(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 041874 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.12.12

(21) Номер заявки
201491470

(22) Дата подачи заявки
2012.07.11

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

(54) КОМПОЗИЦИИ ФАКТОРА VIII И СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОДОБНЫХ

(31) **61/599,400**
(32) **2012.02.15**
(33) **US**
(43) **2015.01.30**
(86) **PCT/US2012/046326**
(87) **WO 2013/122617 2013.08.22**

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

(72) Изобретатель:
Шелленбергер Уолкер, Чан Пей-юн, Варфай Фатбардха, Дин Шен, Сильверман Джошуа, Ван Чиавей, Спинк Бенджамин, Стеммер Уиллем П., Гитинг Натан, Кулман Джон, Лю Туняо, Тоби Гарабет Г., Цзян Хайянь, Питерс Роберт, Ван Депин, Мей Байсон (US)

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

(56) WO-A2-2011069164
US-A1-20100239554
WO-A2-2012007324
US-A1-20060122376
LEYTE et al. "Sulfation of Tyr1680 of human blood coagulation factor VIII is essential for the interaction of factor VIII with von Willebrand factor", J. Biol. Chem.; 15 January 1991 (15.01.1991); vol. 266, No. 2; pages 740-746

(57) Изобретение относится к композициям, которые содержат факторы свертывания на основе фактора VIII, связанные с расширенным рекомбинантным полипептидом (XTEN), изолированными нуклеотидами, кодирующими композиции, векторам и клеткам-хозяевам, которые содержат подобное, и способам получения и использования подобных композиций при лечении заболеваний, связанных с фактором VIII, расстройств и состояний.

041874 B1

041874 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Заявка на настоящий патент испрашивает приоритет предварительной патентной заявки США с серийным номером 61/599400, поданной 15 февраля 2012 г., которая включена в данный документ в виде ссылки.

Перечень последовательностей

Настоящее приложение содержит перечень последовательностей, которые были представлены в формате ASCII с помощью EFS-Web, и включены в данном документе в виде ссылки в своем полном объеме. Указанная копия ASCII, созданная 11 июля 2012 года, называется 32887346.txt и имеет размер 13344768 байт.

Уровень техники

Фактор VIII представляет собой важный компонент внутреннего пути каскада свертывания крови. В кровообращении фактор VIII, в основном, образует комплекс с фактором фон Виллебранда. После активация тромбином (фактор IIa), он диссоциирует из комплекса для того, чтобы взаимодействовать с фактором IXa во внутреннем каскаде свертывания, который, в свою очередь, активирует фактор X. После удаления из комплекса фактора фон Виллебранда, активированный фактор VIII протеолитически инактивируют с помощью активированного протеина C (APC), фактора Xa и фактора IXa, и быстро выводят из кровотока. Когда образуется комплекс с нормальным протеином фактора фон Виллебранда, время полужизни фактора VIII составляет приблизительно 12 ч, в то время как при отсутствии фактора фон Виллебранда, время полужизни фактора VIII снижено до 2 ч (Tuddenham EG, et al., Br J Haematol. (1982) 52(2):259-267).

При гемофилии, свертывание крови нарушается из-за отсутствия некоторых факторов свертывания плазмы крови. Гемофилия представляет собой дефицит фактора VIII, и является рецессивно сцепленной с полом, расстройством X-хромосомы, которое представляет 80% случаев гемофилии. Стандарт медицинской помощи для управления гемофилией A представляет собой заместительную терапию с концентратами рекомбинантного фактора VIII. Субъекты с тяжелой формой гемофилии A имеют циркулирующие уровни прокоагулирующего фактора VIII ниже 1-2% нормы, и, как правило, при профилактической терапии с целью поддержания фактора VIII выше 1% между дозами, которую обычно выполняют с помощью обеспечения фактора VIII от двух до трех раз в неделю. Лица с умеренно тяжелой формой гемофилии (уровни фактора VIII составляет 2-5% нормы) составляют 25-30% случаев гемофилии и проявляют кровотечения после незначительный травмы. Лица с легкой формой гемофилии A (уровни фактора VIII составляют 5-40% нормы) составляют 15-20% всех случаи гемофилии, а кровотечение начинается только после значительной травмы или операции.

In vivo активность экзогенно обеспечиваемого фактора VIII ограничена как коротким временем полужизни протеина, так и ингибиторами, которые связываются с фактором VIII и понижают или подавляют гемостатическую функцию.

До 30% пациентов с гемофилией, которые получают экзогенно-обеспечиваемый фактор VIII, повышают иммунный ответ IgG, направленный на фактор VIII (Towfighi, F., et al. Comparative measurement of anti-factor VIII antibody by Bethesda assay and ELISA reveals restricted isotype profile and epitope specificity. Acta Haematol (2005) 114:84-90), который может привести к полному ингибированию его прокоагулянтной активности и/или обеспечивает более быстрое выведение фактора VIII (Briët E et al. High titer inhibitors in severe haemophilia A. A meta-analysis based on eight long-term follow-up studies concerning inhibitors associated with crude or intermediate purity factor VIII products. Throm. Haemost. (1994) 72: 162-164). Антитела IgG, которые называют ингибиторами FVIII, прежде всего направлены на домены A2, A3 и C2 (Scandella D et al. Localization of epitopes for human factor VIII inhibitor antibodies by immunoblotting and antibody neutralization. Blood (1989) 74:1618-1626), но могут выступать также против доменов A1, B и C1. Таким образом, варианты лечения в случае пациентов с ингибиторами FVIII ограничены.

Большие протеины, такие как фактор VIII, как правило, вводят внутривенно таким образом, что лекарственный препарат непосредственно доступен в кровотоке. Ранее было показано, что немодифицированный фактор VIII, который вводят внутримышечно, дает максимальный циркулирующий уровень только 1,4% от нормального уровня в плазме (Pool et al., Ineffectiveness of Intramuscularly Injected Factor VIII Concentrate in Two Hemophilic Patients. New England J. Medicine (1966) 275(10):547-548). Композиции, которые могут быть введены другим путем, не внутривенно, могли бы значительно упростить их использование, повысить безопасности и привести к существенной экономии средств.

Химические модификации терапевтического протеина может изменить его in vivo скорость выведения и следующее время полужизни в сыворотке. Одним из примеров общей модификации является добавление фрагмента полиэтиленгликоля (PEG), как правило, в сочетании с протеином, посредством альдегидной или N-гидроксисукцинимидной (NHS) группы при реагировании PEG с аминогруппой (например, с боковой цепью лизина или N-концом). Несмотря на это, этап конъюгации может привести к образованию смесей гетерогенных продуктов, которые требуют экстракции, очистки и/или других дополнительных способов, все из которых обязательно влияют на выход продукта и контроль качества. Кроме того, фармакологическая функция факторов свертывания может быть затруднена, если боковые цепи аминокислоты в непосредственной области от его связывающего сайта модифицируются с помощью

