 (Invitrogen, Carlsbad, CA.). В другом варианте реализации изобретения среда представляет собой CD17 (Invitrogen, Carlsbad, CA.). Выбор среды, пригодной для конкретной используемой клеточной линии, легко доступен рядовым специалистам в данной области техники.

Для коэкспрессии двух полипептидных цепей химерной молекулы, как описано в данном документе, клетки-хозяева культивируют в условиях, обеспечивающих возможность экспрессии обеих цепей. В используемом в данном документе значении, культивация относится к поддержанию жизнеспособности клеток *in vitro* в течение, по меньшей мере, определенного времени. Поддержание может необязательно включать увеличение популяции живых клеток. Например, клетки, поддерживаемые в культуре, могут быть статичными по популяции, но при этом жизнеспособными и способными продуцировать желательный продукт, например рекомбинантный белок или рекомбинантный слитый белок. Пригодные условия для культивации эукариотических клеток хорошо известны в данной области техники и включают надлежащий выбор культуральных сред, добавок для сред, температуры, pH, кислородного насыщения и т.п. Для коммерческих целей, культивация может включать использование любой из различных типов систем масштабирования, включая встряхиваемые колбы, роллер-флаконы, биореакторы на основе полых волокон, биореакторы с перемешиваемой емкостью, эрлифтные биореакторы, биореакторы Wave и другие.

Условия клеточных культур также выбирают таким образом, чтобы обеспечить возможность ассоциации первой цепи и второй цепи химерной молекулы. Условия, позволяющие осуществлять экспрессию химерной молекулы, могут включать присутствие источника витамина K. Например, в одном варианте реализации изобретения стабильно трансфицированные клетки НЕК 293 культивируют в среде CD293 (Invitrogen, Carlsbad, CA) или среде OptiCHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) с добавкой 4 мМ глутамин. В одном аспекте настоящее изобретение касается способа экспрессии, получения или продуцирования химерного белка, включающего: а) трансфекцию клетки-хозяина полинуклеотидом, кодирующим химерную молекулу, и б) культивацию клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, пригодных для экспрессии химерной молекулы, в котором осуществляется экспрессия химерной молекулы.

В дополнительных вариантах реализации изобретения белковый продукт, содержащий химерную молекулу, секретируется в среду. Среда отделяется от клеток, концентрируется, фильтруется и затем пропускается через две или три колонки для аффинной хроматографии, например колонку с белком А и одну или две анионнообменные колонки.

В определенных аспектах настоящее изобретение относится к химерному полипептиду, полученному способами, описанными в данном документе.

*In vitro* продуцирование позволяет осуществлять масштабирование для получения больших количеств желательных измененных полипептидов по изобретению. Методики культивации клеток млекопитающих в условиях для тканевых культур известны в данной области техники и включают гомогенную суспензионную культуру, например, в эрлифтном реакторе или в реакторе с непрерывным перемешиванием, или иммобилизованную или удерживаемую клеточную культуру, например, в пустотелых волокнах, микрокапсулах, на агарозных микробусинах или керамических картриджах. При необходимости и/или желании, растворы полипептидов могут быть очищены обычными хроматографическими способами, например гель-фильтрацией, ионообменной хроматографией, хроматографией гидрофобных взаимодействий (HIC), хроматографией на DEAE-целлюлозе или аффинной хроматографией.

Изобретение также включает способ улучшения F VIII-активности химерного белка FVIII, содержащего белок VWF, слитый с первым гетерологичным фрагментом и последовательностью XTEN, и белок FVIII, соединенный со вторым гетерологичным фрагментом, включающий вставку линкера VWF между белком VWF и первым гетерологичным фрагментом, причем линкер VWF содержит полипептид, выбранный из: (i) области a2 из фактора VIII (FVIII); (ii) области a1 из FVIII; (iii) области a3 из FVIII; (iv) сайта расщепления тромбином, содержащего X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любой их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения FVIII-активность измеряют путем анализа активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) или методом ротационной тромбоэластометрии (ROTEM).

#### IV. Фармацевтическая композиция.

Композиции, содержащие химерную молекулу по настоящему изобретению, могут содержать пригодный фармацевтически приемлемый носитель. Например, они могут содержать эксципиенты и/или вспомогательные вещества, облегчающие переработку активных соединений в препараты, предназначенные для доставки к месту действия.

Фармацевтическая композиция может быть составлена для парентерального введения (т.е. внутривенного, подкожного, или внутримышечного) путем болюсной инъекции. Композиции для инъекций могут быть представлены в дозированных лекарственных формах, например в ампулах или в многодозовых контейнерах с добавленным консервантом. Композиции могут иметь такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, активный ингредиент может находиться в форме порошка для восстановления пригодным носителем, например апиогенной водой.

Пригодные композиции для парентерального введения также включают водные растворы активных соединений в водорастворимой форме, например, водорастворимых солей. Кроме того, суспензии активных соединений могут быть введены в виде соответствующих масляных суспензий для инъекции. Пригодные липофильные растворители или носители включают жирные масла, например кунжутное масло,

или сложные эфиры синтетических жирных кислот, например этилолеат или триглицериды. Водные суспензии для инъекции могут содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, включая, например, натрия карбоксиметилцеллюлозу, сорбит и декстран. Необязательно, суспензия может также содержать стабилизаторы. Липосомы также могут быть использованы для инкапсулирования молекул по изобретению для доставки в клетки или интерстициальное пространство. Типичными примерами фармацевтически приемлемых носителей являются физиологически совместимые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие всасывание агенты, вода, солевой раствор, фосфатно-солевой буфер, декстроза, глицерин, этанол и т.п. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция содержит изотонические агенты, например сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. В других вариантах реализации изобретения композиции содержат фармацевтически приемлемые вещества, такие как смачивающие агенты или небольшие количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты или буферы, которые увеличивают срок хранения или эффективность активных ингредиентов.

Композиции по изобретению могут находиться в различных формах, включая, например, жидкости (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии, суспензии, полутвердые и твердые лекарственные формы. Предпочтительная форма зависит от способа введения и терапевтического применения.

Композиция может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосом или других упорядоченных структур, пригодных для обеспечения высоких концентраций лекарственного средства. Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения активного ингредиента в требуемом количестве в пригодный растворитель с одним из или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, в зависимости от потребности, с последующей стерилизацией фильтрованием. В общем, дисперсии готовят путем включения активного ингредиента в стерильный носитель, содержащий основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций, предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и лиофилизация, позволяющие получить порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желательный ингредиент из предварительно стерильно профильтрованного раствора. Надлежащая текучесть раствора может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии, и путем использования поверхностно-активных веществ. Пролонгированное всасывание композиций для инъекций может быть обеспечено путем включения в композиции агента, замедляющего всасывание, например моностеаратных солей и желатина.

Композиция активного ингредиента может быть приготовлена с использованием рецептуры композиции или устройства с пролонгированным высвобождением. Примеры таких композиций и устройств включают имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биodeградируемые биосовместимые полимеры, например этилен-винилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота. Способы получения таких композиций и устройств известны в данной области техники. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Композиции депо для инъекций могут быть изготовлены путем формирования микроинкапсулированных матриц лекарственного средства в биodeградируемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения лекарственного средства и полимера, и природы используемого полимера, можно контролировать скорость высвобождения лекарственного средства. Другими типичными примерами биodeградируемых полимеров являются полиортоэфиры и полиангидриды. Композиции депо для инъекций также могут быть приготовлены путем захвата лекарственного средства в липосомы или микроэмульсии.

В композиции могут быть включены дополнительные активные соединения. В одном варианте реализации изобретения составляется композиция химерной молекулы по изобретению с другим фактором свертывания крови, или его вариантом, фрагментом, аналогом или производным. Например, фактор свертывания крови включает, без ограничений, фактор V, фактор VII, фактор VIII, фактор IX, фактор X, фактор XI, фактор XII, фактор XIII, протромбин, фибриноген, фактор фон Виллебранда или рекомбинантный растворимый тканевый фактор (rTF) или активированные формы любых вышеперечисленных материалов. Фактор свертывания крови гемостатического средства может также включать антифибринолитические лекарственные средства, например эpsilon-аминокапроновую кислоту, транексамовую кислоту.

Схемы дозирования могут быть отрегулированы для обеспечения оптимальных желательных ответов. Например, может быть введен разовый болюс, может быть введено несколько дробных доз на протяжении определенного периода времени, или доза может быть пропорционально снижена или увеличена в зависимости от требований терапевтической ситуации. Композиции для парентерального введения предпочтительно составляют в виде дозированных лекарственных форм для простоты введения и равномерности дозирования. См., например, *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Pub. Co., Easton, Pa. 1980).

Помимо активного соединения, жидкая лекарственная форма может содержать инертные ингредиенты, такие как вода, этиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла, глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана.

Неограничивающие примеры пригодных фармацевтических носителей также описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences by E. W. Martin. Некоторые примеры эксципиентов включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицеринмоностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое снятое молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Композиция может также содержать буферные реагенты для регулирования pH и смачивающие или эмульгирующие агенты.

Для перорального введения фармацевтическая композиция может находиться в форме таблеток или капсул, приготовленных обычными способами. Композиция также может быть приготовлена в виде жидкости, например сиропа или суспензии. Жидкость может включать суспендирующие агенты (например, сироп сорбит, производные целлюлозы или гидрированные пищевые жиры), эмульгирующие агенты (лецитин или гуммиарабик), неводные носители (например, миндальное масло, масляные сложные эфиры, этиловый спирт или фракционированные растительные масла) и консерванты (например, метил- или пропил-п-гидроксibenzoаты или сорбиновую кислоту). Препараты могут также включать вкусовые вещества, красящие вещества и подсластители.

Альтернативно, композиция может представлять собой сухой продукт для восстановления водой или другим пригодным носителем.

Для буккального введения композиция может иметь форму таблеток или пастилок в соответствии с обычными протоколами.

Для введения путем ингаляции соединения для использования в соответствии с настоящим изобретением обычно доставляются в виде распыленного аэрозоля с эксципиентами или без них, или в виде распыляемого аэрозоля из упаковки под давлением или небулайзера, необязательно, с пропеллентом, например дихлордифторметаном, трихлорфторметаном, дихлортетрафторметаном, двуокисью углерода или другим пригодным газом. В случае аэрозоля под давлением дозирующее устройство может быть получено путем обеспечения клапана для доставки дозируемого количества. Могут быть изготовлены композиции для капсул и картриджей, например, изготовленных из желатина, для использования ингаляторе или инсуфляторе, содержащие порошкообразную смесь соединения и пригодной порошкообразной основы, такой как лактоза или крахмал. Фармацевтическая композиция также может быть приготовлена для ректального введения в виде суппозитория или удерживающей клизмы, например, содержащих обычные основы для суппозиторий, такие как какао-масло или другие глицериды.

#### V. Генная терапия.

Химерная молекула по изобретению может быть получена *in vivo* у млекопитающего, например пациента, (для которого) использование генно-терапевтического подхода к лечению связанной с кровотечением болезни или расстройства, выбранных из нарушения свертываемости крови, гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения в ротовой полости, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в полости рта, травмы, повреждения черепа, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома кости, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве, или кровоизлияния во влагалище подвздошно-поясничной мышцы будет терапевтически полезным. В одном варианте реализации изобретения связанная с кровотечением болезнь или расстройство представляют собой гемофилию. В другом варианте реализации изобретения связанная с кровотечением болезнь или расстройство представляют собой гемофилию А. При этом предусматривается введение пригодной химерной молекулы, кодирующей нуклеиновую кислоту, функционально связанную с пригодными контрольными последовательностями экспрессии. В определенных вариантах реализации изобретения такие последовательности включены в вирусный вектор. Пригодные вирусные векторы для такой генной терапии включают аденовирусные векторы, лентивирусные векторы, бакуловирусные векторы, векторы на основе вируса Эпштейна-Барр, паповавирусные векторы, векторы на основе вируса коровьей оспы, векторы на основе вируса простого герпеса и аденоассоциированные вирусные (AAV) векторы. Вирусный вектор может быть вирусным вектором с дефектом репликации. В других вариантах реализации изобретения аденовирусный вектор имеет делецию в его гене E1 ген или гене E3. В тех случаях, когда используется аденовирусный вектор, млекопитающее может не подвергаться воздействию нуклеиновой кислоты, кодирующей ген селективируемого маркера. В других вариантах реализации изобретения последовательности включены в невирусный вектор, известный квалифицированным специалистам в данной области техники.

#### VI. Способы применения химерного белка.

Настоящее изобретение дополнительно предусматривает способ снижения частоты или тяжести эпизода кровотечения у субъекта, нуждающегося в этом, с использованием химерной молекулы по изобретению. Типичный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества химерной молекулы по изобретению. В других аспектах изобретение включает

способ предотвращения возникновения эпизода кровотечения у субъекта, нуждающегося в этом, с использованием химерной молекулы по изобретению. В других аспектах композиция, содержащая ДНК, кодирующую рекомбинантный белок по изобретению, может быть введена субъекту, нуждающемуся в этом. В определенных аспектах изобретения, клетка, экспрессирующая химерную молекулу по изобретению, может быть введена субъекту, нуждающемуся в этом. В определенных аспектах изобретения фармацевтическая композиция содержит (i) химерную молекулу, (ii) выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерную молекулу, (iii) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую химерную молекулу, (iv) клетку, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерную молекулу и/или вектор, содержащий нуклеиновую (кислоту), кодирующую химерную молекулу, или (v) их комбинацию, и фармацевтические композиции дополнительно содержат приемлемый эксципиент или носитель. Эпизод кровотечения может быть вызван или возникнуть вследствие расстройства свертывания крови. Расстройство свертывания крови также может быть названо коагулопатией. В одном примере, расстройство свертывания крови, которое можно лечить фармацевтической композицией в соответствии с данным описанием, представляет собой гемофилию или болезнь фон Виллебранда (vWD). В другом примере, расстройство свертывания крови, которое можно лечить фармацевтической композицией в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой гемофилию А. В некоторых вариантах реализации изобретения тип кровотечения, ассоциированного с состоянием кровотечения, выбирают из гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения в ротовой полости, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в полости рта, травмы, повреждения черепа, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома кости, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве, кровоизлияния во влагалище подвздошно-поясничной мышцы или любой их комбинации. В других вариантах реализации изобретения субъект, страдающий от состояния кровотечения, нуждается в хирургическом лечении, включая, например, хирургическую профилактику или периоперационную медицинскую помощь. В одном примере, хирургию выбирают из малого хирургического вмешательства и обширного хирургического вмешательства. Типичные примеры хирургических процедур включают удаление зуба, тонзиллэктомию, паховое грыжесечение, синовэктомию, краниотомию, остеосинтез, травматологическую хирургию, интракраниальную хирургию, интраабдоминальную хирургию, интраторакальную хирургию, хирургию замены суставов (например, полное протезирование коленного сустава, протезирование тазобедренного сустава и т.п.), сердечную хирургию и кесарево сечение. В другом примере субъект получает сопутствующее лечение фактором IX. Поскольку соединения по изобретению способны активировать FIXa, они могут быть использованы для предварительной активации полипептида FIXa перед введением FIXa субъекту. Способы по изобретению могут практиковаться на субъекте, нуждающемся в профилактическом лечении или лечении "по требованию". Фармацевтические композиции, содержащие химерную молекулу по изобретению, могут быть составлены для любого пригодного способа введения, включая, например, местное (например, трансдермальное или глазное), пероральное, буккальное, назальное, вагинальное, ректальное или парентеральное введение. Термин "парентеральный", в используемом в данном документе значении, включает подкожную, интрадермальную, интраваскулярную (например, внутривенную), внутримышечную, спинальную, внутричерепную, интратекальную, внутриглазную, периокулярную, интраорбитальную, интрасиновиальную и интраперитонеальную инъекцию, а также любую подобную методику инъекции или инфузии. Композиция может быть также, например, суспензией, эмульсией, композицией с пролонгированным высвобождением, кремом, гелем или порошком. Композиция может быть составлена в виде суппозитория, с традиционными связующими и носителями, такими как триглицериды. После подробного описания настоящего изобретения его можно будет лучше понять со ссылкой на приведенные далее примеры, приведенные в данном документе только для иллюстрации и не ограничивающие изобретение. Все патенты и публикации, указанные в данном документе, положительным образом включены в данный документ в качестве ссылок.

### Примеры

В примерах были использованы следующие материалы и способы, если не указано иное.

Материалы и способы.

В общем, в практике настоящего изобретения используются, если не указано иное, обычные методики химии, биофизики, молекулярной биологии, технологии рекомбинантных ДНК, иммунологии (особенно, например, технологии антител) и стандартные методы электрофореза. См., например, Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989); *Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 510, Paul, S., Humana Pr (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169)*, McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow et al., CS.H.L. Press, Pub. (1999); и *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992).

Пример 1. Оценка тромбин-медируемого высвобождения D'D3 различными конструктами VWF.

Этот пример оценивает кинетику тромбин-медируемого высвобождения D'D3 при 37°C различными конструктами VWF, проиллюстрированными на фиг. 2. Эксперименты Bioscore проводились с кон-

структами VWF-Fc, содержащими разные расщепляемые тромбином линкеры между доменом D'D3 VWF и Fc. Конечной целью является использование информации, полученной при гидролизе тромбином VWF-Fc, по отношению к гетеродимерам FVIII-VWF, описанным в данном документе. Все конструкторы VWF-D'D3 пропускались над чипом для достижения плотностей связывания белка в диапазоне значений 100-700 RU. После связывания конструктора VWF с чипом, 5 ед./мл тромбина вводят в объем нал поверхностью на 5 мин. Fc остается связанным с чипом, в то время как D'D3 в расщепляемых конструкторах высвобождается. Строили график зависимости скорости (RU/с) от плотности захвата (RU), как проиллюстрировано на фиг. 3 и 4. Скорость расщепления пропорциональна начальной плотности захвата, а наклон кривой является мерой восприимчивости каждого конструктора к расщеплению тромбином.