способа пегилирования. Другие подходы содержат генетическое слияние домена Fc с терапевтическим протеином, который увеличивает размер терапевтического протеина, следовательно снижая скорости выведения через почки. В отдельных случаях, домен Fc наделяет способностью связываться с и быть переработанным из лизосом с помощью рецептор FcRn, что приводит к увеличенному фармакокинетическому времени полужизни. К сожалению, во время рекомбинантной экспрессии домен Fc не изгибается эффективно, и имеет тенденцию к образованию нерастворимых осадков, известных как тельца включения. Эти тельца включения должны быть солюбилизированы, а функциональный протеин должен быть ренатурирован из неправильно упакованного агрегата, что является трудоемким, неэффективным и дорогостоящим способом.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к новым композициям гибридного белка фактора свертывания VIII и их использованиям. В частности, композиции, которые обеспечивают в данном документе, прежде всего используют для лечения или улучшение состояния, связанного с гемофилией A, недостатками фактора VIII, нарушениями свертываемости и коагулопатии. В отдельном аспекте, настоящее изобретение обеспечивает композиции изолированных гибридных белков, которые содержат фактор VIII (FVIII) и один или несколько из расширенных рекомбинантных полипептидов (XTEN), при том, что гибридный белок проявляет прокоагулянтную активность. Субъект XTEN, используемый для построения подобных гибридных белков, представляет собой, как правило, полипептид с неповторяющейся последовательностью и неструктурированной конформацией. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения один или несколько XTEN связаны с фактором свертывания FVIII ("CF"), выбранным из природного фактора VIII человека, удаленных последовательностей B-доменов фактора VIII ("FVIII BDD") и вариантов их последовательностей (все вышеизложенное совместно "FVIII" или "CF"), что приводит к гибридному белку рекомбинантного фактора VIII-XTEN ("CFXTEN"). Полипептидный компонент фактора VIII CFXTEN содержит домен A1, домен A2, домен C1, домен C2, и, необязательно, домен B или его часть. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения FVIII дополнительно характеризуется с помощью трансдифференцировки вышеупомянутых доменов, для того, чтобы они содержали кислый спейсер a1, a2 и a3. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, которые содержат гибридные белки и их использования в способах и схемах лечения состояний, связанных с фактором VIII. Композиции CFXTEN имеют повышенные фармакокинетические и фармакологические свойства, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, что может позволить более удобное дозирование и улучшенную эффективность.

В первом аспекте, настоящее изобретение относится к гибридным белкам рекомбинантного фактора VIII, которые содержат полипептид фактора VIII и один или несколько расширенных рекомбинантных полипептидов (XTEN), связанный с фактором VIII. В отдельных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает гибридные белки рекомбинантного фактора VIII, которые содержат полипептид фактора VIII и по меньшей мере один расширенный рекомбинантный полипептид (XTEN), при том, что указанный полипептид фактора VIII содержит домен A1, который содержит кислый участок-спейсер a1, домен A2, который содержит кислый участок-спейсер a2, домен A3, который содержит кислый участок-спейсер a3, домен C1, домен C2 и, необязательно, весь, или часть, домен B, и, отличающиеся тем, что указанный по меньшей мере один XTEN связан с указанным полипептидом фактора VIII на (i) C-конце указанного полипептида фактора VIII; (ii) в домене B указанного полипептида фактора VIII, если присутствует весь, или его часть, домен B; (iii) в домене A1 указанного полипептида фактора VIII; (iv) в домене A2 указанного полипептида фактора VIII; (v) в домене A3 указанного полипептида фактора VIII; (vi) в домене C1 указанного полипептида фактора VIII; (vii) в домене C2 указанного полипептида фактора VIII; (viii) на N-конце указанного полипептида фактора VIII, или (ix) между двумя доменами указанного полипептида фактора VIII, отличающегося тем, что гибридный белок сохраняет по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 или 500% прокоагулянтной активности, при измерении с помощью in vitro анализа коагулирующей активности, по сравнению с соответствующим фактором VIII, не связанным с XTEN. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения в предыдущем гибридном белке рекомбинантного фактора VIII по меньшей мере один XTEN связан с указанным полипептидом фактора VIII в пределах сайта, или в пределах 1-6 аминокислот сайта, выбранного из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9. В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает гибридные белки рекомбинантного фактора VIII, которые содержат полипептид фактора VIII и по меньшей мере первый расширенный рекомбинантный полипептид (XTEN), отличающийся тем, что указанный полипептид фактора VIII содержит домен A1, который содержит кислый участок-спейсер a1, домен A2, который содержит кислый участок-спейсер a2, домен A3, который содержит кислый участок-спейсер a3, домен C1, домен C2 и, необязательно, весь, или его часть, домен B, и отличающиеся тем, что указанный первый XTEN связан с указанным полипептидом фактора VIII на (i) C-конце указанного полипептида фактора VIII; (ii) в домене B указанного полипептида фактора VIII, если присутствует весь домен B, или его часть; (iii) в домене A1 указанного полипептида фактора VIII; (iv) в домене A2 указанного полипептида фактора VIII; (v) в домене A3 указанного полипептида фактора VIII; (vi) в домене C1 указанного полипептида фактора VIII; или (vii) в домене C2 указанного полипептида

фактора VIII; и если, по сравнению с соответствующим протеином фактора VIII, не связанным с XTEN, гибридный белок (a) сохраняет по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% 100, 200, 300, 400 или 500% прокоагулянтной активности в in vitro анализе коагулирующей активности, описанном в данном документе или других подобных анализах, известных в данном уровне техники, и/или (b) проявляет сниженное связывание с анти-фактор VIII антителом в in vitro анализе связывания, описанном в данном документе, или других подобных анализах, известных в данном уровне техники. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение, в предыдущем гибридном белке рекомбинантного фактора VIII по меньшей мере один XTEN связан с указанным полипептидом фактора VIII в пределах сайта или в пределах 1-6 аминокислот сайта, выбранного из табл. 5, 6, 7, 8 и 9. В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает гибридные белки рекомбинантного фактора VIII, которые содержат полипептид фактора VIII и по меньшей мере первый расширенный рекомбинантный полипептид (XTEN), отличающиеся тем, что указанный полипептид фактора VIII содержит домен A1, который содержит кислый участок-спейсер a1, домен A2, который содержит кислый участок-спейсер a2, домен A3, который содержит кислый участок-спейсер a3, домен C1, домен C2 и, необязательно, весь, или его часть, домен B, и, отличающийся тем, что указанный первый XTEN связан с указанным полипептидом фактора VIII в пределах инсерционного сайта, выбранные из табл. 6 и табл. 7 и, отличающиеся тем, что гибридный белок сохраняет по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 или 500% прокоагулянтной активности, при измерении с помощью in vitro анализа коагулирующей активности, описанного в данном документе, или других подобных анализов, известных в данном уровне техники, по сравнению с соответствующим протеином фактора VIII, не связанным с XTEN. Неограничивающие примеры протеина фактора VIII, не связанного с XTEN содержат природный FVIII, BDD FVIII, pBC100 и последовательности из табл. 1. В дополнительном варианте осуществления гибридного белка рекомбинантного фактора VIII полипептид фактора VIII имеет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или 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%, до около 100% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из группы, которая состоит из последовательностей из табл. 1, последовательность проиллюстрирована на фиг. 3, и последовательность проиллюстрирована на фиг. 4, при оптимальном выравнивании. В еще одном дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок содержит по меньшей мере другой похожий XTEN, связанный с указанным полипептидом фактора VIII на C-конце указанного полипептида фактора VIII, или в пределах, или, необязательно, заменяет домен B указанного полипептида фактора VIII. В специфическом варианте осуществления настоящего изобретения, гибридный белок содержит по меньшей мере одну последовательность XTEN, которая располагается в пределах, или, необязательно, заменяет домен B указанного полипептида фактора VIII. В дополнительном специфическом варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок на C-конце указанного полипептида фактора VIII содержит по меньшей мере одну последовательность XTEN, связанную с указанным полипептидом фактора VIII. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок рекомбинантного фактора VIII содержит вариант фактора VIII человека без B-домена, при том, что делеция B-домена начинается с первого положения около аминокислотного остатка с номером от 741 до около 750 и заканчивается на втором положении на аминокислотном остатке с номером от 1635 до около 1648 по отношению к непроцессированной последовательности фактора VIII человека, как проиллюстрировано на фиг. 3. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок рекомбинантного фактора VIII содержит первую последовательность XTEN, связанную с указанным полипептидом фактора VIII на C-конце указанного полипептида фактора VIII, и по меньшей мере второй XTEN в пределах или заменяющий домен B указанного полипептида фактора VIII, отличающийся тем, что второй XTEN связан с C-концевым концом около аминокислотного остатка с номером от 741 до около 750 и с N-концевым концом аминокислотного остатка с номерами от 1635 до около 1648 по отношению к непроцессированной последовательности фактора VIII человека, как проиллюстрировано на фиг. 3, отличающийся тем, что суммарная длина XTEN составляет по меньшей мере около 100 аминокислотных остатков. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения в предыдущем гибридном белке, второй XTEN связывает аминокислоты фактора VIII между N745 и P1640, или между S743 и Q1638, или между P747 и V1642, или между N745 и Q1656, или между N745 и S1657, или между N745 и T1667, или между N745 и Q1686, или между R747 и V1642 или между T751 и T1667. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок рекомбинантного фактора VIII содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99%, до около 100% идентичности последовательности, по сравнению с последовательностью сопоставимой длины, выбранный из табл. 21, при оптимальном выравнивании. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок рекомбинантного фактора VIII содержит по меньшей мере второй XTEN, необязательно, третий XTEN, необязательно, четвертый XTEN, необяза-