Фиг. 3 иллюстрирует, что VWF-052 (не имеющий сайта расщепления тромбином в линкерной области), как ожидалось, не расщепляется тромбином. Величина скорости для VWF-039 (LVPR с сайтом PAR1) сопоставима со скоростью расщепления FVIII (данные не приведены). Таким образом, VWF-039 служит точкой отсчета для полного высвобождения D'D3 от Fc. Соотношения величин наклона для различных конструкторов VWF-Fc по отношению к VWF-039 использовали для определения эффективности расщепления тромбином. VWF-039 (LVPR с сайтом PAR1) расщепляется тромбин в около 70-80 раз быстрее, чем VWF-031 (LVPR). VWF-51 (ALRPRVV) расщепляется в 1,8 раза быстрее, чем VWF-031 (LVPR). VWF-034, содержащий 288 XTEN рядом с (along) сайтом LVPR, демонстрировал более медленное расщепление по сравнению с VWF-031. Были также получены конструкторы VWF-Fc путем введения разных кислотных областей (a1, a2 и a3) белка FVIII в линкерную область. VWF-055, содержащий область a2 между D'D3 и областью Fc, демонстрирует расщепление тромбином, близкое к конструктору VWF-039. Как проиллюстрировано на фиг. 4, VWF-054 (область a1) и VWF-056 (область a3) продемонстрировали в около 5 раз более медленное расщепление тромбином.

Фиг. 5 иллюстрирует величины наклона кривых расщепления тромбином для разных конструкторов VWF. Из этих результатов следует, что кислотная область 2 (a2) FVIII является высокоэффективным сайтом расщепления тромбином, и она была включена в гетеродимеры FVIII-VWF, как описано в данном документе.

Пример 2. Оценка гемостатической способности гетеродимеров FVIII/VWFD'D3 с помощью анализа методом ROTEM цельной крови пациента с гемофилией А (HemA).

Гетеродимеры FVIII/VWFD'D3, содержащие разные расщепляемые тромбином линкеры, оценивали с помощью анализа методом ROTEM (ротационной тромбоэластометрии) цельной крови донора с гемофилией А (HemA) на их способность влиять на гемостаз. Образец цельной крови брали у донора с тяжелой гемофилией А, сопровождающейся повышенной кровоточивостью, с использованием цитрата натрия в качестве антикоагулянта. Через 40 мин после взятия образца крови, варианты гетеродимера FVIII/VWFD'D3, содержащие разные расщепляемые тромбином линкеры -FVIII155/VWF031 (48 аминокислот, сайт LVPR), FVIII155/VWF039 (26 аминокислот, сайт LVPR+PAR1), FVIII155/VWF055 (34 аминокислоты, a2 из FVIII) разводили в образце цельной крови до конечной концентрации, составляющей 100, 30, 10 и 3% от нормальной, при измерении методом хромогенного анализа FVIII. Немедленно после прибавления гетеродимеров FVIII/VWFD'D3, реакцию ROTEM запускали путем прибавления CaCl<sub>2</sub>. Время свертывания (время до достижения амплитуды 2 мм от начала теста) регистрировали с помощью инструмента и строили график зависимости от концентрации FVIII в образцах (фиг. 6). Было выдвинуто предположение, что более сильнодействующий гетеродимер FVIII/VWFD'D3 будет индуцировать более быстрый процесс свертывания, приводя, таким образом, к более коротким временам свертывания по сравнению с менее активным гетеродимером FVIII/VWFD'D3. Как показано на фиг. 6, образцы с добавлением гетеродимера FVIII/VWF039 имели самое короткое время свертывания при всех протестированных концентрациях, а образцы с добавлением гетеродимера FVIII/VWF031 имели самое большое время свертывания при всех концентрациях. Время свертывания образцов с добавлением гетеродимера FVIII155/VWF055 имеет промежуточные значения. Таким образом, гемостатическая способность изменяется в порядке FVIII155/VWF039>FVIII155/VWF055>FVIII155/VWF031. Поскольку единственным отличием между этими тремя молекулами являются расщепляемые тромбином линкеры между белком VWF и Fc-областью, результаты указывают, что линкер, содержащий сайт LVPR и мотив экзосайта взаимодействия PAR1 и область a2 FVIII, функционирует лучше, чем один лишь сайт LVPR.

Пример 3. Оценка активности гетеродимеров FVIII/VWF.

Гетеродимерные конструкторы FVIII-XTEN/VWF трансфицировали в клетки HEK293F с использованием трех плазмид: первая экспрессировала FVIII-XTEN-Fc, вторая экспрессировала VWF-XTEN-Fc и третья экспрессировала PACE. Для трансфекции использовали стандартный протокол с полиэтиленимином (PEI) и после 5 дней трансфекции собирали среду тканевых культур. Из сред были выделены различные комбинации гетеродимеров FVIII-VWF. Активность очищенного белка тестировали с использованием как хромогенного (двухстадийный), так и АЧТВ (одностадийный) анализы свертывания с использованием стандартных протоколов. Введение кислотной области 2 (a2) FVIII или между D'D3 и Fc, или между D'D3 и Fc (как указано в табл. 7А и на фиг. 7) улучшает АЧТВ-активность гетеродимера FVIII-VWF, как показано в табл. 7С. Например, гетеродимер FVIII169/VWF059 имеет сайт расщепления тромбином a2 в линкерной области D'D3-Fc и имеет лучшую АЧТВ-активность, чем FVIII169/VWF057,

который содержит тромбиновый сайт LVPR в линкере D'D3Fc, как показано в табл. 7С. Аналогично, включение области a2 между FVIII и Fc увеличивает одностадийную свертывающую активность гетеродимера, как видно по улучшенному соотношению результатов хромогенного и АЧТВ-анализов для FVIII286/VWF059 и FVIII286/VWF062, как показано в табл. 7В.

Таблица 7А

Последовательность №	Конструкт	Длина линкера между FVIII и Fc (аминокислот)	Тромбиновый сайт в линкере
1	FVIII169	-	отсутствует
2	FVIII286	32	FVIII-a2
Последовательность №	Конструкт	Длина линкера между D'D3 и Fc (аминокислот)	Тромбиновый сайт в линкере
1	VWF057	144AE XTEN+ 35+ LVPR	LVPR
2	VWF059	144AE XTEN+ 32	FVIII-a2
3	VWF062	144AE XTEN	отсутствует

Таблица 7В

Конструкты	Отношение хромогенный/АЧТВ
FVIII169/VWF057	2,51
FVIII169/VWF059	1,67
FVIII169/VWF062	2,7
FVIII286/VWF059	0,69
FVIII286/VWF062	0,83

Таблица 7С

Конструкты	Хромо-специфическая активность (МЕ/пмоль)	АЧТВ-специфическая активность (МЕ/пмоль)
FVIII169/VWF057	1,60	0,65
FVIII169/VWF059	1,60	0,90
FVIII169/VWF062	0,87	0,32
FVIII286/VWF059	1,35	1,96
FVIII286/VWF062	1,08	1,33

Пример 4. Острая эффективность гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc/D'D3-XTEN-Fc в модели кровотечения НемА-мышей с обрезанным кончиком хвоста.

Острую эффективность гетеродимеров, содержащих разные расщепляемые тромбином линкеры, оценивали с использованием модели кровотечения НемА-мышей с обрезанным кончиком хвоста.

Самцов НемА-мышей в возрасте 8-12 недель рандомизировали на 5 экспериментальных групп и проводили им однократное внутривенное введение SQ BDD-FVIII, rFVIII169/VWF034, rFVIII169/VWF057, rFVIII169/VWF059 или раствора носителя, соответственно. Для имитации эпизодического лечения с помощью FVIII (для восстановления до 50-100% нормального уровня FVIII в плазме), выбранная лечебная доза FVIII составляла 75 МЕ/кг при измерении по АЧТВ-активности FVIII. При таком уровне дозировки, все тестируемые варианты FVIII будут восстанавливать ок. 70% от нормальной FVIII-активности в плазме мышей через 5 мин после введения дозы.

Процедуру обрезания кончика хвоста проводили следующим образом. Вкратце, мышей анестезировали коктейлем 50 мг/кг кетамина/0,5 мг/кг дексмететомидина до травмы хвоста и помещали на грелку-подушку при 37°C для поддержания температуры тела. Хвосты мышей затем погружали в нагретый до 37°C солевой раствор на 10 мин для расширения латеральной вены. После расширения вены, варианты FVIII или раствор носителя вводили инъекцией через хвостовую вену и кончик хвоста затем отрезали на расстоянии 5 мм от конца с помощью скальпеля № 11 с прямым лезвием через 5 мин после введения дозы. Вытекающую кровь собирали в 13 мл солевого раствора с температурой 37 С в течение 30 мин, и объем потери крови определяли по изменению веса пробирки с собранной кровью: объем потери крови=(вес пробирки в конце определения-начальный вес+0,10) мл. Проводят статистический анализ с использованием t-критерия (тест Колмогорова-Смирнова) и однофакторный дисперсионный анализ (тест Крускал-Уоллис, апостериорный анализ: критерий Данна с многократным сравнением). Строили график объема потери крови для каждого индивидуального животного в исследованиях, приведенный на фиг. 8. Значительное снижение объема потери крови наблюдалось для всех экспериментальных групп FVIII по сравнению с животными, получавшими носитель (p<0,05, табл. 8). Аналогичное снижение потери крови наблюдалось для всех экспериментальных групп гетеродимеров по сравнению с введением BDD-FVIII (p>0,5, табл. 8), что позволяет предположить, что молекулы гетеродимера могут потенциально быть такими же эффективными, как и SQ BDD-FVIII при лечении по необходимости.



Таблица 8.  $\beta$ -значение для теста Колмогорова-Смирнова

	FVIII169/VWF034	FVIII169/VWF057	FVIII169/VWF059
BDD-FVIII	0,7591	0,9883	0,5176
Носитель	0,0006	0,0006	0,0266

**Нуклеотидная последовательность рSYN VWF057 (D<sup>3</sup>D3-Fc VWF с тромбиновым сайтом LVPR в линкере) (SEQ ID NO: 79)**

```

1   ATGATTCCTG CCAGATTTGC CGGGGTGCTG CTTGCTCTGG CCCTCATTTT
51  GCCAGGGACC CTTTGTGCAG AAGGAACTCG CGGCAGGTCA TCCACGGCCC
101 GATGCAGCCT TTTCCGAAGT GACTTCGTCA ACACCTTTGA TGGGAGCATG
151 TACAGCTTTG CGGGATACTG CAGTTACCTC CTGGCAGGGG GCTGCCAGAA
201 ACGCTCCTTC TCGATTATTG GGGACTTCCA GAATGGCAAG AGAGTAGACC
251 TCTCCGTGTA TCTTGGGGAA TTTTGTGACA TCCATTTGTT TGTCAATGGT
301 ACCGTGACAC AGGGGGACCA AAGAGTCTCC ATGCCCTATG CCTCCAAAGG
351 GCTGTATCTA GAAACTGAGG CTGGGTACTA CAAGCTGTCC GGTGAGCCTC
401 ATGGCTTTGT GGCCAGGATC GATGGCAGCG GCAACTTTCA AGTCTCTGTG
451 TCAGACAGAT ACTTCAACAA GACCTGCGGG CTGTGTGGCA ACTTTAACAT
501 CTTTGTGTA GATGACTTTA TGACCAAGA AGGGACCTTG ACCTCGGACC
551 CTTATGACTT TGCCAACTCA TGGGCTCTGA GCAGTGGAGA ACAGTGGTGT
601 GAACGGGCAT CTCCTCCCAG CAGCTCATGC AACATCTCCT CTGGGGAAT
651 GCAGAAGGGC CTGTGGGAGC AGTGCCAGCT TCTGAAGAGC ACCTCGGTGT
701 TTGCCCGCTG CCACCTCTGT GTGGACCCCG AGCCTTTTGT GGCCCTGTGT
751 GAGAAGACTT TGTGTGAGTG TGCTGGGGGG CTGGAGTGGC CCTGCCCTGC
801 CCTCCTGGAG TACGCCCGGA CCTGTGCCCA GGAGGGAATG GTGCTGTACG
851 GCTGGACCGA CCACAGCGCG TGACGCCAG TGTGCCCTGC TGGTATGGAG
901 TATAGGCAGT GTGTGTCCCC TTGCGCCAGG ACCTGCCAGA GCCTGCACAT
951 CAATGAAATG TGTCAAGGAG GATGCGTGGA TGGCTGCAGC TGCCCTGAGG
1001 GACAGCTCCT GGATGAAGGC CTCTGCGTGG AGAGCACCGA GTGTCCCTGC
1051 GTGCATTCCG GAAAGCGCTA CCCTCCCGGC ACCTCCCTCT CTCGAGACTG
1101 CAACACCTGC ATTTGCCGAA ACAGCCAGTG GATCTGCAGC AATGAAGAAT
1151 GTCCAGGGGA GTGCCTTGTG ACTGGTCAAT CCCACTTCAA GAGCTTTGAC
1201 AACAGATACT TCACCTTCAG TGGGATCTGC CAGTACCTGC TGGCCCGGGA
1251 TTGCCAGGAC CACTCCTTCT CCATTGTGAT TGAGACTGTC CAGTGTGCTG
1301 ATGACCGCGA CGCTGTGTGC ACCCGCTCCG TCACCGTCCG GCTGCCCTGGC
1351 CTGCACAACA GCCTTGTGAA ACTGAAGCAT GGGGCAGGAG TTGCCATGGA
1401 TGGCCAGGAC ATCCAGCTCC CCCTCCTGAA AGGTGACCTC CGCATCCAGC
1451 ATACAGTGAC GGCCTCCGTG CGCCTCAGCT ACGGGGAGGA CCTGCAGATG
1501 GACTGGGATG GCCGCGGGAG GCTGCTGGTG AAGCTGTCCC CGGTCTATGC
1551 CGGGAAGACC TGCGGCCTGT GTGGGAATTA CAATGGCAAC CAGGGCGACG
1601 ACTTCCTTAC CCCCTCTGGG CTGGCGGAGC CCCGGGTGGA GGACTTCGGG
1651 AACGCCTGGA AGCTGCACGG GGAAGTCCAG GACCTGCAGA AGCAGCACAG
1701 CGATCCCTGC GCCCTCAACC CGCGCATGAC CAGGTTCTCC GAGGAGGCGT
1751 GCGCGGTCC TACCTCCCC ACATTCGAGG CCTGCCATCG TGCCGTGAGC
1801 CCGCTGCCCT ACCTGCGGAA CTGCCGCTAC GACGTGTGCT CCTGCTCGGA
1851 CGGCCGCGAG TGCCTGTGCG GCGCCCTGGC CAGCTATGCC GCGGCCTGCG

```

1901 CGGGGAGAGG CGTGCGCGTC GCGTGGCGCG AGCCAGGCCG CTGTGAGCTG  
1951 AACTGCCCCG AAGGCCAGGT GTACCTGCAG TCGGGGACCC CCTGCAACCT  
2001 GACCTGCCGC TCTCTCTTT ACCCGGATGA GGAATGCAAT GAGGCCTGCC  
2051 TGGAGGGCTG CTTCTGCCCC CCAGGGCTCT ACATGGATGA GAGGGGGGAC  
2101 TGCGTGCCCA AGGCCAGTG CCCCTGTTAC TATGACGGTG AGATCTTCCA  
2151 GCCAGAAGAC ATCTTCTCAG ACCATCACAC CATGTGCTAC TGTGAGGATG  
2201 GCTTCATGCA CTGTACCATG AGTGGAGTCC CCGGAAGCTT GCTGCCTGAC  
2251 GCTGTCCCTCA GCAGTCCCCT GTCTCATCGC AGCAAAAGGA GCCTATCCTG  
2301 TCGGCCCCC ATGGTCAAGC TGGTGTGTCC CGCTGACAAC CTGCGGGCTG  
2351 AAGGGCTCGA GTGTACCAA ACCTGCCAGA ACTATGACCT GGAGTGCATG  
2401 AGCATGGGCT GTGTCTCTGG CTGCCTCTGC CCCCCGGGCA TGGTCCGGCA  
2451 TGAGAACAGA TGTGTGGCCC TGGAAAGGTG TCCCTGCTTC CATCAGGGCA  
2501 AGGAGTATGC CCCTGGAGAA ACAGTGAAGA TTGGCTGCAA CACTTGTGTG  
2551 TGTCGGGACC GGAAGTGGAA CTGCACAGAC CATGTGTGTG ATGCCACGTG  
2601 CTCCACGATC GGCATGGCCC ACTACCTCAC CTTGACGGG CTCAAATACC  
2651 TGTTCGCCCG GGAGTGCAG TACGTTCTGG TGCAAGATTA CTGCGGCAGT  
2701 AACCTGGGA CCTTTCGGAT CCTAGTGGGG AATAAGGGAT GCAGCCACCC  
2751 CTCAGTAAA TGCAAGAAAC GGGTACCAT CCTGGTGGAG GGAGGAGAGA  
2801 TTGAGCTGTT TGACGGGGAG GTGAATGTGA AGAGGCCCAT GAAGGATGAG  
2851 ACTCACTTTG AGGTGGTGGG GTCTGGCCGG TACATCATTG TGCTGCTGGG  
2901 CAAAGCCCTC TCCGTGGTCT GGGACCGCCA CCTGAGCATC TCCGTGGTCC  
2951 TGAGACGAGC ATACCAGGAG AAAGTGTGTG GCCTGTGTGG GAATTTTGAT  
3001 GGCATCCAGA ACAATGACCT CACCAGCAGC AACCTCCAAG TGGAGGAAGA  
3051 CCCTGTGGAC TTTGGGAACT CCTGGAAGT GAGCTCGCAG TGTGCTGACA  
3101 CCAGAAAAGT GCCTCTGGAC TCATCCCTTG CCACCTGCCA TAACAACATC  
3151 ATGAAGCAGA CGATGGTGGG TTCCTCCTGT AGAATCCTTA CCAGTACAGT  
3201 CTTCCAGGAC TGCAACAAGC TGGTGGACCC CGAGCCATAT CTGGATGTCT  
3251 GCATTTACGA CACCTGTCTC TGTGAGTCCA TTGGGGACTG CGCCGATTC  
3301 TCGGACACCA TTGCTGCCTA TGCCACGCTG TGTGCCACG ATGGCAAGGT  
3351 GGTGACCTGG AGGACGGCCA CATGTGCCCC CAGAGCTGC GAGGAGAGGA  
3401 ATCTCCGGGA GAACGGGTAT GAGGCTGAGT GGGCTATAA CAGCTGTGCA  
3451 CCTGCCTGTC AAGTCACGTG TCAGCACCTT GAGCCACTGG CCTGCCCCGT  
3501 GCAGTGTGTG GAGGGCTGCC ATGCCACTG CCCTCCAGGG AAAATCCTGG  
3551 ATGAGCTTTT GCAGACCTGC GTTGACCCTG AAGACTGTCC AGTGTGTGAG  
3601 TGGGCTGGCC GGCCTTTTGC CTCAGGAAAG AAAGTCACTT TGAATCCCAG  
3651 TGACCCCTGAG CACTGCCAGA TTTGCCACTG TGATGTGTGC AACCTCACTT  
3701 GTGAAGCCTG CCAGGAGCCC ATATCGGGCG CGCCAACATC AGAGAGCGCC  
3751 ACCCCTGAAA GTGGTCCCGG GAGCGAGCCA GCCACATCTG GGTCCGAAAAC  
3801 GCCAGGCACA AGTGAAGTCT CAACTCCCGA GTCGGGACCT GGCTCCGAGC  
3851 CTGCCACTAG CCGCTCCGAG ACTCCGGGAA CTTCCGAGAG CGCTACACCA  
3901 GAAAGCGGAC CCGGAACCAG TACCGAACCT AGCGAGGGCT CTGCTCCGGG  
3951 CAGCCACGCC GGCTCTCCTA CATCCACGGA GGAGGGCACT TCCGAATCCG  
4001 CCACCCCGGA GTCAGGGCCA GGATCTGAAC CGCTACCTC AGGCAGTGAG  
4051 ACGCCAGGAA CGAGCGAGTC CGCTACACCG GAGAGTGGGC CAGGGAGCCC  
4101 TGCTGGATCT CTTACGTCCA CTGAGGAAGG GTCACCAGCG GGCTCGCCCA  
4151 CCAGCACTGA AGAAGGTGCC TCGAGCGGGG GTGGAGGATC CGGTGGCGGG  
4201 GGATCCGGTG GCGGGGATC CGGTGGCGGG GGATCCGGTG GCGGGGATC  
4251 CGGTGGCGGG GGATCCCTGG TCCCCCGGGG CAGCGGAGGC GACAAAACCT  
4301 ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCTCCAGAAC TCCTGGGGGG ACCGTCACTC  
4351 TTCCTCTTCC CCCCCAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCGGACCCCT  
4401 TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA  
4451 AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG  
4501 CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC CTTGTGGTCA GCGTCTCAC  
4551 CGTCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT  
4601 CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA  
4651 GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCGGGATGA  
4701 GCTGACCAAG AACCAAGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC  
4751 CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAA  
4801 TACAAGACCA CGCCTCCCGT GTTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTA  
4851 CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT  
4901 CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC  
4951 CTCTCCCTGT CTCCGGTAA ATGA

**Белковая последовательность рSYN VWF057 (D'D3-Fc VWF с тромбиновым сайтом LVPR в линкере): подчеркнутый жирной линией участок показывает линкерную область, содержащую расщепляемый тромбином LVPR (SEQ ID NO: 80)**

1	MIPARFAGVL	LALALILPGT	LCAEGTRGRS	STARCSLFGS	DFVNTFDGSM
51	YSFAGYCSYL	LAGGCQKRSF	SIIGDFQNGK	RVSLSVYLGE	FFDIHLFVNG
101	TVTQGDQRV	MPYASKGLYL	ETEAGYKLS	GEAYGFVARI	DGSGNFQVLL
151	SDRYFNKTCG	LCGNFNIFAE	DDFMTQEGTL	TSDPYDFANS	WALSSGEQWC
201	ERASFPSSSC	NISSGEMQKG	LWEQCQLLKS	TSVFARCHPL	VDPEFFVALC
251	EKTLCECAGG	LECACPALLE	YARTCAQEGM	VLYGWTDHSA	CSPVCPAGME
301	YRQCVSPCAR	TCQSLHINEM	CQERCVDGCS	CPEGQLLDEG	LCVESTCEPC
351	VHSGKRYPPG	TLSLRDCNTC	ICRNSQWICS	NEECPGECVL	TGQSHFKSFD
401	NRYFTFSGIC	QYLLARDCQD	HSFSIVIETV	QCADDRDAVC	TRSVTVRLPG
451	LHNSLVKLKH	GAGVAMDGQD	IQLPLLKGD	RIQHTVTASV	RLSYGEDLQM
501	DWDGRGRLLV	KLSPVYAGKT	CGLCGNYNGN	QGDDFLTFSG	LAEPFVDFG
551	NAWKHLGDCQ	DLQKQHSDFC	ALNPRMTRFS	EEACAVLTSP	TFEACHRAVS
601	PLPYLRNCRY	DVCSGSDGRE	CLCGALASYA	AACAGRVRV	AWREPGRCEL
651	NCPKGVVYQ	CGTPCNLTCR	SLSYPDEECN	EACLEGCFCP	PGLYMDERGD
701	CVPKAQPCPY	YDGEIFQPED	IFSDHHTMCY	CEDGFMHCTM	SGVPGSLLPD
751	AVLSSPLSHR	SKRSLSCRPP	MVKLVCPADN	LRAEGLECTK	TCQNYDLECM
801	SMGCVSGCLC	PPGMVRHENR	CVALERCPCF	HQKKEYAPGE	TVKIGCNTCV
851	CRDRKWNCTD	HVCDATCSTI	GMAHYLTFDG	LKYLFPGECQ	YVLVQDYCGS
901	NPGTFRILVG	NKGCSPSVK	CKKRVTLIVE	GGEIELFDGE	VNVKRPKDE
951	THFEVVESEGR	YIILLGKAL	SVVWDRHLSI	SVVLKQTYQE	KVCGLCGNFD
1001	GIQNNDLTSS	NLQVEEDPVD	FGNSWKVSSQ	CADTRKVPDL	SSPATCHNNI
1051	MKQTMVDSSC	RILTSDFVQD	CNKLVDPPEY	LDVCIYDTCS	CESIGDCAAF
1101	CDTIAAYAHV	CAQHGVVVTW	RTATLCPQSC	EERNLRENGY	EAEWRYNSCA
1151	PACQVTCQHP	EPLACPVQCV	EGCHAHCPPG	KILDELQTC	VDPEDCPVCE
1201	VAGRRFASGK	KVTLNPSDPE	HCQICHDDVV	NLTCEACQEP	ISGAPTESA
1251	TPESGPGSEP	ATSGSETPGT	SESATPESGP	GSEFATSGSE	TPGTSESATP
1301	ESGPGTSTEP	SEGSAPGSPA	GSPTSTEEGT	SESATPESGP	GSEFATSGSE
1351	TPGTSESATP	ESGPGSPAGS	PTSTEEGSPA	GSPTSTEEGA	<b>SSGGGGGGGG</b>
1401	<b>GGGGGGGGGG</b>	<b>GSGGGGGGGG</b>	<b>GSGGGGSLVP</b>	<b>RSGGGDKTHT</b>	<b>CPPCPAPELL</b>
1451	GGPSVFLFPP	KPKDTLMSIR	TPEVTVVVVD	VSHEDPEVFK	NWYVDGVEVH
1501	NAKTKPREEQ	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT
1551	ISKAKQPRE	PQVYTLPPSR	DELTKNQVSL	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG
1601	QPENNYKTTP	PVLSDSGSFF	LYSKLTVDKS	RWQQGNVFC	SVMHEALHNN
1651	YTQKSLSLSP	GK*			

**Нуклеотидная последовательность рSYN VWF059 (D'D3-Fc VWF с кислотной областью 2 (a2) тромбиновый сайт в линкере) (SEQ ID NO: 81)**

1	ATGATTCCTG	CCAGATTTGC	CGGGGTGCTG	CTTGCTCTGG	CCCTCATTTT
51	GCCAGGGACC	CTTTGTGCAG	AAGGAACTCG	CGGCAGGTCA	TCCACGGCCC
101	GATGCAGCCT	TTTCGGAAGT	GACTTCGTCA	ACACCTTTGA	TGGGAGCATG
151	TACAGCTTTG	CGGGATACTG	CAGTTACCTC	CTGGCAGGGG	GCTGCCAGAA
201	ACGCTCCTTC	TCGATTATTG	GGGACTTCCA	GAATGGCAAG	AGAGTGAGCC
251	TCTCCGTGTA	TCTTGGGGAA	TTTTTTGACA	TCCATTTGTT	TGTCAATGGT
301	ACCGTGACAC	AGGGGGACCA	AAGAGTCTCC	ATGCCCTATG	CCTCCAAAGG
351	GCTGTATCTA	GAAACTGAGG	CTGGGTACTA	CAAGCTGTCC	GGTGAGGCCT
401	ATGGCTTTGT	GGCCAGGATC	GATGGCAGCG	GCAACTTTCA	AGTCTCTGCTG
451	TCAGACAGAT	ACTTCAACAA	GACCTGCGGG	CTGTGTGGCA	ACTTTAACAT
501	CTTTGCTGAA	GATGACTTTA	TGACCCAAGA	AGGGACCTTG	ACCTCGGACC
551	CTTATGACTT	TGCCAACTCA	TGGGCTCTGA	GCAGTGGAGA	ACAGTGGTGT
601	GAACGGGCAT	CTCCTCCCAG	CAGCTCATGC	AACATCTCCT	CTGGGGAAAT
651	GCAGAAGGGC	CTGTGGGAGC	AGTGCCAGCT	TCTGAAGAGC	ACCTCGGTGT
701	TTGCCCGCTG	CCACCCTCTG	GTGGACCCCG	AGCCTTTTGT	GGCCCTGTGT
751	GAGAAGACTT	TGTGTGAGTG	TGCTGGGGGG	CTGGAGTGCG	CCTGCCCTGC
801	CCTCCTGGAG	TACGCCCGGA	CCTGTGCCCA	GGAGGGAATG	GTGCTGTACG
851	GCTGGACCGA	CCACAGCGCG	TGCAGCCAG	TGTGCCCTGC	TGGTATGGAG
901	TATAGGCAGT	GTGTGTCCCC	TTGCGCCAGG	ACCTGCCAGA	GCCTGCACAT
951	CAATGAAATG	TGTCAGGAGC	GATGCGTGGA	TGGCTGCAGC	TGCCCTGAGG
1001	GACAGCTCCT	GGATGAAGGC	CTCTGCGTGG	AGAGCACCGA	GTGTCCCTGC
1051	GTGCATTCGG	GAAAGCGCTA	CCCTCCCGGC	ACCTCCCTCT	CTCGAGACTG

1101 CAACACCTGC ATTTGCCGAA ACAGCCAGTG GATCTGCAGC AATGAAGAAT  
1151 GTCCAGGGGA GTGCCTTGTC ACTGGTCAAT CCCACTTCAA GAGCTTTGAC  
1201 AACAGATACT TCACCTTCAG TGGGATCTGC CAGTACCTGC TGGCCCGGGA  
1251 TTGCCAGGAC CACTCCTTCT CCATTGTCAT TGAGACTGTC CAGTGTGCTG  
1301 ATGACCCGGA CGCTGTGTGC ACCCGCTCCG TCACCGTCCG GCTGCCTGGC  
1351 CTGCACAACA GCCTTGTGAA ACTGAAGCAT GGGCCAGGAG TTGCCATTGGA  
1401 TGGCCAGGAC ATCCAGCTCC CCCTCCTGAA AGGTGACCTC CGCATCCAGC  
1451 ATACAGTGAC GGCCTCCGTG CGCCTCAGCT ACGGGGAGGA CCTGCAGATG  
1501 GACTGGGATG GCCGCGGGAG GCTGCTGGTG AAGCTGTCCC CCGTCTATGC  
1551 CGGGAAGACC TCGGCCTGTG GTGGGAATTA CAATGGCAAC CAGGGCCAGC  
1601 ACTTCCTTAC CCCCTCTGGG CTGGCGGAGC CCCGGGTGGA GGAATTGGGG  
1651 AACGCCTGGA AGCTGCACGG GGAAGTCCAG GACCTGCAGA AGCAGCACAG  
1701 CGATCCCTGC GCCCTCAACC CGCGCATGAC CAGGTTCTCC GAGGAGGCGT  
1751 GCGCGGTCTT GACGTCCCCC ACATTGAGG CCTGCCATCG TGCCGTCAAG  
1801 CCGTGCCTT ACCTGCGGAA CTGCGGCTAC GACGTGTGCT CCTGCTCGGA  
1851 CGGCGCGGAG TGCCTGTGCG GCGCCCTGGC CAGCTATGCC GCGCCCTGCG  
1901 CGGGGAGAGG CGTGCAGCTG GCGTGGCGCG AGCCAGGCCG CTGTGAGCTG  
1951 AACTGCCCGA AAGGCCAGGT GTACCTGCAG TCGGGGACCC CCTGCAACCT  
2001 GACTGCGCG TCTCTCTCTT ACCCGGATGA GGAATGCAAT GAGGCTGACC  
2051 TGGAGGGCTG CTTCTGCCCC CCAGGGCTCT ACATGGATGA GAGGGGAGAC  
2101 TGCGTGCCCA AGGCCCAGTG CCCCTGTTAC TATGACGGTG AGATCTTCCA  
2151 GCCAGAAGAC ATCTTCTCAG ACCATCACAC CATGTGCTAC TGTGAGGATG  
2201 GCTTCATGCA CTGTACCATG AGTGGAGTCC CCGGAAGCTT GCTGCCTGAC  
2251 GCTGTCCCTA GCAGTCCCTT GTCTCATCGC AGCAAAGGA GCCTATCCTG  
2301 TCGGCCCTCC ATGGTCAAGC TGGTGTGTCC CGCTGACAAC CTGCGGGCTG  
2351 AAGGGCTCGA GTGTACCAA ACCTGCCAGA ACTATGACCT GGAGTGATG  
2401 AGCATGGGCT GTGTCTCTGG CTGCCTCTGC CCCCCGGCA TGGTCCGGCA  
2451 TGAGAACAGA TGTGTGGCCC TGAAGAGTG TCCCTGCTTC CATCAGGGCA  
2501 AGGAGTATGC CCCTGGAGAA ACAGTGAAGA TTGGCTGCAA CACTTGTGTC  
2551 TGTGCGGACC GGAAGTGGAA CTGCACAGAC CATGTGTGTG ATGCCACGTG  
2601 CTCCACGATC GGCATGGCCC ACTACCTCAC CTFGACGGG CTCAAATACC  
2651 TGTTCCTCCG GGAGTGCCAG TACGTTCTGG TGCAGGATTA CTGCGGCAGT  
2701 AACCTGGGA CCTTTCGGAT CCTAGTGGGG AATAAGGGAT GCAGCCACCC  
2751 CTCAGTGAAA TGCAAGAAAC GGGTCACCAT CTGTTGGAG GGAGGAGAGA  
2801 TTGAGCTGTT TGACGGGGAG GTGAATGTGA AGAGGCCCAT GAAGGATGAG  
2851 ACTCACTTTC AGGTGGTGA GTCTGGCCGG TACATCATTG TGCTGTGGG  
2901 CAAAGCCCTC TCCGTGGTCT GGGACCGCCA CTTGAGCATC TCCGTGGTCC  
2951 TGAAGCAGAC ATACCAGGAG AAAGTGTGTG GCCTGTGTGG GAATTTTGTAT  
3001 GGCATCCAGA ACAATGACCT CACCAGCAGC AACCTCCAAG TGGAGGAGA  
3051 CCCTGTGGAC TTTGGGAACT CCTGGAAAGT GAGCTCGCAG TGTGCTGACA  
3101 CCAGAAAAGT GCCTCTGGAC TCATCCCTTG CCACCTGCCA TAACAACATC  
3151 ATGAAGCAGA CGATGGTGA TTCCTCCTGT AGAATCCTTA CCAGTACCTG  
3201 CTTCCAGGAC TGCAACAAGC TGGTGGACCC CGAGCCATAT CTGGATGCTC  
3251 GCATTTACGA CACCTGCTCC TGTGAGTCCA TTGGGGACTG CGCCGCATTC  
3301 TGCGACACCA TTGCTGCCTA TGCCCACGTG TGTGCCACG ATGGCAAGGT  
3351 GGTGACCTGG AGGACGGCCA CATTGTGCC CCAGAGCTGC GAGGAGAGGA  
3401 ATCTCCGGGA GAACGGGTAT GAGGCTGAGT GCGCTATAA CAGCTGTGCA  
3451 CCTGCCTGTC AAGTACAGTG TCAGCACCTT GAGCCACTGG CCTGCCCTGT  
3501 GCAGTGTGTG GAGGGCTGCC ATGCCCACTG CCTCCAGGG AAAATCCTGG  
3551 ATGAGCTTTT GCAGACCTGC GTTGACCCTG AAGACTGTCC AGTGTGTGAG  
3601 GTGGCTGGCC GGCCTTTTGC CTCAGGAAAG AAAGTACCT TGAATCCAG  
3651 TGACCCTGAG CACTGCCAGA TTTGCCACTG TGATGTGTG AACCTCACCT  
3701 GTGAAGCCTG CCAGGAGCCG ATATCGGGCG CGCCAACATC AGAGAGCGCC  
3751 ACCCTGAAA GTGGTCCCGG GAGCGAGCCA GCCACATCTG GGTCCGAAAC  
3801 GCCAGGCACA AGTGTGCTG CAACTCCCGA GTCCGGACCT GGCTCCGAGC  
3851 CTGCCACTAG CGGCTCCGAG ACTCCGGGAA CTTCCGAGAG CGTACACCA  
3901 GAAAGCGGAC CCGGAACCAG TACCCAACCT AGCGAGGGCT CTGCTCCGGG  
3951 CAGCCCAGCC GGCTCTCCTA CATCCACGGA GGAGGGCACT TCCGAATCCG  
4001 CCACCCCGGA GTCAGGGCCA GGATCTGAAC CCGCTACCTC AGGCAGTGAG  
4051 ACGCCAGGAA CGAGCGAGTC CGCTACACCG GAGAGTGGG CAGGGAGCCC  
4101 TGCTGGATCT CCTACGTCCA CTGAGGAAGG GTCACCAGCG GGCTCGCCCA  
4151 CCAGCACTGA AGAAGGTGCC TCGATATCTG ACAAGAACAC TGGTGATTAT  
4201 TACGAGGACA GTTATGAAGA TATTTAGCA TACTTGTGTA GTAAAAACAA  
4251 TGCCATTGAA CCAAGAAGCT TCTCTGACAA AACTCACACA TGCCACCGT

```

4301  GCCCAGCTCC  AGAACTCCTG  GGCGGACCGT  CAGTCTTCCT  CTTCCTCCCA
4351  AAACCCAAAG  ACACCCTCAT  GATCTCCCGG  ACCCCTGAGG  TCACATGCGT
4401  GGTGGTGGAC  GTGAGCCACG  AAGACCTGA  GGTCAAGTTC  AACTGGTACG
4451  TGGACGGCGT  GGAGGTGCAT  AATGCCAAGA  CAAAGCCGCG  GGAGGAGCAG
4501  TACAACAGCA  CGTACCCTGT  GGTACGCGTC  CTCACCGTCC  TGCACCAGGA
4551  CTGGCTGAAT  GGCAAGGAGT  ACAAGTGCAA  GGTCTCCAAC  AAAGCCCTCC
4601  CAGCCCCCAT  CGAGAAAACC  ATCTCCAAAG  CCAAAGGGCA  GCCCCGAGAA
4651  CCACAGGTGT  ACACCCTGCC  CCCATCCCGG  GATGAGCTGA  CCAAGAACCA
4701  GGTACGCCTG  ACCTGCCTGG  TCAAAGGCTT  STATCCCAGC  GACATCGCCG
4751  TGGAGTGGGA  GAGCAATGGG  CAGCCGGAGA  ACAACTACAA  GACCACGCCT
4801  CCCGTGTTGG  ACTCCGACGG  CTCTTCTTC  CTCTACAGCA  AGCTCACCGT
4851  GGACAAGAGC  AGGTGGCAGC  AGGGGAACGT  CTCTCATGTC  TCCGTGATGC
4901  ATGAGGCTCT  GCACAACCAC  TACACGCAGA  AGAGCCTCTC  CCTGTCTCCG
4951  GGTAAATGA