тельно, пятый XTEN и, необязательно, шестой XTEN, при том, что каждый из второго, третьего, четвертого, пятого, или шестого XTEN связан с указанным полипептидом фактора VIII во втором, третьем, четвертом, пятом или шестом сайте, выбранном из группы, которая состоит из инсерционного сайта из табл. 5, 6, 7, 8 и 9; расположение в пределах 6 аминокислот от аминокислотного остатка 32, 220, 224, 336, 339, 390, 399, 416, 603, 1656, 1711, 1725, 1905 и 1910 зрелого фактора VIII; расположение между любыми двумя соседними доменами указанного полипептида фактора VIII, при том, что указанные два соседние домены выбраны из группы, которая состоит из доменов A1 и A2, из доменов A2 и B, из доменов B и A3, доменов A3 и C1, и доменов C1 и C2; расположение в домене B указанного полипептида фактора VIII, отличающееся тем, что второй XTEN связан с C-концевым концом около аминокислотного остатка с номером от 741 до около 750 и с N-концевым концом аминокислотного остатка с номерами от 1635 до около 1648 последовательности природный фактор VIII; и C-концом указанного полипептида фактора VIII. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения первый XTEN выделяют из второго XTEN с помощью по меньшей мере 10 аминокислот, по меньшей мере 50 аминокислот, по меньшей мере 100 аминокислот, по меньшей мере 200 аминокислот, по меньшей мере 300 аминокислот или по меньшей мере 400 аминокислот. В отдельном варианте осуществления гибридного белка рекомбинантного фактора VIII, который содержит по меньшей мере второй XTEN, необязательно, третий XTEN, необязательно, четвертый XTEN, необязательно, пятый XTEN и, необязательно, шестой XTEN, каждый XTEN имеет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности, по сравнению с XTEN сопоставимой длины, выбранным из группы, которая состоит из последовательностей из табл. 4, табл. 13, табл. 14, табл. 15, табл. 16 и табл. 17, при оптимальном выравнивании. В еще одном дополнительном варианте осуществления гибридного белка рекомбинантного фактора VIII, который содержит по меньшей мере второй XTEN, необязательно, третий XTEN, необязательно, четвертый XTEN, необязательно, пятый XTEN и, необязательно, шестой XTEN, В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения гибридный белок рекомбинантного фактора VIII проявляет конечное время полужизни по меньшей мере около 3 ч, или 4 ч, или 6 ч, или 12 ч, или 13 ч, или 14 ч, или 16 ч, или 24 ч, или 48 ч, или 72 ч, или 96 ч, или 120 ч, или 144 ч, или 7 дней, или 14 дней, или 21 день при введении субъекту, при том, что указанный субъект выбирают из человека и мыши с двумя нокаутированными генами фактора VIII/фактора фон Виллебранда. Дополнительно, в вариантах осуществления настоящего изобретения по данному пункту, гибридный белок проявляет сниженное связывание с анти-фактор VIII антителом или сохраняет более высокую прокоагулянтную активность, или и то и другое, по сравнению с соответствующим фактором VIII, не связанным с XTEN. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения прокоагулянтная активность гибридного белка рекомбинантного фактора VIII составляет на по меньшей мере 30, или 40, 50, 80, 100, 200, 300, 400 или 500% больше прокоагулянтной активности в присутствии анти-FVIII антитела, по сравнению с соответствующим фактором VIII, не связанным с XTEN, если каждый анализируют с помощью in vitro анализа коагулирующей активности. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения сниженное связывание гибридного белка с анти-фактор VIII антителом определяют с использованием Бетезда-анализа, с использованием анти-фактор VIII антитела, выбранного из группы, которая состоит из антител из табл. 10 и поликлонального антитела от пациента с гемофилией A с ингибиторами фактора VIII, отличающегося тем, что сниженное связывание и сохраненная прокоагулянтная активность гибридного белка свидетельствует о более низком титре Бетезда на по меньшей мере около 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 или 200 единиц Бетезда в случае гибридного белка, по сравнению с таковым в случае фактора VIII, не связанного с XTEN.

В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок рекомбинантного фактора VIII может, например, содержать один или несколько XTEN, отличающихся тем, что XTEN имеет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или 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%, до около 100% идентичности последовательности, по сравнению с одним или несколькими XTEN сопоставимой длины, выбранными из табл. 4, 13, 14, 15, 16 и 17, при оптимальном выравнивании. В дополнительных аспектах настоящее изобретение относится к гибридным белкам рекомбинантного фактора VIII, которые содержат FVIII и один или несколько XTEN в специфических конформациях от N- до C-конца. В отдельном варианте осуществления композиции CFXTEN, настоящее изобретение обеспечивает гибридный белок рекомбинантного фактора VIII формулы I:

$$(XTEN)_x\text{-}CF\text{-}(XTEN)_y \qquad I$$

где независимо для каждого случая, CF представляет собой фактор VIII, как определено в данном документе, который содержит последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностями из табл. 1; x представляет собой либо 0, либо

1, а y представляет собой либо 0, либо 1, где x+y≥1; и XTEN представляет собой расширенный рекомбинантный полипептид, как описано в данном документе, который содержит, но без ограничения ими, последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностями, приведенными в табл. 4. Соответственно, композиция слияния CFXTEN может иметь конформации XTEN-CF, XTEN-CF-XTEN или CF-XTEN. В дополнительном варианте осуществления композиции CFXTEN, настоящее изобретение обеспечивает гибридный белок рекомбинантного фактора VIII формулы II:

$$(XTEN)_x\text{-}(S)_x\text{-}(CF)\text{-}(XTEN)_y \qquad II$$

где CF представляет собой фактор VIII, как определено в данном документе, который содержит последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностями, приведенными в табл. 1; S представляет собой спейсерную область, которая имеет от 1 до около 50 аминокислотных остатков, которые могут, необязательно, содержать последовательности расщепления или аминокислоты, совместимые с сайтами рестрикции; x представляет собой либо 0, либо 1, а y представляет собой либо 0, либо 1, где x+y≥1; и XTEN представляет собой расширенный рекомбинантный полипептид, как описано в данном документе, который содержит, но без ограничения ими, последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностями, приведенными в табл. 4.

В дополнительном варианте осуществления композиции CFXTEN, настоящее изобретение обеспечивает гибридный белок рекомбинантного фактора VIII, при том, что гибридный белок имеет формулу III:

$$(XTEN)_x\text{-}(S)_x\text{-}(CF)\text{-}(S)_y\text{-}(XTEN)_y \qquad III$$

где CF представляет собой фактор VIII, как определено в данном документе, который содержит последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностью представленной в табл. 1; S представляет собой спейсерную область, которая имеет от 1 до около 50 аминокислотных остатков, которые могут, необязательно, содержать последовательности расщепления или аминокислоты, совместимые с сайтами рестрикции; x представляет собой либо 0, либо 1, а y представляет собой либо 0, либо 1, где x+y≥1; и XTEN представляет собой расширенный рекомбинантный полипептид, как описано в данном документе, который содержит, но без ограничения ими, последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностями, приведенными в табл. 4.

В дополнительном варианте осуществления композиции CFXTEN настоящее изобретение обеспечивает гибридный белок рекомбинантного фактора VIII формулы IV:

$$(A1)\text{-}(XTEN)_u\text{-}(A2)\text{-}(XTEN)_v\text{-}(B)\text{-}(XTEN)_w\text{-}(A3)\text{-}(XTEN)_x\text{-}(C1)\text{-}(XTEN)_y\text{-}(C2)\text{-}(XTEN)_z \qquad IV$$

где A1 представляет собой домен A1 FVIII; A2 представляет собой домен A2 FVIII; A3 представляет собой домен A3 FVIII; B представляет собой домен B FVIII, который может быть фрагментом или сплайс-вариантом домена B; C1 представляет собой домен C1 FVIII; C2 представляет собой домен C2 FVIII; v представляет собой либо 0, либо 1; w представляет собой либо 0, либо 1; x представляет собой либо 0, либо 1; y представляет собой либо 0, либо 1; y представляет собой либо 0, либо 1 при условии, что u+v+x+y+z≥1; и XTEN представляет собой расширенный рекомбинантный полипептид, как описано в данном документе, который содержит, но без ограничения ими, последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностями, приведенными в табл. 4. В дополнительном варианте осуществления композиции CFXTEN, настоящее изобретение обеспечивает гибридный белок рекомбинантного фактора VIII формулы V:

$$(XTEN)_t\text{-}(S)_a\text{-}(A1)\text{-}(S)_b\text{-}(XTEN)_u\text{-}(S)_b\text{-}(A2)\text{-}(S)_c\text{-}(XTEN)_v\text{-}(S)_c\text{-}(B)\text{-}(S)_d\text{-}(XTEN)_w\text{-}(S)_d\text{-}(A3)\text{-}$$
$$(S)_e\text{-}(XTEN)_x\text{-}(S)_e\text{-}(C1)\text{-}(S)_f\text{-}(XTEN)_y\text{-}(S)_f\text{-}(C2)\text{-}(S)_g\text{-}(XTEN)_z \qquad V$$

где A1 представляет собой домен A1 FVIII; A2 представляет собой домен A2 FVIII; A3 представляет собой домен A3 FVIII; B представляет собой домен B FVIII, который может быть фрагментом или сплайс-вариантом домена B; C1 представляет собой домен C1 FVIII; C2 представляет собой домен C2 FVIII; S представляет собой спейсерную область, которая имеет от 1 до около 50 аминокислотных остат-

ков, которые могут, необязательно, содержать последовательности расщепления или аминокислоты, совместимые с сайтами рестрикции; a представляет собой либо 0, либо 1; b представляет собой либо 0, либо 1; c представляет собой либо 0, либо 1; d представляет собой либо 0, либо 1; e представляет собой либо 0, либо 1; f представляет собой либо 0, либо 1; g представляет собой либо 0, либо 1; t представляет собой либо 0, либо 1; u представляет собой либо 0, либо 1; v представляет собой либо 0, либо 1; w представляет собой 0 или 1, x представляет собой либо 0, либо 1; y представляет собой либо 0, либо 1; z представляет собой либо 0, либо 1 при условии, что t + u + v + w+ x + y + z ≥1; и XTEN представляет собой расширенный рекомбинантный полипептид, как описано в данном документе, который содержит, но без ограничения ими, последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностями, приведенными в табл. 4. В дополнительном варианте осуществления формулы V, спейсерная область представляет собой глицин или последовательность, выбранную из табл. 11 и 12.

В дополнительном варианте осуществления композиции CFXTEN, настоящее изобретение обеспечивает гибридный белок рекомбинантного фактора VIII формулы VI:

$$(XTEN)_u\text{-}(S)_a\text{-}(A1)\text{-}(S)_b\text{-}(XTEN)_v\text{-}(S)_b\text{-}(A2)\text{-}(S)_c\text{-}(XTEN)_w\text{-}(S)_c\text{-}(A3)\text{-}(S)_d\text{-}(XTEN)_x\text{-}(S)_d\text{-}(C1)\text{-}(S)_e\text{-}(XTEN)_y\text{-}(S)_e\text{-}(C2)\text{-}(S)_f\text{-}(XTEN)_z \quad \text{VI}$$

где A1 представляет собой домен A1 FVIII; A2 представляет собой домен A2 FVIII; A3 представляет собой домен A3 FVIII; C1 представляет собой домен C1 FVIII; C2 представляет собой домен C2 FVIII; S представляет собой спейсерную область, которая имеет от 1 до около 50 аминокислотных остатков, которые могут, необязательно, содержать последовательности расщепления или аминокислоты, совместимые с сайтами рестрикции; a представляет собой либо 0, либо 1; b представляет собой либо 0, либо 1; c представляет собой либо 0, либо 1; d представляет собой либо 0, либо 1; e представляет собой либо 0, либо 1; f представляет собой либо 0, либо 1; u представляет собой либо 0, либо 1; v представляет собой либо 0, либо 1; w представляет собой 0 или 1, x представляет собой либо 0, либо 1; y представляет собой либо 0, либо 1; z представляет собой либо 0, либо 1 при условии, что u + v + w+ x + y + z ≥1; и XTEN представляет собой расширенный рекомбинантный полипептид, как описано в данном документе, который содержит, но без ограничения ими, последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностями, приведенными в табл. 4. В дополнительном варианте осуществления формулы V спейсерная область представляет собой глицин или последовательность, выбранную из табл. 11 и 12.