```

**Белковая последовательность pSYN VWF059 (D'D3-Fc VWF с тромбиновым сайтом LVPR в линкере) - подчеркнутый жирной линией участок показывает область a2 (SEQ ID NO: 82)**

```

1  MIPARFAGVL  LALALILPGT  LCAEGRGRS  STARCSLFGS  DFVNTFDGSM
51  YSFAGYCSYL  LAGGCQKRSF  SIIGDFQNGK  RVLSLVYLGE  FFDIHLFVNG
101  TVTQGDQQRV  MPYASKGLYL  ETEAGYKLS  GEAYGFVARI  DSGSNFQVLL
151  SDRYFNKTCG  LCGNFNIFAE  DDFMTQEGTL  TSDPYDFANS  WALSSGEQWC
201  ERASPPSSSC  NISSGEMQKG  LWEQCQLLKS  TSVFARCHPL  VDPEFFVALC
251  EKTLCCECAG  LECACPALLE  YARTCAQEGM  VLYGWTDHSA  CSPVCPAGME
301  YRQCVSPCAR  TCQSLHINEM  CQERCVDGCS  CPEGQLLDEG  LCVESTTECF
351  VHS GKRYPPG  TSLSRDCNTC  ICRNSQWICS  NEECPGECVL  TGQSHFKSFD
401  NRYFTFSGIC  QYLLARDCQD  HSF SIV IETV  QCADDRDAVC  TRSVTVRLPG
451  LHNSLVKCLK  GAGVAMDGQD  IQLPLLKGD  RIQHTVTASV  RLSYGEDLQM
501  DWDGRRLLV  KLSPVYAGKT  CGLCGNYNGN  QGDDFLTPSG  LAEPRVEDFG
551  NAWKHLGDQC  DLQKQHS DPC  ALNPRMTRFS  EEACAVLTSP  TFEACHRAVS
601  PLPYLRNCRY  DVCSCSDGRE  CLCGALASYA  AACAGRGRV  AWREPRGCEL
651  NCPKQVYVY  CGTPCNLTCT  SLSYPDEECN  EACLEGGCF  PGLYMDERGD
701  CVPKACQPCY  YDGEIFQPED  IFS DHH TMCY  CEDGFMHCTM  SGVPGSLLPD
751  AVLSSPLSHR  SKRSLSCRPP  MVKLVCPADN  LRAGLECTK  TCQNYDLECM
801  SMGCVSGCLC  PPGMVRHENR  CVALERCPCF  HQGKEYAPGE  TVKIGCNTCV
851  CRDRKWNCTD  HVC DAT CSTI  GMAHYLTFDG  LKYLFPGEQC  YVLVQDYCGS
901  NPGTFRILVG  NKGCSHPSVK  CKRVRTLLVE  GGEI ELD FGE  VNVKRPMDKE
951  THFEVVEGR  YIILLGKAL  SVVDRHLSI  SVVLKQTYQE  KVCGLCGNFD
1001  GIQNDLTS  NLQVEEDPVD  FGN SWK VSSQ  CADTRKVP  LDD  SSPATCHNNI
1051  MKQTMVDSS  RILTS DVFQD  CNKLVDP EPY  LDVCIYD TCS  CESIGDCAAF
1101  CDTIAAYAHV  CAQH GKVV TW  RTATLCPQSC  EERNLRENGY  EAEWRYNSCA
1151  PACQVFCQHP  EPLACPVCV  EGCHAHCP  PG  KILDELLQTC  VDPEDCPVCE
1201  VAGRRFASGK  KVTLNPSDPE  HCQICHCDV  V  NLTC EACQEP  ISGAPTSESA
1251  TPESGPGSEP  ATSGSETPGT  SESATPESGP  GSEPATSGSE  TPGTSESATP
1301  ESGPGTSTEP  SEGSA PGSPA  GSPTSTEEGT  SESATPESGP  GSEPATSGSE
1351  TPGTSESATP  ESGPGSPAGS  PTSTEEGSPA  GSPTSTEEGA  SIS DKNTG DY
1401  YEDSYEDISA YLLSKNNAIE PRSFSDKTHT  CPPCPAPELL  GGP SVFL FFP
1451  KPKDTLMISR  TPEVTCVVVD  VSHEDPEVKF  N WYVDGVEVH  NAKTKPREEQ
1501  YNSTYRVVSV  LTVLHQDWLN  GKEYKCKVSN  KALPAPIEKT  ISKAGQPRE
1551  PQVYTLPPSR  DELTKNQVSL  TCLVKGFYPS  DIAVEWESNG  QPENNYKTTP
1601  PVLSDSGSFF  LYSKLTVDKS  RWQQGNV FSC  SVMHEALHNH  YTQKSLSLSP
1651  GK*

```

**Нуклеотидная последовательность pSYN VWF062 (D'D3-Fc VWF без тромбинового сайта в линкере) (SEQ ID NO: 83)**

```

1  ATGATTCTTG  CCAGATTTGC  CGGGGTGCTG  STTGCTCTGG  CCCTCATTTT
51  GCCAGGGACC  CTTTGTGCAG  AAGGAACTCG  CGGCAGGTCA  TCCACGGCCC
101  GATGCAGCCT  TTTCGGAAGT  GACTTCGTCA  ACACCTTTGA  TGGGAGCATG
151  TACAGCTTTG  CGGGATACTG  CAGTTACCTC  CTGGCAGGGG  GCTGCCAGAA
201  ACGCTCCTTC  TCGATTATTG  GGGACTTCCA  GAATGGCAAG  AGAGTGAGCC
251  TCTCCGTGTA  TCTTGGGGAA  TTTTTTGACA  TCCATTTGTT  TGTC AATGGT
301  ACCGTGACAC  AGGGGGACCA  AAGAGTCTCC  ATGCCCTATG  CCTCCAAAGG

```

351 GCTGTATCTA GAAACTGAGG CTGGGTACTA CAAGCTGTCC GGTGAGGCCT  
401 ATGGCTTTGT GGCCAGGATC GATGGCAGCG GCAACTTTCA AGTCCTGCTG  
451 TCAGACAGAT ACTTCAACAA GACCTGCGGG CTGTGTGGCA ACTTTAACAT  
501 CTTTGCTGAA GATGACTTTA TGACCCAAGA AGGGACCTTG ACCTCGGACC  
551 CTTATGACTT TGCCAACTCA TGGGCTCTGA GCAGTGGAGA ACAGTGGTGT  
601 GAACGGGCAT CTCCTCCCAG CAGCTCATGC AACATCTCCT CTGGGGAAAT  
651 GCAGAAGGGC CTGTGGGAGC AGTGCCAGCT TCTGAAGAGC ACCTCGGTGT  
701 TTGCCCGCTG CCACCCCTCTG GTGGACCCCG AGCCTTTTGT GGCCCTGTGT  
751 GAGAAGACTT TGTGTGAGTG TGCTGGGGGG CTGGAGTGCG CCTGCCCTGC  
801 CCTCCTGGAG TACGCCCGGA CCTGTGCCCA GGAGGGAATG GTGCTGTACG  
851 CCTCGACCGA CCACAGCCCG TGCAGCCCG TCTGCCCTFC TGCTATCCAG  
901 TATAGGCAGT GTGTGTCCCC TTGCGCCAGG ACCTGCCAGA GCCTGCACAT  
951 CAATGAAATG TGTCCAGGAG GATGCCGTGA TGGCTGCAGC TGCCCTGAGG  
1001 GACAGCTCCT GGATGAAGGC CTCTGCGTGG AGAGCACCGA GTGTCCCTGC  
1051 GTGCATTCCG GAAAGCGCTA CCCTCCCGGC ACCTCCCTCT CTCGAGACTG  
1101 CAACACCTGC ATTTGCCGAA ACAGCCAGTG GATCTGCAGC AATGAAGAAT  
1151 GTCCAGGGGA GTGCCCTGTCT ACTGGTCAAT CCCACTTCAA GAGCTTTGAC  
1201 AACAGATACT TCACCTTCAG TGGGATCTGC CAGTACCTGC TGGCCCGGGA  
1251 TTGCCAGGAC CACTCCTTCT CCATTGTCAT TGAGACTGTC CAGTGTGCTG  
1301 ATGACCGCGA CGCTGTGTGC ACCCGCTCCG TCACCGTCCG GCTGCTGGC  
1351 CTGCACAACA GCCTTGTGAA ACTGAAGCAT GGGGCAGGAG TTGCCATGGA  
1401 TTGCCAGGAC ATCCAGCTCC CCTTCCCTGAA AGGTGACCTC CGCACTCCAGC  
1451 ATACAGTGAC GGCCTCCGTG CGCCTCAGCT ACGGGGAGGA CCTGCAGATG  
1501 GACTGGGATG GCCCGGGGAG GCTGCTGGTG AAGCTGTCCC CCGTCTATGC  
1551 CGGGAAGACC TGCGGCCTGT GTGGGAATTA CAATGGCAAC CAGGGCGACG  
1601 ACTTCCTTAC CCCCTCTGGG CTGGCGGAGC CCCGGGTGGA GGACTTCGGG  
1651 AACGCCTGGA AGCTGCACGG GGAATGCCAG GACTGCAGA AGCAGCACAG  
1701 CGATCCCTGC GCCCTCAACC CGCGCATGAC CAGTTCCTCC GAGGAGCGGT  
1751 CGCGGTCTCT GACGTCCCCC ACATTCGAGG CCTGCCATCG TGCCGTCCAGC  
1801 CCGTGCCTCT ACCTGCGGAA CTGCCGCTAC GACGTGTGCT CCGTCTCGGA  
1851 CGGCCGCGAG TGCCTGTGCG GCGCCCTGGC CAGCTATGCC GCGGCCTGCC  
1901 CGGGGAGAGG CGTGCAGGCT GCGTGGCGCG AGCCAGGCGG CTGTGAGCTG  
1951 AACTGCCCGA AAGCCAGGT GTACCTGCAG TGCCGGACCC CCTGCAACCT  
2001 GACCTGCCGC TCTCTCTCTT ACCCGGATGA GGAATGCAAT GAGGCCTGCC  
2051 TGGAGGGGTG CTTCTGCCCC CCAGGGCTCT ACATGGATGA GAGGGGGGAC  
2101 TGCGTGCCCA AGGCCAGTG CCCCTGTTAC TATGACGGTG AGATCTTCCA  
2151 GCCAGAAGAC ATCTTCTCAG ACCATCACAC CATGTGCTAC TGTGAGGATG  
2201 GCTTCATGCA CTGTACCATG AGTGGAGTCC CCGGAAGCTT GCTGCCTGAC  
2251 GCTGTCTCTA GCAGTCCCCC GTCTCATCGC AGCAAAAGGA GCCTATCCTG  
2301 TCGGCCCTCC ATGGTCAAGC TGGTGTGTCC CGTGCACAAC CTGCGGGCTG  
2351 AAGGGCTCGA GTGTACCAA ACCTGCCAGA ACTATGACCT GGAGTGCATG  
2401 AGCATGGGCT GTGTCTCTGG CTGCCTCTGC CCCCAGGCA TGGTCCGGCA  
2451 TGAGAACAGA TGTGTGGCCC TGGAAAGGTG TCCCTGCTTC CATCAGGGCA  
2501 AGGAGTATGC CCTTGGAGAA ACAGTGAAGA TTGGCTGCAA CACTTGTGTC  
2551 TGTCCGGACC GGAAGTGGAA CTGCACAGAC CATGTGTGTG ATGCCACGTG  
2601 CTCCACGATC GGCATGGCCC ACTACCTCAC CTTGACGGG CTCAAATACC  
2651 TGTTCCTCCG GGAGTGCCAG TACGTTCTGG TGCAGGATTA CTGCGGCAGT  
2701 AACCTGGGA CCTTTCGGAT CCTAGTGGGG AATAAGGGAT GCAGCCACC  
2751 CTCAGTAAA TGCAAGAAAC GGGTACCCT CCTGGTGGAG GGAGGAGAGA  
2801 TTGAGCTGTT TGACGGGAG GTGAATGTGA AGAGGCCAT GAAGGATGAG  
2851 ACTCACTTTG AGGTGGTGGG GTCTGGCCGG TACATCATTC TGCTGCTGGG  
2901 CAAAGCCCTC TCCGTGGTCT GGGACCGCCA CCTGAGCATC TCCGTGGTCC  
2951 TGAAGCAGAC ATACCAGGAG AAAGTGTGTG GCCTGTGTGG GAATTTTGTG  
3001 GGCATCCAGA ACAATGACCT CACCAGCAGC AACCTCCAAG TGGAGGAAGA  
3051 CCCTGTGGAC TTTGGGAACT CCTGAAAGT GAGCTCGCAG TGTGCTGACA  
3101 CCAGAAAAGT GCCTCTGGAC TCATCCCTTG CCACCTGCCA TAACAACATC  
3151 ATGAAGCAGA CGATGGTGGG TTCTCCTGT AGAATCCTTA CCAGTGACGT  
3201 CTTCCAGGAC TGCAACAAGC TGGTGGACCC CGAGCCATAT CTGGATGTCT  
3251 GCATTTACGA CACCTGCTCC TGTGAGTCCA TTGGGGACTG CGCCGATTC  
3301 TGCACACCA TTGCTGCCTA TGCCACGTG TGTGCCAGC ATGGCAAGGT  
3351 GGTGACCTGG AGGACGGCCA CATTGTGCC CCAGAGCTGC GAGGAGAGGA  
3401 ATCTCCGGGA GAACGGGTAT GAGGCTGAGT GGCCTATAA CAGCTGTGCA  
3451 CCTGCCTGTC AAGTCACTG TCAGCACCTT GAGCCACTGG CCTGCCTGT  
3501 GCAGTGTGTG GAGGGCTGCC ATGCCACTG CCTCCAGGG AAAATCCTGG

```

3551 ATGAGCTTTT GCAGACCTGC GTTGACCCTG AAGACTGTCC AGTGTGTGAG
3601 GTGGCTGGCC GGCCTTTTGC CTCAGGAAAG AAAGTCACCT TGAATCCCAG
3651 TGACCTGAG CACTGCCAGA TTTGCCACTG TGATGTTGTC AACCTCACCT
3701 GTGAAGCCTG CCAGGAGCCG ATATCGGGCG CGCCAACATC AGAGAGCGCC
3751 ACCCCTGAAA GTGGTCCCGG GAGCGAGCCA GCCACATCTG GGTCGGAAAC
3801 GCCAGGCACA AGTGAGTCTG CAACTCCCAG GTCCGGACCT GGCTCCGAGC
3851 CTGCCACTAG CGGCTCCGAG ACTCCGGGAA CTTCCGAGAG CGCTACACCA
3901 GAAAGCGGAC CCGGAACCAG TACCGAACCT AGCGAGGGCT CTGCTCCGGG
3951 CAGCCAGGCC GGCTCTCCTA CATCCACGGA GGAGGGCACT TCCGAATCCG
4001 CCACCCCGGA GTCAGGGCCA GGATCTGAAC CCGCTACCTC AGGCAGTGAG
4051 ACGCCAGGAA CGAGCGAGTC CGCTACACCG GAGAGTGGGC CAGGGAGGCC
4101 TGCTGGATCT CCTACGTCCA CTGAGGAAGG GTCACCAGCG GGCTCGCCCA
4151 CCAGCACTGA AGAAGGTGCC TCGAGCGACA AAATCACAC ATGCCACCCG
4201 TGCCCACTC CAGAACTCCT GGGCGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCCC
4251 AAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACATGCG
4301 TGGTGGTGGG CGTGAGCCAC GAAGACCCTG AGGTCAAGTT CAACTGGTAC
4351 GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAAGCCG GGGAGGAGCA
4401 GTACAACAGC ACGTACCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTC CTGCACAGG
4451 ACTGGCTGAA TGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGCCCTC
4501 CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA
4551 ACCACAGGTG TACACCCTGC CCCATCCCG GGATGAGCTG ACCAAGAACC
4601 AGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTATCCAG CGACATCGCC
4651 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACGCC
4701 TCCCGTGTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC AAGCTCACCG
4751 TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG
4801 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC
4851 GGGTAAATGA