В дополнительном варианте осуществления композиции CFXTEN, настоящее изобретение обеспечивает гибридный белок рекомбинантного фактора VIII формулы VII:

$$(SP)\text{-}(XTEN)_x\text{-}(CS)_x\text{-}(S)_x\text{-}(FVIII\_1\text{-}745)\text{-}(S)_y\text{-}(XTEN)_y\text{-}(S)_y\text{-}(FVIII\_1640\text{-}2332)\text{-}(S)_z\text{-}(CS)_z\text{-}(XTEN)_z \quad \text{VII}$$

где SP представляет собой сигнальную последовательность, предпочтительно, с последовательностью MQIELSTCFFLCLLRFCFS (SEQ ID NO: 1611), CS представляет собой последовательность расщепления, приведенную в табл. 12, S представляет собой спейсерную область, которая имеет от 1 до около 50 аминокислотных остатков, которые могут, необязательно, содержать аминокислоты, совместимые с сайтами рестрикции, "FVIII_1-745" представляет собой остатки 1-745 фактора FVIII и "FVIII_1640-2332" представляет собой остатки 1640-2332 FVIII, x представляет собой либо 0, либо 1, y представляет собой либо 0, либо 1, и z представляет собой либо 0, либо 1, где x+y+z>2; и XTEN представляет собой расширенный рекомбинантный полипептид, как описано в данном документе, который содержит, но без ограничения ими, последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности последовательности, приведенные в табл. 4. В отдельном варианте осуществления формулы VII спейсерная область представляет собой GPEGPS (SEQ ID NO: 1612). В дополнительном варианте осуществления формулы V спейсерная область представляет собой глицин или последовательность, выбранную из табл. 11 и 12.

В дополнительном варианте осуществления композиции CFXTEN, настоящее изобретение обеспечивает гибридный белок рекомбинантного фактора VIII формулы VIII:

$$(A1)\text{-}(S)_a\text{-}(XTEN)_v\text{-}(S)_a\text{-}(A2)\text{-}(B1)\text{-}(S)_b\text{-}(XTEN)_w\text{-}(S)_b\text{-}(B2)\text{-}(A3)\text{-}(S)_c\text{-}(XTEN)_x\text{-}(S)_c\text{-}(C1)\text{-}(S)_d\text{-}(XTEN)_y\text{-}(S)_d\text{-}(C2)\text{-}(S)_e\text{-}(XTEN)_z \quad \text{VIII}$$

где A1 представляет собой домен A1 FVIII; A2 представляет собой домен A2 FVIII; B1 представляет собой фрагмент домена B, который может иметь от остатка 741 до 743-750 FVIII или, альтернативно, от около остатка 741 до около остатков 745 FVIII; B2 представляет собой фрагмент домена B, который может иметь от остатков 1635-1686 до 1689 FVIII или, альтернативно, от около остатка 1640 до около остатков 1689 FVIII; A3 представляет собой домен A3 FVIII; C1 представляет собой домен C1 FVIII; C2

представляет собой домен C2 FVIII; S представляет собой спейсерную область, которая имеет от 1 до около 50 аминокислотных остатков, которые могут, необязательно, содержать последовательность(и) расщепления или аминокислоты, совместимые с сайтами рестрикции; a представляет собой либо 0, либо 1; b представляет собой либо 0, либо 1; c представляет собой либо 0, либо 1; d представляет собой либо 0, либо 1; e представляет собой либо 0, либо 1; f представляет собой либо 0, либо 1; u представляет собой либо 0, либо 1; v представляет собой либо 0, либо 1; w представляет собой 0 или 1, x представляет собой либо 0, либо 1; y представляет собой либо 0, либо 1; z представляет собой либо 0, либо 1 при условии, что u + v + w+ x + y + z ≥1; и XTEN представляет собой расширенный рекомбинантный полипептид, как описано в данном документе, который содержит, но без ограничения ими, последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностями, приведенными в табл. 4. В отдельном варианте осуществления формулы VIII спейсерная область представляет собой GPEGPS (SEQ ID NO: 1612). В дополнительном варианте осуществления формулы V спейсерная область представляет собой глицин или последовательность, выбранную из табл. 11 и 12. В дополнительном варианте осуществления композиции CFXTEN, настоящее изобретение обеспечивает гибридный белок рекомбинантного фактора VIII формулы IX:

$$(A1_N)\text{-}(S)_a\text{-}(XTEN)_t\text{-}(S)_b\text{-}(A1_C)\text{-}(A2_N)\text{-}(S)_c\text{-}(XTEN)_u\text{-}(S)_d\text{-}(A2_C)\text{-}(B_N)\text{-}(S)_e\text{-}(XTEN)_v\text{-}(S)_f\text{-}(B_C)\text{-}$$
$$(A3_N)\text{-}(S)_g\text{-}(XTEN)_w\text{-}(S)_h\text{-}(A3_C)\text{-}(C1_N)\text{-}(S)_i\text{-}(XTEN)_x\text{-}(S)_j\text{-}(C1_C)\text{-}(C2_N)\text{-}(S)_k\text{-}(XTEN)_y\text{-}(S)_l\text{-}$$
$$(C2_C)\text{-}(S)_m\text{-}(XTEN)_z \quad \text{IX}$$

где $A1_N$ представляет собой фрагмент домена A1 от остатка с номером по меньшей мере 1 (нумерация относительно нативной, зрелой FVIII) до остатка с номером не более чем 371, $A1_c$ представляет собой фрагмент домена A1 от остатка с номером по меньшей мере 2 до остатка с номером не более чем 372, с условием, что последовательность фрагмента $A1_N$, дублирующаяся в $A1_c$, не является фрагментом; $A2_N$ представляет собой фрагмент домена A2 от остатка с номером по меньшей мере 373 до остатка с номером не более чем 739, $A2_c$ представляет собой фрагмент домена A2 от остатка с номером по меньшей мере 374 до остатка с номером не более чем 740, с условием, что последовательность фрагмента $A2_N$, дублирующаяся в $A2_c$, не является фрагментом; B_N представляет собой фрагмент домена B от остатка с номером по меньшей мере 741 до остатка с номером не более чем 1647, B_c представляет собой фрагмент домена B от остатка с номером по меньшей мере 742 до остатка с номером не более чем 1648, с условием, что по последовательность B_N фрагмент дублируется в B_c, не является фрагментом; $A3_N$ представляет собой фрагмент домена A3 от остатка с номером по меньшей мере 1649 до остатка с номером не более чем 2019, $A3_c$ представляет собой фрагмент домена A3 от остатка с номером по меньшей мере 1650 до остатка с номером не более чем 2019, с условием, что последовательность фрагмента $A3_N$, дублирующаяся в $A3_c$, не является фрагментом; $C1_N$ представляет собой фрагмент домена C1 от остатка с номером по меньшей мере 2020 до остатка с номером не более чем 2171, $C1_c$ представляет собой фрагмент домена C1 от остатка с номером по меньшей мере 2021 до остатка с номером не более чем 2172, с условием, что последовательность фрагмента $C1_N$, дублирующаяся в $C1_c$, не является фрагментом; $C2_N$ представляет собой фрагмент домена C2 от остатка с номером по меньшей мере 2173 до остатка с номером не более чем 2331, C2c представляет собой фрагмент домена C2 от остатка с номером по меньшей мере 2174 до остатка с номером не более чем 2332, с условием, что последовательность фрагмента $C2_N$, дублирующаяся в $C2_c$, не является фрагментом; S представляет собой спейсерную область, которая имеет от 1 до около 50 аминокислотных остатков, которые могут, необязательно, содержать последовательности расщепления или аминокислоты, совместимые с сайтами рестрикции; a представляет собой либо 0, либо 1; b представляет собой либо 0, либо 1; c представляет собой либо 0, либо 1; d представляет собой либо 0, либо 1; e представляет собой либо 0, либо 1; f представляет собой либо 0, либо 1; g представляет собой либо 0, либо 1; h представляет собой либо 0, либо 1; i представляет собой либо 0, либо 1; j представляет собой либо 0, либо 1; k представляет собой либо 0, либо 1; l представляет собой либо 0, либо 1; m представляет собой либо 0, либо 1; t представляет собой либо 0, либо 1; u представляет собой либо 0, либо 1; v представляет собой либо 0, либо 1; w представляет собой 0 или 1, x представляет собой либо 0, либо 1; y представляет собой либо 0, либо 1; z представляет собой либо 0, либо 1 при условии, что t + u + v + w+ x + y + z ≥1; и XTEN представляет собой расширенный рекомбинантный полипептид, как описано в данном документе, который содержит, но без ограничения ими, последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или 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%, до около 100% идентичности последовательности, по сравнению с одним или несколькими XTEN сопоставимой длины, выбранной из табл. 4. В отдельном варианте осуществления формулы IX спейсерная область представляет собой GPEGPS (SEQ ID NO: 1612). В дополнительном варианте осуществления формулы V спейсерная область представляет собой глицин или последовательность, выбранную из табл. 11 и 12. В дополнительном варианте осуществления формулы IX, Z представляет собой 1. В дополнительном варианте осуществления гибридного белка формулы IX V представляет собой 1 и XTEN