```

**Белковая последовательность pSYN VWF062 (D' D3-Fc VWF без тромбинового сайта в линкере) (SEQ ID NO: 84)**

```

1 MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFVNTFDGSM
51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
101 TVTQGDQRV MPYASKGLYL ETEAGYKLS GEAYGFVARI DSGNFQVLL
151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
251 EKTLCCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDTHSA CSPVCPAGME
301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTTEPC
351 VHSGKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD
401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSTVIETV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
451 LHNLSLVKLLH GAGVAMDQD IQLPLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQM
501 DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTSPG LAEPRVEDFG
551 NAWKLGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPRGREL
651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGMHCTM SGVPGSLLPD
751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTC TCQNYDLECM
801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGEQ YVLVQDYCGS
901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTLIVE GGEIELFDGE VNVKRPKDE
951 THFEVVEGR YIIILLGKAL SVVWRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI
1051 MKQTMVDSSC RILTSDFQD CNKLVDPPEY LDVCIYDTCES ESIGDCAAF
1101 CDTIAAYAHV CAQHGVVTV RTATLCPQSC EERNLRENGY EAEWRYNCSA
1151 PACQVTCQHP EPLACPVCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGAPTSESA
1251 TPESGPGSEP ATSGSETPGT SESATPESGP GSEPATSGSE TPGTSESATP
1301 ESGPGTSTEP SEGSPAGSPA GSPTSTEEGT SESATPESGP GSEPATSGSE
1351 TPGTSESATP ESGPGSPAGS PTSTEEGSPA GSPTSTEEGA SSDKHTCPP
1401 CPAPELLGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY
1451 VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL
1501 PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA
1551 VEWESNGQPE NNYKTPPVVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVW

```

**Нуклеотидная последовательность рSYN FVIII 286 (FVIII-Fc с дополнительной областью a2 между FVIII и Fc) (SEQ ID NO: 85)**

```

1 ATGCAAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TGCGATTCTG
51  CTTTAGTGCC ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA CTGTCATGGG
101  АСТАТАТGCA AAGTGATCTC GGTGAGCTGC CTGTGGACGC АGАТТТCCT
151  ССТАGAGTGС СAAААТСТТТ ТССАТТCAAC АССТCAGTCG ТGTACAAAA
201  GACTCTGTTT GTAGAATTCА CGGATCACCT TTTCАACATC GCTAAGCCAA
251  GGCCACCCTG GATGGGCTG CTAGGTССТА ССАТССAGGC ТGAGGTTTAT
301  GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTCCCATC CTGTСAGTCT
351  TCATGCTGTT GGTGTATCCT ACTGGAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG
401  ATGATCAGAC CAGTCAAAGG GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTCCCTGGT
451  GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCTG AAAGAGAATG GTCCААТGGC
501  CTCTGACCCA CTGTGCCTTA CCTACTCATA TCTTTCTCAT GTGGACCTGG
551  TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCTACTAGT ATGTAGAGAA
601  GGGAGTCTGG CCAAGGAAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATACTACT
651  TTTTGCTGTA TTTGATGAAG GGAААAGTTG GCACTCAGAA АСAAAGAACT
701  CCTTGATGCA GGATAGGGAT GCTGCATCTG CTCGGGCTG GCCTAAAATG
751  САСАСLGTCA ATGGTTATGT ЛЛАСLGGTCT CTGCCAGGTC ТGATTTGGAT
801  CCACAGGAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGGAAATGGG ACCACTCTCG
851  AAGTGCATC ААТАТТCCTC GAAGGTСАСА САТТТСТTGT GAGGAACCAT
901  CGCCAGGCTA GCTTGAAAT CTGCСCAATA АСТТТСТТТА CTGCTCAAACT
951  АСТСТTGATG GACCTTGAC AGTTTCTACT GTTTTGTCAT ATCTCTTCCC
1001 ACCAACATGA TGGCATGGAA GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG
1051 GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA GAAGCGGAAG АСТАТGATGA
1101 TGATCTTACT GATCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT GATGACAACT
1151 CTCCTTCCTT TATCAAATТ CGCTCAGTTG ССАGAAAGCA TCCTAAAАCT
1201 TGGGTACATT АСАТТGCTGС TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT
1251 AGTCTCГCCС СССGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG
1301 GCCCTCAGCG GATTGGTAGG AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATAС
1351 ACAGATGAAA CCTTAAAGAC TCGTGAAGCT ATTCAGCATG ААТCAGGAAT
1401 CTTGGGACCT TTACTTTATG GGGAAAGTTG AGACACACTG TТGATTATAT
1451 TTAAGAAТCA AGCAAGCAGA ССАТАТААСА ТСТACCCTCA CGGAATCACT
1501 GATGTCCGTC CTTTGTATTC AAGGAGATTA ССAAAAGGTG TAAAACATTT
1551 GAAGGATTTT ССААТТСТGС CAGGAGAAAT ATTCАААТAT АААТGGACAG
1601 TGACTGTAGA AGATGGGCCA АСТAAATCAG ATCCTCGGTG ССТGACCCGC
1651 TATTACTCTA GTTTCGTТАА TATGGAGAGA GATCTAGCTT CAGGACTCAT
1701 TGGCCCTCTC CTCATCTGCT АСAAAGAAТC TGTAGATCAA AGAGGAAACC
1751 AGATAATGTC AGACAAGAGG AATGTCATCC TGTTTTCTGT АТТTGATGAG
1801 AACCGAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA СAACGCTTTC TCCCCAATCC
1851 AGCTGGAGTG CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT ССAAGCCTCC AACATCATGC
1901 ACAGCATCAA TGGCTATGTT TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTTGTТTГ
1951 CATGAGGTGG CATACTGGTA САТТСТAAAGC АТТGGAGCAC AGACTGACTT
2001 CCTTCTGTGTC TTCTTCTCTG GATATACTTT СAAACACAAA ATGGTCTATG
2051 AAGACACACT CACCCTATTС ССАТТСТCAG GAGAAACTGT СТТСАТGTСG
2101 ATGGAAAACC CAGGTCTATG GATТСТGGGG TGCCACAАCT CAGACTTTСG
2151 GAACAGAGGC ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAAСA
2201 CTGGTGATTA TTACGAGGAC AGTTATGAAG ATATTTСAGC АТACTTGCTG
2251 AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAAGC TTCTCTCAAА АСGGCGCGCC
2301 AGGTACCTCA GAGTCTGCTA СССССGAGTC AGGGCCAGGA TCAGAGCCAG
2351 CCACCTCCGG GTCTGAGACA СССGGGACTT ССGAGAGTGC CACCCCTGAG
2401 TCCGGACCCG GGTCCGAGCC CGCCACTTCC GGCTCCGAAA CTCCCGGCAC
2451 AAGCGAGAGC GCTACCCAG AGTCAGGACC AGGAACATCT ACAGAGCCCT
2501 CTGAAGGCTC CGCTCCAGGG TCCCAGCCG GCAGTCCCAС TAGCACCGAG
2551 GAGGGAACCT CTGAAAGCGC CACACCCGAA TCAGGGCCAG GGTCTGAGCC
2601 TGCTACCAGC GGCAGCGAGA СACCAGGCAC CTCTAGTCC GCCACCCAG
2651 AGTCCGGACC CGGATCTCCC GCTGGGAGCC CCACCTCCAC TGAGGAGGGA
2701 TCTCTGCTG GCTCTCAAC ATCTACTGAG GAAGGTACTT СAACCGAGCC
2751 ATCCGAGGGA TCAGCTCCCG GCACCTCAGA GTCCGCAACC СGGAGTCTG
2801 GACCCGGAAC TTCCGAAAGT GCCACACCAG AGTCCGGTCC CGGACTTCA
2851 GAATCAGCAA CACCCGAGTC CGGCCCTGGG TCTGAACCCG ССАCAAGTGG

```



2901 TAGTGAGACA CCAGGATCAG AACCTGCTAC CTCAGGGTCA GAGACACCCG  
 2951 GATCTCCGGC AGGCTCACC ACCTCCACTG AGGAGGGCAC CAGCACAGAA  
 3001 CCAAGCGAGG GCTCCGCACC CGGAACAAGC ACTGAACCCA GTGAGGGTTC  
 3051 AGCACCCGGC TCTGAGCCGG CCACAAGTGG CAGTGAGACA CCCGGCACTT  
 3101 CAGAGAGTGC CACCCCCGAG AGTGGCCAG GCAC TAGTAC CGAGCCCTCT  
 3151 GAAGGCAGTG CGCCAGCCTC GAGCCACCA GTCTTGAAAC GCCATCAAGC  
 3201 TGAAATAACT CGTACTACTC TTCAGTCAGA TCAAGAGGAA ATCGATTATG  
 3251 ATGATACCAT ATCAGTTGAA ATGAAGAAGG AAGATTTTGA CATTTATGAT  
 3301 GAGGATGAAA ATCAGAGCCC CCGCAGCTTT CAAAAGAAAA CACGACACTA  
 3351 TTTTATTGCT GCAGTGGAGA GGCTCTGGGA TTATGGGATG AGTAGCTCCC  
 3401 CACATGTTCT AAGAACAGG GCTCAGAGTG GCAGTGTCCC TCAGTTC AAG  
 3451 AAAGTTGTTT FCCAGGAATT TACTGATGGC TCCTTTACTC AGCCCTTATA  
 3501 CCGTGGAGAA CTAATGAAC ATTTGGGACT CCTGGGGCCA TATATAAGAG  
 3551 CAGAAGTTGA AGATAATATC ATGGTAACTT TCAGAAATCA GGCCCTCCTG  
 3601 CCCTATTCTT TCTATTCTAG CCTTATTCTT TATGAGGAAG ATCAGAGGCA  
 3651 AGGAGCAGAA CCTAGAAAAA ACTTTGTCAA GCCTAATGAA ACCAAAACCT  
 3701 ACTTTTGGAA AGTGCAACAT CATATGGCAC CCAC TAAAGA TGAGTTTGAC  
 3751 TGCAAAGCCT GGGCTTATTT CTCTGATGTT GACCTGGAAA AAGATGTGCA  
 3801 CTCAGGCCCTG ATTTGGACCC TTCTGGTCTG CCACACTAAC ACAC TGAACC  
 3851 CTGCTCATGG GAGACAAGTG ACAGTACAGG AATTTGCTCT GTTTTTACC  
 3901 ATCTTTGATG AGACCAAAG CTGGTACTTC ACTGAAAATA TGGAAAAGAA  
 3951 CTGCAGGGCT CCCTGCAATA TCCAGATGGA AGATCCCAC TTTAAAGAGA  
 4001 ATTTATCGCTT CCATGCAATC AATGGCTACA TAATGGATAC ACTACCTGGC  
 4051 TTAGTAATGG CTCAGGATCA AAGGATTCGA TGGTATCTGC TCAGCATGGG  
 4101 CAGCAATGAA AACATCCATT CTATTCATTT CAGTGGACAT GTGTTCAGT  
 4151 TACGAAAAAA AGAGGAGTAT AAAATGGCAC TGTACAATCT CTATCCAGGT  
 4201 GTTTTTGAGA CAGTGGAAAT GTTACCATCC AAAGCTGGAA TTTGGCGGGT  
 4251 GGAATGCCCTT ATTGGCGAGC ATCTACATGC TGGGATGAGC ACAC TTTTTC  
 4301 TGGTGTACAG CAATAAGTGT CAGACTCCCC TGGGAATGGC TTCTGGACAC  
 4351 ATTAGAGATT TTCAGATTAC AGCTTCAGGA CAATATGGAC AGTGGGCCCC  
 4401 AAAGCTGGCC AGACTTCATT ATCCCGGATC AATCAATGCC TGGAGCACCA  
 4451 AGGAGCCCTT TTCTTGGATC AAGGTGGATC TGTTGGCACC AATGATTATT  
 4501 CACGGCATCA AGACCCAGGG TGCCCGTCAG AAGTTCTCCA GCCTCTACAT  
 4551 CTCTCAGTTT ATCATCATGT ATAGTCTTGA TGGGAAGAAG TGGCAGACTT  
 4601 ATCGAGGAAA TTCCACTGGA ACCTTAATGG TCTTCTTTGG CAATGTGGAG  
 4651 TCATCTGGGA TAAACACAA TATTTTTAAC CCTCCAATTA TTGCTCGATA  
 4701 CATCCGTTTG CACCCAACCT ATTTATAGCAT TCGCAGCACT CTTCGCATGG  
 4751 AGTTGATGGG CTGTGATTTA AATAGTTGCA GCATGCCATT GGGAAATGGG  
 4801 AGTAAAGCAA TATCAGATGC ACAGATTACT GCTTCATCCT ACTTTACCAA  
 4851 TATGTTTGCC ACCTGGTCTC CTTCAAAGC TCGACTTCAC CTCCAAGGGA  
 4901 GGAGTAATGC CTGGAGACCT CAGGTGAATA ATCCAAAAGA GTGGCTGCAA  
 4951 GTGGACTTCC AGAAGACAAT GAAAGTCACA GGAGTAACTA CTCAGGGAGT  
 5001 AAAATCTCTG CTTACCAGCA TGATATGTGAA GGAGTTCCTC ATCTCCAGCA  
 5051 GTCAAGATGG CCATCAGTGG ACTCTCTTTT TTCAGAATGG CAAAGTAAAG  
 5101 GTTTTTCAGG GAAATCAAGA CTCCTTCACA CCTGTGGTGA ACTCTCTAGA  
 5151 CCCACCGTTA CTGACTCGCT ACCTTCGAAT TCACCCCCAG AGTTGGGTGC  
 5201 ACCAGATTGC CCTGAGGATG GAGGTTCTGG GCTGCGAGGC ACAGACCTC  
 5251 TACGACAAGA AACTGGTGA TTATTACGAG GACAGTTATG AAGATATTTT  
 5301 AGCATACTTG CTGAGTAAAA ACAATGCCAT TGAACCAAGA AGCTTCTCTG  
 5351 ACAAACCTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CTCCAGAACT CCTGGGCGGA  
 5401 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCAAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC  
 5451 CCGGACCCCT GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC  
 5501 CTGAGGTCAA GTTCAACTGG TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC  
 5551 AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC AGCACGTACC GTGTGGT CAG  
 5601 CGTCCCTACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG GAGTACAAGT  
 5651 GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCAGGCC CCATCGAGAA AACCATCTCC  
 5701 AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC  
 5751 CCGGGATGAG CTGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG  
 5801 GCTTCTATCC CAGCGACATC GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCGCCG  
 5851 GAGAACAAC TACAAGACCAC GCCTCCCGTG TTGGACTCCG ACGGCTCCTT  
 5901 CTTCTCTAC AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG CAGCAGGGGA  
 5951 ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCAC TACACG  
 6001 CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA TGA