связан с С-концевым концом аминокислотного остатка с номером от около 741 до около 750 и с N-концевым концом аминокислотного остатка с номерами от 1635 до около 1648 по отношению к непроцессированной последовательности фактора VIII человека, как проиллюстрировано на фиг. 3. В дополнительном варианте осуществления гибридного белка формулы IX, сумма t, u, v, w, x, y и z эквивалентна 2, 3, 4, 5 или 6. В дополнительном варианте осуществления формулы IX сумма t, u, v, w, x, y и z эквивалентна 2, v представляет собой 1 и z представляет собой 1. В дополнительном варианте осуществления гибридного белка формулы IX сумма t, u, v, w, x, y и z эквивалентна 3, каждый из v и z эквивалентен 1, и либо t, u, w, x, либо y представляет собой 1. В дополнительном варианте осуществления формулы IX сумма t, u, v, w, x, y и z эквивалентна 4, каждый из v, w и z эквивалентен 1, и два из t, u, x или y представляют собой 1. В дополнительном варианте осуществления гибридного белка формулы IX суммарная длина XTEN составляет от около 84 до около 3000 аминокислотных остатков. В дополнительном варианте осуществления формулы IX по меньшей мере один XTEN является вводимым непосредственно в прямом направлении от аминокислот, которые соответствуют аминокислоте в зрелом природном факторе VIII человека, выбранном из группы, которая состоит из аминокислотных остатком с номером 32, 220, 224, 336, 339, 399, 416, 603, 1656, 1711, 1725, 1905 и 1910. В дополнительном варианте осуществления гибридного белка формулы IX, каждый XTEN связан с указанным гибридным белком в пределах сайтов, выбранных из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9. В дополнительном варианте осуществления гибридного белка формулы IX, каждый XTEN имеет по меньшей мере около 80%, или около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или около 100% идентичности последовательности, по сравнению с XTEN сопоставимой длины, выбранным из группы, которая состоит из последовательностей из табл. 4, 13, 14, 15, 16 и 17, при оптимальном выравнивании.

В дополнительном варианте осуществления композиции CFXTEN, настоящее изобретение обеспечивает первый рекомбинантный полипептид фактора VIII формулы X:

(A1) – a1 – (A2) – a2 – [B] X

и второй полипептид, который содержит формулу XI:

a3 – (A3) – (C1) - (C2) XI

где первый полипептид и второй полипептид являются слитыми или существуют в виде гетеродимера; где A1 представляет собой домен A1 фактора VIII; A2 представляет собой домен A2 фактора VIII; [B] представляет собой домен B фактора VIII, их фрагмент, или удаляется; A3 представляет собой домен A3 фактора VIII; C1 представляет собой домен C1 фактора VIII; C2 представляет собой домен C2 фактора VIII; a1, a2 и a3 представляют собой кислые участки-спейсеры; где домен A1 содержит область петли XTEN, доступной для встраивания-1 (A1-1), и область петли XTEN, доступной для встраивания-2 (A1-2); где домен A2 содержит область петли XTEN, доступной для встраивания-1 (A2-1), и область петли XTEN, доступной для встраивания-2 (A2-2); где домен A3 содержит область петли XTEN, доступной для встраивания-1 (A3-1), и область петли XTEN, доступной для встраивания-2 (A3-2); где последовательность XTEN вводят в по меньшей мере одну из областей A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 или A3-2; и при том, что рекомбинантный протеин фактора VIII проявляет прокоагулянтную активность. В отдельном варианте осуществления гетеродимера первый полипептид и второй полипептид из одной полипептидной цепи содержат формулу (A1) - a1 - (A2) - a2 - [B] -[a3] - (A3) - (C1) - (C2). В отдельном варианте осуществления вышеизложенного "слитый" означает пептидную связь.

В дополнительном варианте осуществления композиции CFXTEN, настоящее изобретение обеспечивает первый рекомбинантный полипептид фактора VIII формулы X:

(A1) – a1 – (A2) – a2 – [B] X

и второй полипептид, который содержит формулу XI:

a3 – (A3) – (C1) - (C2) XI

где первый полипептид и второй полипептид являются слитыми или существуют в виде гетеродимера; где A1 представляет собой домен A1 фактора VIII; A2 представляет собой домен A2 фактора VIII; [B] представляет собой домен B фактора VIII, их фрагмент, или удаляется; A3 представляет собой домен A3 фактора VIII; C1 представляет собой домен C1 фактора VIII; C2 представляет собой домен C2 фактора VIII; a1, a2 и a3 представляют собой кислые участки-спейсеры; где последовательность XTEN вводят в a3; и где рекомбинантный протеин фактора VIII проявляет прокоагулянтную активность. В отдельном варианте осуществления гетеродимера, первый полипептид и второй полипептид из одной полипептидной цепи содержат формулу (A1) - a1 - (A2) - a2 - [B] -[a3] - (A3) - (C1) - (C2). В отдельном варианте осуществления вышеизложенного, "слитый" означает пептидную связь.

В вариантах осуществления вышеизложенных формул полипептиды X и XI, петли XTEN, доступные для встраивания, содержатся в пределах конформационно-лабильных петлеобразных структур с открытой поверхностью, и, отличаются тем, что A1-1 расположен между бета-тяжем 1 и бета-тяжем 2, A1-2 расположен между бета-тяжем 11 и бета-тяжем 12, A2-1 расположен между бета-тяжем 22 и бета-тяжем 23, A2-2 расположен между бета-тяжем 32 и бета-тяжем 33, A3-1 расположен между бета-тяжем

38 и бета-тяжем 39, A3-2 расположен между бета-тяжем 45 и бета-тяжем 46, в соответствии с вторичной структурой зрелого фактора VIII, которую сохраняют с учетным номером 2R7E базы данных DSSP. В дополнительных вариантах осуществления вышеизложенных формул полипептидов X и XI конформационно-лабильная петлеобразная структура с открытой поверхностью, которая содержит A1-1, соответствует области в природном зрелом факторе VIII человека от аминокислоты около 15 до аминокислоты около 45. В дополнительных вариантах осуществления вышеизложенных формул полипептидов X и XI A1-1 соответствует области в природном зрелом факторе VIII человека от около аминокислоты 18 до около аминокислоты 41. В дополнительных вариантах осуществления вышеизложенных формул полипептидов X и XI конформационно-лабильная петлеобразная структура с открытой поверхностью, которая содержит A1-2, соответствует области в природном зрелом факторе VIII человека от около аминокислоты 201 до около аминокислоты 232. В дополнительных вариантах осуществления вышеизложенных формул полипептидов X и XIA1-2 соответствует области в природном зрелом факторе VIII человека от около аминокислоты 218 до около аминокислоты 229. В дополнительных вариантах осуществления вышеизложенных формул полипептидов X и XI конформационно-лабильная петлеобразная структура с открытой поверхностью, которая содержит A2-1, соответствует области в природном зрелом факторе VIII человека от около аминокислоты 395 до около аминокислоты 421. В дополнительных вариантах осуществления вышеизложенных формул полипептидов X и XI A2-1 соответствует области в природном зрелом факторе VIII человека от около аминокислоты 397 до около аминокислоты 418. В дополнительных вариантах осуществления вышеизложенных формул полипептидов X и XI конформационно-лабильная петлеобразная структура с открытой поверхностью, которая содержит A2-2, соответствует области в природном зрелом факторе VIII человека от около аминокислоты 577 до около аминокислоты 635. В дополнительных вариантах осуществления вышеизложенных формул полипептидов X и XI A2-2 соответствует области в природном зрелом факторе VIII человека от около аминокислоты 595 до около аминокислоты 607. В дополнительных вариантах осуществления вышеизложенных формул полипептидов X и XI конформационно-лабильная петлеобразная структура с открытой поверхностью, которая содержит A3-1, соответствует области в природном зрелом факторе VIII человека от около аминокислоты 1705 до около аминокислоты 1732. В дополнительных вариантах осуществления вышеизложенных формул полипептидов X и XI A3-1 соответствует области в природном зрелом факторе VIII человека от около аминокислоты 1711 до около аминокислоты 1725. В дополнительных вариантах осуществления вышеизложенных формул полипептидов X и XI конформационно-лабильная петлеобразная структура с открытой поверхностью, которая содержит A3-2, соответствует области в природном зрелом факторе VIII человека от около аминокислоты 1884 до около аминокислоты 1917. В дополнительных вариантах осуществления вышеизложенных формул полипептидов X и XI A3-2 соответствует области в природном зрелом факторе VIII человека от около аминокислоты 1899 до около аминокислоты 1911. В дополнительных вариантах осуществления вышеизложенных формул полипептидов X и XI последовательность XTEN вводят в по меньшей мере две из областей A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 или A3-2. В дополнительных вариантах осуществления вышеизложенных формул полипептидов X и XI последовательность XTEN вводят непосредственно в прямом направлении от аминокислот, которые соответствуют аминокислоте в зрелом природном факторе VIII человека, выбранном из группы, которая состоит из аминокислотного остатка с номером 32, 220, 224, 336, 339, 399, 416, 603, 1656, 1711, 1725, 1905 и 1910. В дополнительных вариантах осуществления вышеизложенных формул полипептидов X и XI, в кислый участок-спейсер a3 вводят дополнительную последовательность XTEN. В дополнительных вариантах осуществления вышеизложенных формул полипептидов X и XI в дополнительную последовательность XTEN непосредственно в кислый спейсер a3 в прямом направлении вводят аминокислоту, которая соответствует аминокислоте 1656. В дополнительных вариантах осуществления вышеизложенных формул полипептидов X и XI домен A1 содержит область петли XTEN, доступной для встраивания-1 (A1-1), и область петли XTEN, доступной для встраивания-2 (A1-2), отличающуюся тем, что домен A2 содержит область петли XTEN, доступной для встраивания-1 (A2-1), и область петли XTEN, доступной для встраивания-2 (A2-2), и отличающейся тем, что домен A3 содержит область петли XTEN, доступной для встраивания-1 (A3-1), и область петли XTEN, доступной для встраивания-2 (A3-2), и отличающуюся тем, что дополнительную последовательность XTEN вводят в по меньшей мере одну из областей A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 или A3-2. В дополнительных вариантах осуществления вышеизложенных формул полипептидов X и XI в дополнительную последовательность XTEN непосредственно в прямом направлении вводят аминокислоту, которая соответствует аминокислоте в зрелом природном факторе VIII человека, выбранной из группы, которая состоит из аминокислотного остатка с номером 32, 220, 224, 336, 339, 390, 399, 416, 603, 1656, 1711, 1725, 1905 и 1910. В предыдущих вариантах осуществления формул полипептидов X и XI гибридный белок проявляет по меньшей мере около 30, 40, 50, 60, 70, или 80, или 90% прокоагулянтной активности соответствующего фактора VIII, не связанного с XTEN, отличающегося тем, что прокоагулянтную активность анализируют с помощью in vitro анализа коагулирующей активности.

Во всех вариантах осуществления настоящего изобретения полипептид может, например, проявлять in vitro прокоагулянтную активность, которая превышает 0,5 МЕ/мл, или 1,0, или 1,5, или 2,0 МЕ/мл, если экспрессируют в среде культуры клеток и анализируют с помощью in vitro анализа коагулирующей

активности. Прокоагулянтную активность могут измерять с помощью хромогенного анализа, одноэтапного анализа коагулирующей активности (например, aPTT), или их обоих.