**Белковая последовательность рSYN FVIII 286 (FVIII-Fc с дополнительной областью a2 между FVIII и Fc; выделена жирным шрифтом и подчеркиванием) (SEQ ID NO: 86)**

```

1   ATRRRYYLGAV ELSWDYMQSD LGELPVDARF PPRVPKSFPP NTSVVYKKTLL
51  FVEFTDHLFN IAKPRPFWMG LLGPTIQAEV YDTVVIITLKN MASHPVSLHA
101 VGVSYWKASE GAIEDDQTSQ REKEDDKVFP GGSHTYVWQV LKENGPMASD
151 PLCLTYSYLS HVDLVKDLNS GLIGALLVCR EGS LAKEKTO TLHKFILLFA
201 VFDEGKSWHS ETKNLSMQDR DAASARAWPK MHTVNGYVNR SLPGLIGCHR
251 KSVYWHVIGM GTTPEVHSIF LEGHTFLVRN HRQASLEISP ITFLTAQTLL
301 MDLGOFLLLFC HISSHOHDGM EAYVKVDSCP EEPOLRMKNN EEAEDYDDDL
351 TDSEMDVVRV DDDNSPFSIQ IRSVAKKHFK TWVHYIAAEE EDWDYAPLVL
401 APDDRSYKSQ YLNNGPQRIG RKYKKVRFMA YDDEFKTR E AIQHESGILG
451 PLYLGEVGDV LLIIFKNQAS RPYNIYPHGI TDVRLYSRR LPKGVKHLKD
501 FPILPGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYSSSFVME RDLASGLIGP
551 LLICYKESVD QRGNQIMSDK RNVILFSVFD ENRSWYLTEN IQRFLNPAG
601 VQLEDPEFQA SNIMHSINGY VFDLQLSVC LHEVAYWYIL SIGAQTDFLS
651 VFFSGYTFKH KMYEDTLTL PPFSGETVFM SMENPGLWIL GCHNSDFRNR
701 GMTALLKVSS CDKNTGDYYE DSYEDISAYL LSKNNAIEPR SFSQNGAGPT
751 SESATPESGP GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPGTSE
801 SATPESGPPT STEPESGSAP GSPAGSPTST EEGTSESATP ESGPGSEPAT
851 SGSETPGTSE SATPESGPGS PAGSPTSTEE GSPAGSPTST EEGTSTEPSE
901 GSAPGTSESA TPESGPGTSE SATPESGPPT SESATPESGP GSEPATSGSE
951 TPGSEPATSG SETPGSPAGS PTSTEEGTST EPSEGSAPGT STEPESGSAP
1001 GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGTSTEP SEGSAPASSP PVLKRHQAEI
1051 TRTTLQSDQE EIDYDDTISV EMKKEDFDIY DEDENQSPRS FQKTRHYFT
1101 AAVERLWDYG MSSSPHVLRN RAQSGSVQF KKVVFQEFTE GSFQPLYRG
1151 ELNEHLGLLG PYIRAEVEDN IMVTFRNQAS RPYSFYSSLI SYEEDQRQGA
1201 EPRKNFVKPN ETKTYFWKVQ HHMAPTKDEF DCKAWAYFSD VDLEKDVHSG
1251 LIGPLLVCHT NTLNPAHGRQ VTVQEFALFF TIFDEKSWY FENMERNCR
1301 APCNIQMEDP TFKENYRFHA INGYIMDTLP GLVMAQDQRI RWYLLSMGSN
1351 ENIHSIHFSG HVFTVRKKEE YKMALYNLYP GVFETVEMLP SKAGIWRVEC
1401 LIGEHLHAGM STLFLVYSNK CQTPLGMASG HIRDFQITAS GQYQWAPKL
1451 ARLHYSGSIN AWSTKEFFSW IKVDLLAPMI IHGKIQGAR QKFSSLYISQ
1501 FIIMYSLDGK KWQTYRGNST GTLMVFFGNV DSSGIKHNI FNPPIIARYIR
1551 LHPHYSIRS TLRMELMGCD LNSCSMPLGM ESKAISDAQI TASSYFTNMF
1601 ATWSPSKARL HLQGRSNAWR PQVNNPEKWL QVDFQKTMKV TGVTTQGVKS
1651 LLTSMYVKEF LISSSQDGHQ WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF TPVNVSLDPP
1701 LLTRYLRIHP QSWVHQIALR MEVLGCEAQD LYDKNTGDYY EDSYEDISAY
1751 LLSKNNAIEP RSFSDKHTHC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK PKDTLMLISRT
1801 PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY NSTYRVSVSL
1851 TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRD
1901 ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPPP VLDSGSGSFL
1951 YSKLTVDKSR WQQGNVFCSS VMHEALHNNY TQKLSLSLSPG K*

```

**Нуклеотидная последовательность FVIII 169 (SEQ ID NO: 87)**

```

1   ATGCA AATAG AGCTC TCCAC CTGCT TCTTT CTGTG CCTTT TGCGA TTCTG
51  CTTTA GTGCC ACCAG AAGAT ACTAC CTGGG TGCAG TGGAA CTGTC ATGGG
101 ACTAT ATGCA AAGTG ATCTC GGTGA GCTGC CTGTG GACGC AAGAT TTCTT
151 CCTAG AGTGC CAAAA TCTTT TCCAT TCAAC ACCTC AGTCG TGTAC AAAAA
201 GACTC TGTTT GTAGA ATTCA CGGAT CACCT TTTC AATC GCTAA GCCAA
251 GGCCA CCCTG GATGG GTCTG CTAGG TCCTA CCATC CAGGC TGAGG TTTAT
301 GATAC AGTGG TCATT AACT TAAGA ACATG GCTTC CCATC CTGTC AGTCT
351 TCATG CTGTT GGTCT ATCCT ACTGG AAGC TTCTG AGGGA GCTGA ATATG
401 ATGAT CAGAC CAGTC AAAGG GAGAA AGAAG ATGAT AAAGT CTTC CTGGT
451 GGAAG CCATA CATAT GTCTG GCAGG TCCTG AAAGA GAATG GTCCA ATGGC
501 CTCTG ACCCA CTGTG CCTTA CCTAC TCATA TCTTT CTCAT GTGGA CCTGG
551 TAAAA GACTT GAATT CAGGC CTCAT TGGAG CCCTA CTAGT ATGTA GAGAA
601 GGGAG TCTGG CCAAG GAAAA GACAC AGACC TTGCA CAAAT TTATA CTAAT
651 TTTTG CTGTA TTTGA TGAAG GAAAA AGTTG GCACT CAGAA ACAA GAACT
701 CCTTG ATGCA GGATA GGGAT GCTGC ATCTG CTCGG GCCTG GCCTA AAATG
751 CACAC AGTCA ATGGT TATGT AAACA GGTCT CTGCC AGGTC TGATT GGATG
801 CCACA GGAAG TCAGT CTATT GGCAT GTGAT TGGAA TGGGC ACCAC TCCTG
851 AAGTG CACTC AATAT TCCTC GAAGG TCACA CATT TTTGT GAGGA ACCAT

```

901 CGCCA GGCTA GCTTG GAAAT CTCGC CAATA ACTTT CCTTA CTGCT CAAAC  
 951 ACTCT TGATG GACCT TGGAC AGTTT CTA CTACT GTTTT GTCAT ATCTC TTCCC  
 1001 ACCAA CATGA TGGCA TGGAA GCTTA TGTC AAGTA GACAG CTGTC CAGAG  
 1051 GAACC CCAAC TACGA ATGAA AAATA ATGAA GAAGC GGAAG ACTAT GATGA  
 1101 TGATC TTACT GATTC TGA AA TGGAT GTGGT CAGGT TTGAT GATGA CAACT  
 1151 CTCTT TCCTT TATCC AAATT CGCTC AGTTG CCAAG AAGCA TCCTA AAAPT  
 1201 TGGGT ACATT ACATT GCTGC TGAAG AGGAG GACTG GGA CT ATGCT CCCTT  
 1251 AGTCC TCGCC CCCGA TGACA GAAGT TATAA AAGTC AATAT TTGAA CAATG  
 1301 GCCCT CAGCG GATTG GTAGG AAGTA CAAAA AAGTC CGATT TATGG CATA C  
 1351 ACAGA TGA AA CCTTT AAGAC TCGTG AAGCT ATTCA GCATG AATCA GGAAT  
 1401 CTTGG GACCT TTACT TTATG GGGAA GTTGG AGACA CACTG TTGAT TATAT  
 1451 TTAAG AATCA AGCAA GCAGA CCATA TAACA TCTAC CCTCA CGGAA TCACT  
 1501 GATGT CCGTC CTTTG TATTC AAGGA GATTA CAAAA AGGTG TAAAA CATT T  
 1551 GAAGG ATTTT CCAAT TCTGC CAGGA GAAAT ATTCA AATAT AAATG GACAG  
 1601 TGACT GTAGA AGATG GGCCA ACTAA ATCAG ATCCT CGGTG CCTGA CCCGC  
 1651 TATTA CTCTA GTTTC GTTAA TATGG AGAGA GATCT AGCTT CAGGA CTCA T  
 1701 TGGCC CTCTC CTCA T CTGCT ACAA GAATC TGTA ATCAA AGAGG AAACC  
 1751 AGATA ATGTG AGACA AGAGG AATGT CATCC TGTTT TCTGT ATTTG ATGAG  
 1801 AACCG AAGCT GGTAC CTCAC AGAGA ATATA CAACG CTTTC TCCCC AATCC  
 1851 AGCTG GAGTG CAGCT TGAGG ATCCA GAGTT CCAAG CCTCC AACAT CATGC  
 1901 ACAGC ATCAA TGGCT ATGTT TTTGA TAGTT TGCAG TTGTC AGTTT GTTTG  
 1951 CATGA GGTGG CATA TGGTA CATT C TAAGC ATTGG AGCAC AGACT GACTT  
 2001 CCTTT CTGTC TTCTT CTCTG GATAT ACCTT CAAAC ACAA ATGGT CTATG  
 2051 AAGAC ACACT CACCC TATTC CCATT CTCAG GAGAA ACTGT CTCA TGTCC  
 2101 ATGGA AAACC CAGGT CTATG GATTC TGGGG TGCCA CAACT CAGAC TTTCG  
 2151 GAACA GAGCC ATGAC CGCCT TACTG AAGGT TTCTA GTTGT GACAA GAACA  
 2201 CTGGT GATTA TTACG AGGAC AGTTA TGAAG ATATT TCAGC ATACT TGCTG  
 2251 AGTAA AAACA ATGCC ATTGA ACCAA GAAGC TTCTC TCAA ACGGC GCGCC  
 2301 AGGTA CCTCA GAGTC TGCTA CCCCC GAGTC AGGGC CAGGA TCAGA CGCAG  
 2351 CCACC TCCGG GTCTG AGACA CCGGG GACTT CCGAG AGTGC CACCC CTGAG  
 2401 TCCGG ACCCG GGTCC GAGCC CGCCA CTTC GGCTC CGAAA CTCCC GGCAC  
 2451 AAGCG AGAGC GCTAC CCCAG AGTCA GGACC AGGAA CATCT ACAGA GCCCT  
 2501 CTGAA GGCTC CGCTC CAGGG TCCCC AGCCG GCAGT CCCAC TAGCA CCGAG  
 2551 GAGGG AACCT CTGAA AGCGC CACAC CCGAA TCAGG GCCAG GGTCT GAGCC  
 2601 TGCTA CCAGC GGCAG CGAGA CACCA GGCAC CTCTG AGTCC GCCAC ACCAG  
 2651 AGTCC GGACC CGGAT CTCCC GCTGG GAGCC CCACC TCCAC TGAGG AGGGA  
 2701 TCTCC TGCTG GCTCT CCAAC ATCTA CTGAG GAAGG TACCT CAACC GAGCC  
 2751 ATCCG AGGGA TCAGC TCCCG GCACC TCAGA GTCCG CAACC CCGGA GTCTG  
 2801 GACCC GGAAC TTCCG AAAGT GCCAC ACCAG AGTCC GGTCC CGGGA CTTCA  
 2851 GAATC AGCAA CACCC GAGTC CGGCC CTGGG TCTGA ACCCG CCACA AGTGG  
 2901 TAGTG AGACA CCAGG ATCAG AACCT GCTAC CTCAG GGTCA GAGAC ACCCG  
 2951 GATCT CCGGC AGGCT CACCA ACCTC CACTG AGGAG GGCAC CAGCA CAGAA  
 3001 CCAAG CGAGG GCTCC GCACC CGGAA CAAGC ACTGA ACCCA GTGAG GGTTC  
 3051 AGCAC CCGGC TCTGA GCCGG CCACA AGTGG CAGTG AGACA CCGCG CACTT  
 3101 CAGAG AGTGC CACCC CCGAG AGTGG CCCAG GCACT AGTAC CGAGC CCTCT  
 3151 GAAGG CAGTG CGCCA GCCTC GAGCC CACCA GTCTT GAAAC GCCAT CAAGC  
 3201 TGA AA TAACT CGTAC TACTC TTCAG TCAGA TCAAG AGGAA ATCGA TTATG  
 3251 ATGAT ACCAT ATCAG TTGAA ATGAA GAAGG AAGAT TTTGA CATT TATGAT  
 3301 GAGGA TGA AA ATCAG AGCCC CCGCA GCTTT CAAAA GAAAA CACGA CACTA  
 3351 TTTTA TTGCT GCAGT GGAGA GGCTC TGGGA TTATG GGATG AGTAG CTCCC  
 3401 CACAT GTTCT AAGAA ACAGG GCTCA GAGTG GCAGT GTCCC TCAGT TCAAG  
 3451 AAAGT TGTTT TCCAG GAATT TACTG ATGGC TCCTT TACTC AGCCC TTATA  
 3501 CCGTG GAGAA CTAAA TGAAC ATTTG GGACT CCTGG GGCCA TATAT AAGAG  
 3551 CAGAA GTTGA AGATA ATATC ATGGT AACTT TCAGA AATCA GGCTT CTCTG  
 3601 CCCTA TTCTT TCTAT TCTAG CCTTA TTTCT TATGA GGAAG ATCAG AGGCA  
 3651 AGGAG CAGAA CCTAG AAAAA ACTTT GTC AA GCCTA ATGAA ACCAA AACTT  
 3701 ACTTT TGGAA AGTGC AACAT CATAT GGCAC CCACT AAAGA TGAGT TTGAC  
 3751 TGCAA AGCCT GGGCT TATTT CTCTG ATGTT GACCT GGA AA AAGAT GTGCA  
 3801 CTCAG GCCTG ATTGG ACCCC TTCTG GTCTG CCACA CTAAC ACACT GAACC  
 3851 CTGCT CATGG GAGAC AAGTG ACAGT ACAGG AATTT GCTCT GTTTT TCACC  
 3901 ATCTT TGATG AGACC AAAAG CTGGT ACTTC ACTGA AAATA TGGAA AGAAA  
 3951 CTGCA GGGCT CCTTG CAATA TCCAG ATGGA AGATC CCACT TTTAA AGAGA  
 4001 ATTAT CGCTT CCATG CAATC AATGG CTACA TAATG GATAC ACTAC CTGGC  
 4051 TTAGT AATGG CTCAG GATCA AAGGA TTCGA TGGTA TCTGC TCAGC ATGGC

4101 CAGCA ATGAA AACAT CCATT CTATT CATT CAGTG GACAT GTGTT CACTG  
4151 TACGA AAAA AGAG AGTAT AAAA GGCAC TGTAC AATCT CTATC CAGGT  
4201 GTTTT TGAGA CAGTG GAAAT GTTAC CATCC AAAGC TGGAA TTTGG CGGGT  
4251 GGAAT GCCTT ATTGG CGAGC ATCTA CATGC TGGGA TGAGC AACTT TTTTC  
4301 TGGTG TACAG CAATA AGTGT CAGAC TCCCC TGGGA ATGGC TTCTG GACAC  
4351 ATTAG AGATT TTCAG ATTAC AGCTT CAGGA CAATA TGGAC AGTGG GCCCC  
4401 AAAGC TGGCC AGACT TCATT ATTCC GGATC AATCA ATGCC TGGAG CACCA  
4451 AGGAG CCCTT TTCTT GGATC AAGGT GGATC TGTGT GCACC AATGA TTATT  
4501 CACGG CATCA AGACC CAGGG TGCCC GTCAG AAGTT CTCCA GCCTC TACAT  
4551 CTCTC AGTTT ATCAT CATGT ATAGT CTTGA TGGGA AGAAG TGGCA GACTT  
4601 ATCGA GAAA TTCCA CTGGA ACCTT AATGG TCTTC TTTGG CAATG TGGAT  
4651 TCATC TGGGA TAAA CACA TATTT TTAAC CCTCC AATTA TTGCT CGATA  
4701 CATCC GTTTG CACCC AACTC ATTAT AGCAT TCGCA GCACT CTTCG CATGG  
4751 AGTTG ATGGG CTGTG ATTTA AATAG TTGCA GCATG CCATT GGGAA TGGAG  
4801 AGTAA AGCAA TATCA GATGC ACAGA TTAAT GCTTC ATCCT ACTTT ACCAA  
4851 TATGT TTGCC ACCTG GTCTC CTTCA AAAGC TCGAC TTCAC CTCCA AGGGA  
4901 GGAGT AATGC CTGGA GACCT CAGGT GAATA ATCCA AAAGA TGCCAA  
4951 GTGGA CTTCC AGAAG ACAAT GAAAG TCACA GGAGT AACTA CTGAG GGAGT  
5001 AAAAT CTCTG CTTAC CAGCA TGTAT GTGAA GGAGT TCCTC ATCTC CAGCA  
5051 GTCAA GATGG CCATC AGTGG ACTCT CTTTT TTCAG AATGG CAAAG TAAAG  
5101 GTTTT TCAGG GAAAT CAAGA CTCCT TCACA CCTGT GGTGA ACTCT CTAGA  
5151 CCCAC CGTTA CTGAC TCGCT ACCTT CGAAT TCACC CCCAG AGTTG GGTGC  
5201 ACCAG ATTGC CCTGA GGATG GAGGT TCTGG GCTGC GAGGC ACAGG ACCTC  
5251 TACGA CAAA CTCAC ACATG CCCAC CGTGC CCAGC TCCAG AACTC CTGGG  
5301 CGGAC CGTCA GTCTT CCTCT TCCCC CAAA ACCCA AGGAC ACCCT CATGA  
5351 TCTCC CGGAC CCCTG AGGTC ACATG CGTGG TGTTG GACGT GAGCC ACGAA  
5401 GACCC TGAGG TCAAG TTCAA CTGGT ACGTG GACGG CGTGG AGGTG CATAA  
5451 TGCCA AGACA AAGCC GCGGG AGGAG CAGTA CAACA GCACG TACCG TGTGG  
5501 TCAGC GTCCT CACCG TCCTG CACCA GGACT GGCTG AATGG CAAGG AGTAC  
5551 AAGTG CAAGG TCTCC AACAA AGCCC TCCCA GCCCC CATCG AGAAA ACCAT  
5601 CTCCA AAGCC AAAGG GCAGC CCGGA GAACC ACAGG TGTAC ACCTT GCCCC  
5651 CATCC CGGGA TGAGC TGACC AAGAA CCAGG TCAGC CTGAC CTGCC TGGTC  
5701 AAAGG CTTCT ATCCC AGCGA CATCG CCGTG GAGTG GGAGA GCAAT GGGCA  
5751 GCCGG AGAAC AACTA CAAGA CCACG CCTCC CGTGT TGGAC TCCGA CCGCT  
5801 CCTTC TTCTT CTACA GCAAG CTCAC CGTGG ACAAG AGCAG GTGGC AGCAG  
5851 GGGAA CGTCT TCTCA TGCTC CGTGA TGCAT GAGGC TCTGC ACAAC CACTA  
5901 CACGC AGAAG AGCCT CTCCC TGTCT CCGGG TAAAT GA

**Белковая последовательность FVIII 169 (SEQ ID NO: 88)**

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYLGAIVE LSWDYMQSDL GELPVDARFP  
51 PRVPKSFFFN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY  
101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPFG  
151 GSHTYVWQVL KENGPMSADP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE  
201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM  
251 HTVNGYVNRN LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHFTFLVRNH  
301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCEPE  
351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT  
401 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSYQ LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY  
451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR PYNIPHGIT  
501 DVRPLYRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR  
551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE  
601 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL  
651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEEDTLTLF PFSGETVFMS  
701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL  
751 SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET PGTSESATPE  
801 SGPGSEPAT S GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG SPAGSPTSTE  
851 EGTSESATPE SGPGSEPAT S GSETPGTSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG  
901 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGTS  
951 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP TSTEPSEGSTE  
1001 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE SGPGTSTEPS  
1051 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD

1101 EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVPOFK  
 1151 KVVQFEFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR  
 1201 PYSFYSSLIS YEEDQRQGAE PRKNFVKPNE TRKYFWKVQH HMAPTKDEFD  
 1251 CKAWAYFSDV DLEKDVHSGE IGPLLVCHTN TLPNPAHGRQV TVQEFALFFT  
 1301 IFDETKSWYF TENMERNCR A PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG  
 1351 LVMAQDQIRIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG  
 1401 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFVLVSNKC QTPPLGMSAGH  
 1451 IRDFQITASG QYQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII  
 1501 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD  
 1551 SSGIKHNIEN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMEMLMGCDL NSCSMPLGME  
 1601 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ  
 1651 VDFQKTMKVT GVTTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFQNGKVK  
 1701 VFGQNDQSFV PVVNSLDPLP LTRYLRHHPQ SWVHQIALRM EVLGCBAQDL  
 1751 YDKTHTCPCP PAPELLGGPS VLFPPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHS  
 1801 DPEVKFNWYV DGEVHNNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNKEY  
 1851 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPSPRDEL TKNQVSLTCLV  
 1901 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ  
 1951 GNVFSCSVMH EALHNNHYTK SLSLSPGK\*

**Нуклеотидная последовательность VWF034 (SEQ ID NO: 91)**

1 ATGAT TCCTG CCAGA TTTGC CGGGG TGCTG CTTCG TCTGG CCCTC ATTTT  
 51 GCCAG GGACC CTTTG TGCAG AAGGA ACTCG CGGCA GGTCA TCCAC GGCCC  
 101 GATGC AGCCT TTTGC GAAGT GACTT CGTCA ACACC TTTGA TGGGA GCATG  
 151 TACAG CTTTG CGGGA TACTG CAGTT ACCTC CTGGC AGGGG GCTGC CAGAA  
 201 ACGCT CCTTC TCGAT TATTG GGGAC TTCCA GAATG GCAAG AGAGT GAGCC  
 251 TCTCC GTGTA TCTTG GGGAA TTTT TGACA TCCAT TTGT TGCA ATGGT  
 301 ACCGT GACAC AGGGG GACCA AAGAG TCTCC ATGCC CTATG CCTCC AAAGG  
 351 GCTGT ATCTA GAAAC TGAGG CTGGG TACTA CAAGC TGTCC GGTGA GGCCCT  
 401 ATGGC TTTGT GGCCA GGATC GATGG CAGCG GCAAC TTTCA AGTCC TGCTG  
 451 TCAGA CAGAT ACTTC AACAA GACCT GCGGG CTGTG TGGCA ACTTT AAGCC  
 501 CTTTG CTGAA GATGA CTTTA TGACC CAAGA AGGGA CCTTG ACCTC GGACC  
 551 CTTAT GACTT TGCCA ACTCA TGGGC TCTGA GCAGT GGAGA ACAGT GGTGT  
 601 GAACG GGCAT CTCCT CCCAG CAGCT CATGC AACAT CTCCT CTGGG GAAAT  
 651 GCAGA AGGGC CTGTG GGAGC AGTGC CAGCT TCTGA AGAGC ACCTC GGTGT  
 701 TTGCC CGCTG CCACC CTCTG GTGGA CCCCC AGCCT TTTGT GGCCC TGTGT  
 751 GAGAA GACTT TGTGT GAGTG TGCTG GGGGG CTGGA GTGCC CTTGC CCTGC  
 801 CCTCC TGGAG TACGC CCGGA CCTGT GCCCA GGAGG GAATG GTGCT GTACG  
 851 GCTGG ACCGA CCACA GCGCG TGCAG CCCAG TGTGC CTTGC TGGTA TGGAG  
 901 TATAG GCAGT GTGTG TCCCC TTGCG CCAGG ACCTG CCAGA GCCTG CACAT  
 951 CAATG AAATG TGTCA GGAGC GATGC GTGGA TGGCT GCAGC TGCCC TGAGG  
 1001 GACAG CTCCT GGATG AAGGC CTCTG CGTGG AGAGC ACCGA GTGTC CCTGC  
 1051 GTGCA TTCCG GAAAG CGCTA CCCTC CCGGC ACCTC CCTCT CTCGA GACTG  
 1101 CAACA CCTGC ATTTG CCGAA ACAGC CAGTG GATCT GCAGC AATGA AGAAT  
 1151 GTCCA GGGGA GTGCC TTGTC ACTGG TCAAT CCCAC TTCAA GAGCT TTGAC  
 1201 AACAG ATACT TCACC TTCAG TGGGA TCTGC CAGTA CCTGC TGGCC CGGGA  
 1251 TTGCC AGGAC CACTC CTTCT CCATT GTCAT TGAGA CTGTC CAGTG TGCTG  
 1301 ATGAC CGCGA CGCTG TGTGC ACCCG CTCCG TCACC GTCCG GCTGC CTGGC  
 1351 CTGCA CAACA GCCTT GTGAA ACTGA AGCAT GGGGG AGGAG TTGCC ATGGA  
 1401 TGGCC AGGAC ATCCA GCTCC CCCTC CTGAA AGGTG ACCTC CGCAT CCAGC  
 1451 ATACA GTGAC GGCCT CCGTG CGCCT CAGCT ACGGG GAGGA CTTGC AGATG  
 1501 GACTG GGATG GCCGC GGGAG GCTGC TGGTG AAGCT GTCCC CCGTC TATGC  
 1551 CGGGA AGACC TGCGG CCTGT GTGGG AATTA CAATG GCAAC CAGGG GCAGC  
 1601 ACTTC CTTAC CCCCT CTGGG CTGGC GGAGC CCGGG GTGGA GACTC TCGGG  
 1651 AACGC CTGGA AGCTG CACGG GACTC GCCAG GACCT GCAGA AGCAG CACAG  
 1701 CGATC CCTGC GCCCT CAACC CGCGC ATGAC CAGGT TCTCC GAGGA GGCCG  
 1751 GCGCG GTCCT GACGT CCCCC ACATT CGAGG CTTGC CATCG TGCCC TACAG  
 1801 CCGCT GCCCT ACCTG CCGAA CTGCC GCTAC GACGT GTGCT CCTGC TCGGA  
 1851 CGGCC GCGAG TGCCCT GTGCG GCGCC CTGGC CAGCT ATGCC GCGCC CTGGC  
 1901 CGGGG AGAGG CGTGC CCGTC CCGTG GCGCG AGCCA GGCCC CTGTG AGCTG  
 1951 AACTG CCCGA AAGGC CAGGT GTACC TGACG TGCGG GACCC CCTGC AACCT  
 2001 GACCT GCCGC TCTCT CTCTT ACCCG GATGA GGAAT GCAAT GAGGC CTGCC  
 2051 TGGAG GGCTG CTTCT GCCCC CCAGG GCTCT ACATG GATGA GAGGG GGGAC  
 2101 TGCCT GCCCA AGGCC CAGTG CCCCT GTTAC TATGA CGGTG AGATC TTCCA

2151 GCCAG AAGAC ATCTT CTCAG ACCAT CACAC CATGT GCTAC TGTGA GGATG  
 2201 GCTTC ATGCA CTGTA CCATG AGTGG AGTCC CCGGA AGCTT GCTGC CTGAC  
 2251 GCTGT CCTCA GCAGT CCCCT GTCTC ATCGC AGCAA AAGGA GCCTA TCCTG  
 2301 TCGGC CCCCC ATGGT CAAGC TGGTG TGTCC CGCTG ACAAC CTGCG GGCTG  
 2351 AAGGG CTCGA GTGTA CCAAA ACGTG CCAGA ACTAT GACCT GGAGT GCATG  
 2401 AGCAT GGGCT GTGTC TCTGG CTGCC TCTGC CCCCC GGGCA TGGTC CGGCA  
 2451 TGAGA ACAGA TGTGT GGCCC TGGAA AGGTG TCCCT GCTTC CATCA GGGCA  
 2501 AGGAG TATGC CCCTG GAGAA ACAGT GAAGA TTGGC TGCAA CACTT GTGTC  
 2551 TGTCG GGACC GGAAG TGGAA CTGCA CAGAC CATGT GTGTG ATGCC ACGTG  
 2601 CTCCA CGATC GGCAT GGCCC ACTAC CTCAC CTTCG ACGGG CTCAA ATACC  
 2651 TGTTT CCCGG GGAGT GCCAG TACGT TCTGG TGCAG GATTA CTGCG GCAGT  
 2701 AACCC TGGGA CCTTT CGGAT CCTAG TGGGG AATAA GGGAT GCAGC CACCC  
 2751 CTCAG TGAAA TGCAA GAAAC GGGTC ACCAT CCTGG TGGAG GGAGG AGAGA  
 2801 TTGAG CTGTT TGACG GGGAG GTGAA TGTGA AGAGG CCCAT GAAGG ATGAG  
 2851 ACTCA CTTTG AGGTG GTGGA GTCTG GCCGG TACAT CATTC TGCTG CTGGG  
 2901 CAAAG CCCTC TCCGT GGTCT GGGAC CGCCA CCTGA GCATC TCCGT GTGCC  
 2951 TGAAG CAGAC ATACC AGGAG AAAGT GTGTG GCCTG TGTGG GAATT TTGAT  
 3001 GGCAT CCAGA ACAAT GACCT CACCA GCAGC AACCT CCAAG TGGAG GAAGA  
 3051 CCCTG TGGAC TTTGG GAACT CCTGG AAAGT GAGCT GCAGT TGTGC TGACA  
 3101 CCAGA AAAGT GCCTC TGGAC TCATC CCCTG CCACC TGCCA TAACA ACATC  
 3151 ATGAA GCAGA CGATG GTGGA TTCCT CCTGT AGAAT CCTTA CCAAT GACGT  
 3201 CTTC AGGAC TGCAA CAAGC TGGTG GACCC CGAGC CATAT CTGGA TGTCT  
 3251 GCATT TACGA CACCT GCTCC TGTGA GTPCA TTGGG GACTG CCGCG CATTC  
 3301 TGCGA CACCA TTGCT GCCTA TGCCC ACGTG TGTGC CCAGC ATGGC AAGGT  
 3351 GGTGA CCTGG AGGAC GGCCA CATTG TGCCC CAGA GCTGC GAGGA GAGGA  
 3401 ATCTC CGGGA GAACG GGTAT GAGGC TGAGT GGCGC TATAA CAGCT GTGCA  
 3451 CCTGC CTGTC AAGTC ACGTG TCAGC ACCCT GAGCC ACTGG CCTGC CCTGT  
 3501 GCAGT GTGTG GAGGG CTGCC ATGCC CACTG CCCTC CAGGG AAAAT CCTGG  
 3551 ATGAG CTTTT GCAGA CCTGC GTTGA CCCTG AAGAC TGTC AGTGT GTGAG  
 3601 GTGGC TGGCC GGGCT TTTGC CTCAG GAAAG AAAGT CACCT TGAAT CCCAG  
 3651 TGACC CTGAG CACTG CCAGA TTTGC CACTG TGATG TTGTC AACCT CACCT  
 3701 GTGAA GCCTG CCAGG AGCCG ATATC GGGTA CCTCA GAGTC TGCTA CCCCC  
 3751 GAGTC AGGGC CAGGA TCAGA GCCAG CCACC TCCGG GTCTG AGACA CCCGG  
 3801 GACTT CCGAG AGTGC CACCC CTGAG TCCGG ACCCG GGTCC GAGCC CGCCA  
 3851 CTTC GGCTC CGAAA CTCCC GGCAC AAGCG AGAGC GCTAC CCCAG AGTCA  
 3901 GGACC AGGAA CATCT ACAGA GCCCT CTGAA GGCTC CGCTC CAGGG TCCCC  
 3951 AGCCG GCAGT CCCAC TAGCA CCGAG GAGGG AACCT CTGAA AGCGC CACAC  
 4001 CCGAA TCAGG GCCAG GGTCT GAGCC TGCTA CCAGC GGCAG CGAGA CACCA  
 4051 GGCAC CTCTG AGTCC GCCAC ACCAG AGTCC GGACC CGGAT CTCCC GCTGG  
 4101 GAGCC CCACC TCCAC TGAGG AGGGA TCTCC TGCTG GCTCT CCAAC ATCTA  
 4151 CTGAG GAAGG TACCT CAACC GAGCC ATCCG AGGGA TCAGC TCCCG GCACC  
 4201 TCAGA GTCGG CAACC CCGGA GTCTG GACCC GGAAC TTCCG AAAGT GCCAC  
 4251 ACCAG AGTCC GGTCC CCGGA CTTCA GAATC AGCAA CACCC GAGTC CCGCC  
 4301 CTGGG TCTGA ACCCG CCACA AGTGG TAGTG AGACA CCAGG ATCAG AACCT  
 4351 GCTAC CTCAG GGTCA GAGAC ACCCG GATCT CCGGC AGGCT CACCA ACCTC  
 4401 CACTG AGGAG GGCAC CAGCA CAGAA CCAAG CGAGG GCTCC GCACC CCGAA  
 4451 CAAGC ACTGA ACCCA GTGAG GGTTC AGCAC CCGGC TCTGA GCCGG CCACA  
 4501 AGTGG CAGTG AGACA CCCGG CACTT CAGAG AGTGC CACCC CCGAG AGTGG  
 4551 CCCAG GCACT AGTAC CGAGC CCTCT GAAGG CAGTG CGCCA GATTC TGGGG  
 4601 GTGGA GGTTC CGGTG GCGGG GGATC CGGTG GCGGG GGATC CGGTG GCGGG  
 4651 GGATC CGGTG GCGGG GGATC CCTGG TCCCG CCGGG CAGCG GAGGC GACAA  
 4701 AACTC ACACA TGCCC ACCGT GCCCA GCTCC AGAAC TCTTG GCGGG ACCGT  
 4751 CAGTC TTCCT CTTC CCCCC AAACC CAAGG ACACC CTCAT GATCT CCGGG  
 4801 ACCCC TTAGG TCACT TCCGT GGTGG TGGAC CTCAG CCAAG AACCT CCTCA  
 4851 GGTCA AGTTC AACTG GTACG TGGAC GGCCT GGAGG TGCAT AATGC CAAGA  
 4901 CAAAG CCGCG GGAGG AGCAG TACAA CAGCA CGTAC CGTGT GTTCA GGCTC  
 4951 CTCAC CGTCC TGAC CAGGA CTGGC TGAAT GGCAA GGAGT ACAAG TGCAA  
 5001 GGTCT CCAAC AAAGC CCTCC CAGCC CCCAT CGAGA AAACC ATCTC CAAAG  
 5051 CCAAA GGGCA GCCCC GAGAA CCACA GGTGT ACACC CTGCC CCCAT CCGGG  
 5101 GATGA GCTGA CCAAG AACCA GGTCA GCCTG ACCTG CCTGG TCAAA GGCTT  
 5151 CTATC CCAGC GACAT CGCCG TGGAG TGGGA GAGCA ATGGG CAGCC GGAGA  
 5201 ACAAC TACAA GACCA CGCCT CCCGT GTTGG ACTCC GACGG CTCTT TCTTC  
 5251 CTCTA CAGCA AGCTC ACCGT GGACA AGAGC AGGTG GCAGC AGGGG AACGT  
 5301 CTCTT CATGC TCCGT GATGC ATGAG GCTCT GCACA ACCAC TACAC GCAGA

**Белковая последовательность VWF034 (SEQ ID NO: 92)**

```

1  MIPARFAGVL LALALILPQT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFVNTFDGSM
51  YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
101 TVTQGDQRVV MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSNGFQVLL
151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEGWC
201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEFFVALC
251 EKTLCCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWTDHSA CSPVCPAGME
301 YRQCVSFCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTECPC
351 VHS GKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECV TGQSHFKSFD
401 NRYTFFSGIC QYLLARDQCQD HSFIVIVETV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
451 LHNSLVKLLK GAGVAMDQGD IQLPLLKGLD RIQHTVTASV RLSYGEDLQM
501 DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTFSG LAEPRVEDFG
551 NAWKHLHGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS BEACAVLTPS TFEACHRAVS
601 PLPLYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVVR AWREPRGCEL
651 NCPKGVVYLQ CGTPCNLTGR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
701 CVPKAQCFY YDGEIFQFED IFSDHITMICY CEDGFMICTM SGVFGSLLED
751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPF MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGNTCV
851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECC YVLVQDYCGS
901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTLIVE GGEIELFDGE VNVKRPKDE
951 THEFVVESEGR YIILLGKAL SVVWRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
1001 GIQNDLTSS NLQVEEDPVD FGNWVKVSSQ CADTRKVFPLD SSPATCHMNI
1051 MKQTMVDSSC RILTSDFVQD CNKLVDPPEY LDVCIYDTCS CESIGDCAAF
1101 CDTIAAYAHV CAQHGVVTVW RTATLCPQSC EERNLRENGY EAERWYRNCCL
1151 PACQVTCQHP EPLACPVQCV EGCHAHCPGG KLLDELLOTC VDPEDCPVCE
1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGTSSEATP
1251 ESGPGSEPAT SGSETPGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP GTSESEATPES
1301 GPGTSTEPSE GSAPGSPAGS PTSTEEGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP
1351 GTSSEATPES GPGSPAGSPT STEEGSPAGS PTSTEEGTST EPSEGSAPGT
1401 SESATPESGP GTSSEATPES GPGTSEATP ESGPGSEPAT SGSETPGSE
1451 ATSGSETPGS PAGESPTSTEE GTSTEPSEGS APGTSTEPSE GSAPGSEPAT
1501 SGSETPGTSE SATPESGPGT STEPSEGSAP DIGGGGGGGG GGLVLPVRS
1551 GDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSH
1601 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
1651 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPSPRDELK KNQVSLTCLV
1701 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSEFFLYSK LTVDKSRWQQ
1751 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*

```

Приведенное выше описание конкретных вариантов реализации настолько полно раскрывает общий смысл изобретения, что посторонние лица смогут, используя знания, доступные специалистам в данной области техники, легко модифицировать и/или адаптировать для различных применений такие конкретные варианты реализации изобретения без ненадлежащего экспериментирования, не отходя от общей идеи настоящего изобретения. Таким образом, такие адаптации и модификации рассматриваются как не выходящие за пределы значений и объема эквивалентов раскрытых вариантов реализации изобретения на основании описания и рекомендаций, приведенных в данном документе. Следует понимать, что фразеология или терминология в данном документе используются в целях описания, а не ограничения, так что терминология или фразеология данного описания заявки должны рассматриваться квалифицированным специалистом в свете описания и рекомендаций.

Другие варианты реализации изобретения будут очевидны квалифицированным специалистам в данной области техники из описания заявки и практики изобретения, раскрытых в данном документе. Следует понимать, что описание заявки и примеры должны рассматриваться только как иллюстративные, а действительные объем и сущность изобретения определяются приведенной далее формулой изобретения. Все патенты и публикации, приведенный в данном документе, включены в него в качестве ссылок в полном объеме.

Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/840872, поданной 28 июня 2013 г. Содержание вышеуказанной заявки включено в данный документ в качестве ссылки в полном объеме.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Химерная молекула, способная связываться с белком FVIII и содержащая белок фактора фон Виллебранда (VWF), гетерологичный фрагмент (H1), последовательность удлиненного рекомбинантного полипептида (XTEN) и линкер VWF, соединяющий белок VWF с гетерологичным фрагментом, причем белок VWF содержит домен D' и домен D3 VWF; причем линкер VWF содержит область a2 из фактора VIII (FVIII); причем последовательность XTEN соединена с белком VWF, гетерологичным фрагментом (H1), линкером VWF или любой их комбинацией.

2. Химерная молекула по п.1, отличающаяся тем, что последовательность XTEN соединяет белок VWF с линкером VWF или линкер VWF с гетерологичным фрагментом.

3. Химерная молекула по п.1 или 2, дополнительно содержащая вторую полипептидную цепь, которая содержит белок FVIII, причем первая полипептидная цепь представляет собой химерную молекулу, состоящую из белка VWF, гетерологичного фрагмента (H1), и обе цепи ассоциированы друг с другом.

4. Химерная молекула по п.3, отличающаяся тем, что белок FVIII дополнительно содержит дополнительную последовательность XTEN.

5. Химерная молекула по п.3 или 4, отличающаяся тем, что вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй гетерологичный фрагмент (H2).

6. Химерная молекула, способная связываться с белком FVIII и содержащая первую полипептидную цепь, которая содержит белок VWF, гетерологичный фрагмент (H1) и линкер VWF, соединяющий белок VWF и гетерологичный фрагмент (H1), и вторую полипептидную цепь, содержащую белок FVIII и последовательность XTEN, причем белок VWF содержит домен D' и домен D3 VWF;

причем линкер VWF в первой полипептидной цепи содержит область a2 из фактора VIII (FVIII);

причем первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь ассоциированы друг с другом.

7. Химерная молекула по п.6, содержащая дополнительную последовательность XTEN, которая соединена с белком VWF, гетерологичным фрагментом, линкером VWF или любой их комбинацией.

8. Химерная молекула по п.6 или 7, содержащая второй гетерологичный фрагмент (H2), соединенный с белком FVIII, последовательностью XTEN или обоими.

9. Химерная молекула по любому из пп.1-8, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна из последовательностей XTEN содержит около 42 аминокислот, около 72 аминокислот, около 108 аминокислот, около 144 аминокислот, около 180 аминокислот, около 216 аминокислот, около 252 аминокислот, около 288 аминокислот, около 324 аминокислот, около 360 аминокислот, около 396 аминокислот, около 432 аминокислот, около 468 аминокислот, около 504 аминокислот, около 540 аминокислот, около 576 аминокислот, около 612 аминокислот, около 624 аминокислот, около 648 аминокислот, около 684 аминокислот, около 720 аминокислот, около 756 аминокислот, около 792 аминокислот, около 828 аминокислот, около 836 аминокислот, около 864 аминокислот, около 875 аминокислот, около 912 аминокислот, около 923 аминокислот, около 948 аминокислот, около 1044 аминокислот, около 1140 аминокислот, около 1236 аминокислот, около 1318 аминокислот, около 1332 аминокислоты, около 1428 аминокислот, около 1524 аминокислот, около 1620 аминокислот, около 1716 аминокислот, около 1812 аминокислот, около 1908 аминокислот или около 2004 аминокислот.

10. Химерная молекула по любому из пп.1-9, отличающаяся тем, что по меньшей мере одна последовательность XTEN выбрана из AE42, AE72, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288, AG144, SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 47; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 48; SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 44 и SEQ ID NO: 42.

11. Химерная молекула по любому из пп.1-10, отличающаяся тем, что линкер VWF содержит указанную область a2, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 90, около 95 или на 100% идентичную участку от Glu720 по Arg740, соответствующим полноразмерному FVIII, причем область a2 способна расщепляться тромбином.

12. Химерная молекула по п.11, отличающаяся тем, что линкер VWF содержит область a2, содержащую SEQ ID NO: 4.

13. Химерная молекула по любому из пп.1-12, отличающаяся тем, что (a) домен D' белка VWF содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 90, около 95, около 96, около 97, около 98, около 99 или на 100% идентичную аминокислотам 764-866 последовательности SEQ ID NO: 2; (b) домен D3 белка VWF содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 90, около 95, около 96, около 97, около 98, около 99 или на 100% идентичную аминокислотам 867-1240 последовательности SEQ ID NO: 2; или как (a), так и (b).

14. Химерная молекула по любому из пп.1-13, отличающаяся тем, что последовательность белка VWF содержит аминокислоты 764-1240 последовательности SEQ ID NO: 2.

15. Химерная молекула по п.14, отличающаяся тем, что белок VWF дополнительно содержит домен VWF, выбранный из группы, состоящей из домена D1, домена D2, доменов D1 и D2, домена A1, домена A2, домена A3, домена D4, домена B1, домена B2, домена B3, домена C1, домена C2, домена CK, одного или более их фрагментов и любых их комбинаций.

16. Химерная молекула по любому из пп.1-15, отличающаяся тем, что белок VWF состоит из: (1) доменов D' и D3 VWF или их фрагментов; (2) доменов D1, D' и D3 VWF или их фрагментов; (3) доменов D2, D' и D3 VWF или их фрагментов; (4) доменов D1, D2, D' и D3 VWF или их фрагментов; или (5) доменов D1, D2, D', D3 и A1 VWF или их фрагментов.

17. Химерная молекула по любому из пп.1-16, отличающаяся тем, что гетерологичный фрагмент (H1) содержит константную область иммуноглобулина или ее участок; тем, что второй гетерологичный фрагмент (H2) содержит константную область иммуноглобулина или ее участок; или тем, что H1 и H2 оба содержат константную область иммуноглобулина.

18. Химерная молекула по п.16, отличающаяся тем, что первый гетерологичный фрагмент (H1) содержит Fc-область; тем, что второй гетерологичный фрагмент (H2) содержит Fc-область; или тем, что H1 и H2 оба содержат Fc-область.

19. Химерная молекула по любому из пп.5 и 8-18, отличающаяся тем, что первый гетерологичный фрагмент (H1) представляет собой Fc-область и второй гетерологичный фрагмент (H2) представляет собой Fc-область, причем H1 и H2 ассоциированы друг с другом с помощью ковалентной связи.

20. Полинуклеотид, кодирующий химерную молекулу по любому из пп.1-19 или комплементарную ей последовательность.



21. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.20 и один или более промоторов, функционально связанных с полинуклеотидом.

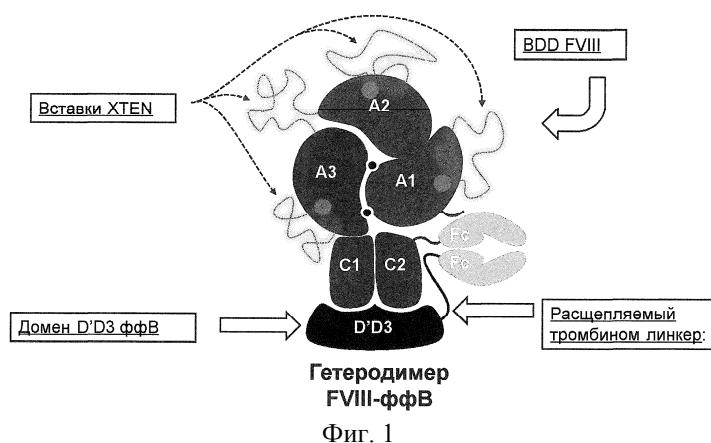
22. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по п.20 или вектор по п.21.

23. Фармацевтическая композиция для снижения частоты или тяжести эпизода кровотечения, или предотвращения возникновения эпизода кровотечения у субъекта, нуждающегося в этом, содержащая химерную молекулу по любому из пп.1-19 и фармацевтически приемлемый носитель.

24. Способ снижения частоты или тяжести эпизода кровотечения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества химерной молекулы по любому из пп.1-19 или полинуклеотида по п.20.

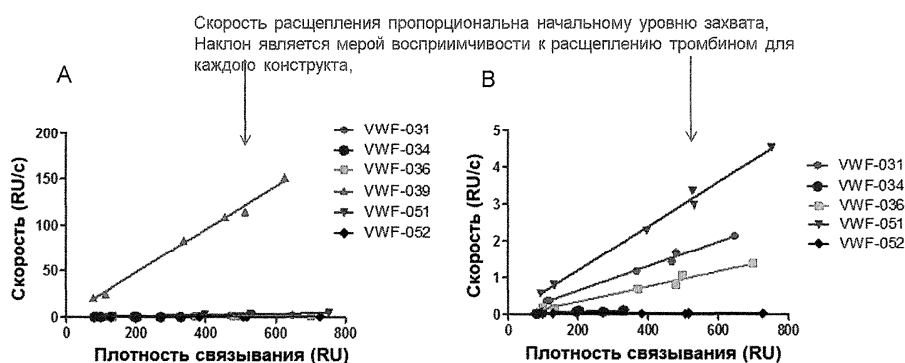
25. Способ предотвращения возникновения эпизода кровотечения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества химерной молекулы по любому из пп.1-19 или полинуклеотида по п.20.

26. Способ получения химерной молекулы по любому из пп.1-19, включающий трансфекцию одной или более клеток-хозяев полинуклеотидом по п.20 и обеспечение экспрессии химерной молекулы в клетке-хозяине.

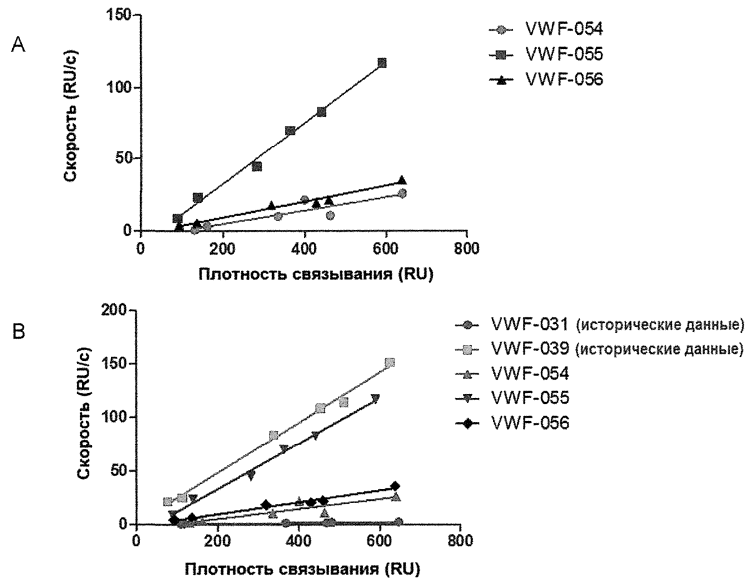


Конструкт	Тип и длина линкера между фФВ-D'D3 и Fc
VWF-031	48aa (сайт LVPR)
VWF-034	288 XTEN+ 35aa (сайт LVPR)
VWF-035	73aa (сайт LVPR)
VWF-036	98aa (сайт LVPR)
VWF-039	26aa (сайт LVPR+PAR1)
VWF-051	54aa (сайт ALRPRVV)
VWF-052	48aa (без тромбинового сайта)
VWF-054	40aa (маленький a1 из FVIII)
VWF-055	34aa (маленький a2 из FVIII)
VWF-056	46aa (маленький a3 из FVIII)

Фиг. 2



Фиг. 3



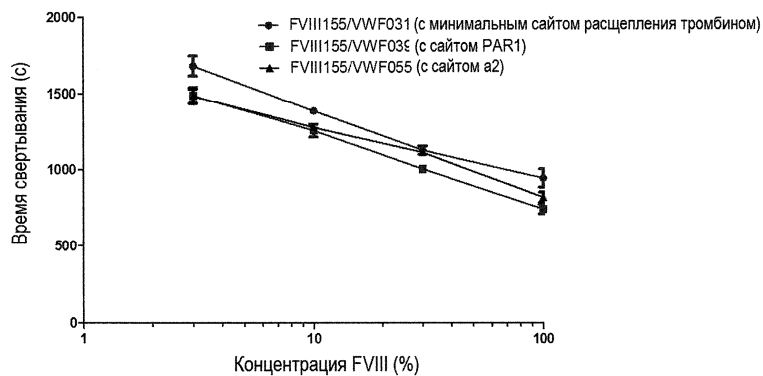
Фиг. 4

Construct	наклон (1/s)
VWF-031	$3,32 \times 10^{-3} \pm 0,16 \times 10^{-3}$
VWF-034	$0,31 \times 10^{-3} \pm 0,085 \times 10^{-3}$
VWF-036	$2,06 \times 10^{-3} \pm 0,18 \times 10^{-3}$
VWF-039	$235,4 \times 10^{-3} \pm 9,1 \times 10^{-3}$
VWF-051	$6,00 \times 10^{-3} \pm 0,27 \times 10^{-3}$
VWF-052	$0,02 \times 10^{-3} \pm 0,006 \times 10^{-3}$
VWF-054	$46,35 \times 10^{-3} \pm 11,53 \times 10^{-3}$
VWF-055	$213,5 \times 10^{-3} \pm 8,5 \times 10^{-3}$
VWF-056	$55,6 \times 10^{-3} \pm 4,5 \times 10^{-3}$

$\text{наклон}_{\text{VWF-039}} / \text{наклон}_{\text{VWF-031}} = 71$   
 $\text{наклон}_{\text{VWF-055}} / \text{наклон}_{\text{VWF-031}} = 65$   
 $\text{наклон}_{\text{VWF-056}} / \text{наклон}_{\text{VWF-031}} = 1,8$

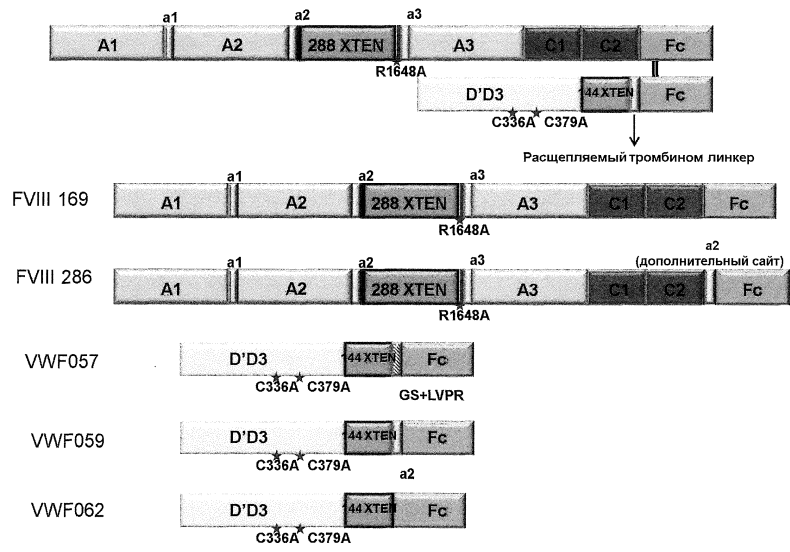
Фиг. 5

Анализ методом ROTEM цельной крови донора с HemA

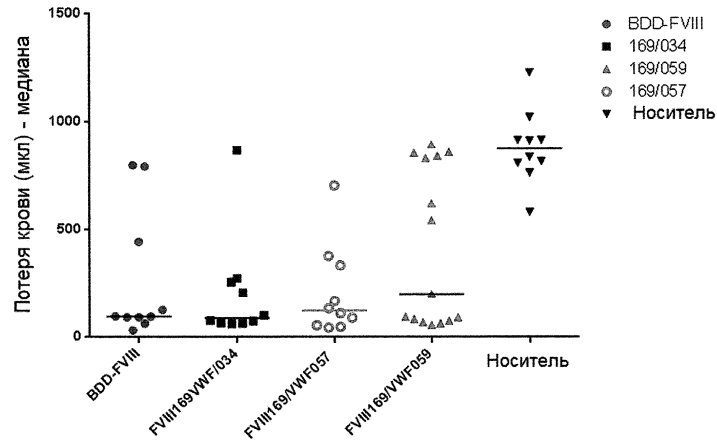


Фиг. 6

Полосчатая схема типичного гетеродимера FVIII-фФВ



Фиг. 7



Фиг. 8