В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения, отличающихся тем, что гибридный белок рекомбинантного фактора VIII содержит фактор VIII и по меньшей мере первый и второй XTEN, с помощью по меньшей мере 10 аминокислот, по меньшей мере 50 аминокислот, по меньшей мере 100 аминокислот, по меньшей мере 200 аминокислот, по меньшей мере 300 аминокислот, или по меньшей мере 400 аминокислот выделяют по меньшей мере первый XTEN из по меньшей мере второго XTEN.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения гибридный белок рекомбинантного фактора VIII, который содержит фактор VIII, по меньшей мере первый XTEN и, необязательно, по меньшей мере второй, или, необязательно, по меньшей мере третий, или, необязательно, по меньшей мере четвертый XTEN, гибридный белок проявляет сниженное связывание с анти-фактор VIII антителом, по сравнению с соответствующим фактором VIII, не связанным с XTEN. Сниженное связывание оценивают с помощью либо in vivo, либо in vitro анализа. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения in vitro анализ представляет собой анализ ELISA, при том, что связывание анти-FVIII антитела с гибридным белком снижено на по меньшей мере около 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35% или по на меньшей мере около 40% или более, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения in vitro анализ представляет собой Бетезда-анализ, при том, что о сниженном связывании гибридного белка свидетельствует более низкий титр Бетезда на по меньшей мере около 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 100 или 200 единиц Бетезда в случае гибридного белка, по сравнению с таковым в случае фактора VIII, не связанного с XTEN. В in vitro анализах, анти-фактор VIII антитело выбирают из антитела из табл. 10 и поликлонального антитела от пациента с гемофилией A с ингибиторами фактора VIII. В конкретных вариантах осуществления гибридного белка рекомбинантного фактора VIII, который содержит фактор VIII и по меньшей мере первый и второй XTEN, который демонстрирует сниженное связывание с антителом ингибитора фактора VIII, первый XTEN связан с указанным полипептидом фактора VIII в домене C2 указанного полипептида фактора VIII, и второй XTEN связан с указанным полипептидом фактора VIII в пределах домена A1 или A2 указанного полипептида фактора VIII, отличающегося тем, что указанный гибридный белок проявляет сниженное связывание с антителом ингибитора фактора VIII, по сравнению с соответствующим фактором VIII, не связанным с XTEN, при том, что антитело ингибитора фактора VIII способен связываться с эпитопом, который располагается в пределах домена A1, A2 или C2, и, кроме того, при том, что гибридный белок проявляет прокоагулянтную активность. В отдельном варианте осуществления вышеизложенного гибридного белка второй XTEN связан с указанным полипептидом фактора VIII в домене A2 полипептида фактора VIII и антитело ингибитора фактора VIII связано с доменом A2 полипептида фактора VIII. В дополнительном варианте осуществления вышеизложенного гибридного белка второй XTEN связан с указанным полипептидом фактора VIII в домене C2 полипептида фактора VIII и антитело ингибитора фактора VIII связано с доменом C2 полипептида фактора VIII. Связывание анти-фактор VIII антитела с гибридным белком снижается на по меньшей мере около 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% или 40%, по сравнению с соответствующим фактором VIII, не связанным с XTEN, при условии, что анализируют с помощью анализа ELISA, при том, что анти-фактор VIII антитело выбирают из группы, которая состоит из антител в табл. 10 и поликлонального антитела субъекта с гемофилией A с ингибиторами фактора VIII. Предыдущие гибридные белки могут дополнительно содержать по меньшей мере три XTEN, отличающиеся тем, что по меньшей мере третий XTEN связан с фактором VIII в пределах сайта, выбранного в пределах или заменяющего домен B, на C-конце, и в, или в пределах, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислот инсерционного сайта, выбранного из табл. 7 или табл. 9. В вариантах осуществления со сниженным связыванием с анти-фактор VIII антителом гибридный белок имеет более высокую прокоагулянтную активность в присутствии анти-FVIII антитела на по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 200, 300, 400 или 500% или более, по сравнению с соответствующим фактором VIII, не связанным с XTEN, если анализируют с помощью in vitro анализа коагулирующей активности (например, хромогенный или одноэтапный анализ коагулирующей активности).

Во всех вариантах осуществления настоящего изобретения XTEN гибридного белка может, например, отличаться тем, что XTEN содержит по меньшей мере 36, или по меньшей мере 42, или по меньшей мере 72, или по меньшей мере 96, или по меньшей мере 144, или по меньшей мере 288, или по меньшей мере 400, или по меньшей мере 500, или по меньшей мере 576, или по меньшей мере 600, или по меньшей мере 700, или по меньшей мере 800, или по меньшей мере 864, или по меньшей мере 900, или по меньшей мере 1000, или по меньшей мере 2000 или до около 3000 аминокислотных остатков или даже больше остатков; сумма остатков глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P) составляет по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% от общего количества аминокислотных остатков XTEN; XTEN является по существу неповторяющимся так, что (i) XTEN не содержит три смежные аминокислоты, которые являются идентичными, если аминокислоты представляют собой не серин; (ii) по меньшей мере около 80% последовательности XTEN состоит из неперекрывающихся мотивов последовательно-

стей, каждый из мотивов последовательностей содержит от около 9 до около 14 или около 12 аминокислотных остатков, которые состоят из от четырех до шести аминокислот, выбранных из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), отличающихся тем, что любые два смежных аминокислотных остатка встречаются не более чем два раза в каждом из неперекрывающихся мотивов последовательностей; или (iii) последовательность XTEN имеет количество подпоследовательностей менее 10; XTEN имеет выше 90%, или выше 95%, или выше 99% образования случайной спирали, что определяют с помощью алгоритма GOR; XTEN имеет менее 2% альфа-спиралей и 2% бета-листов что определяют с помощью алгоритма Chou-Fasman; XTEN нуждается в прогнозируемом T-клеточном эпитопе, если анализируют с помощью алгоритма TEPITOPE, отличающегося тем, что пороговая величина TEPITOPE в случае указанного прогноза с применением указанного алгоритма, имеет порог -9, и при этом указанный гибридный белок проявляет конечное время полужизни, которое является более продолжительным, чем по меньшей мере около 12 ч, или по меньшей мере около 24 ч, или по меньшей мере около 48 ч, или по меньшей мере около 72 ч, или по меньшей мере около 96 ч, или по меньшей мере около 120 ч, или по меньшей мере около 144 ч, или по меньшей мере около 21 день или больше. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок рекомбинантного фактора VIII содержит по меньшей мере второй, или по меньшей мере третий, или по меньшей мере четвертый XTEN, который может быть идентичным или отличаться от других XTEN. В соответствии с другим подходом, по меньшей мере каждый первый, по меньшей мере второй, или по меньшей мере третий, или по меньшей мере четвертый XTEN гибридного белка CFXTEN имеет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или 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%, до около 100% идентичности последовательности, по сравнению с одним или несколькими XTEN сопоставимой длины, выбранными из табл. 4, табл. 13, табл. 14, табл. 15, табл. 16 и табл. 17, при оптимальном выравнивании. В еще одном отличающимся подходе по меньшей мере каждый первый, по меньшей мере второй, или по меньшей мере третий, или по меньшей мере четвертый XTEN гибридного белка CFXTEN имеет по меньшей мере 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 до около 100% идентичности последовательности, по сравнению с последовательностью, выбранной из AE42_1, AE42_2, AE42_3, AG42_1, AG42_2, AG42_3, AG42_4, AE144_1A, AE144_2A, AE144_2B, AE144_3A, AE144_3B, AE144_4A, AE144_4B, AE144_5A, AE144_6B, AG144_1, AG144_2, AG144_A, AG144_B, AG144_C, AG144_F, AG144_3, AG144_4, AE288_1, AE288_2, AG288_1 и AG288_2.

В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения компонент фактора VIII гибридного белка CFXTEN рекомбинантного фактора VIII содержит одну, две или три аминокислотные замены, выбранные из остатков R1648, Y1680 и R1689, нумерация относительно зрелого фактора VIII человека, отличающегося тем, что замены выбирают из аланина, глицина и фенилаланина. Неограничивающие примеры указанных замен содержат R1648A, Y1680F, и R1689A.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок CFXTEN демонстрирует коэффициент средней молекулярной массы по меньшей мере около 1,3, или по меньшей мере около двух, или по меньшей мере около трех, или по меньшей мере около четырех, или по меньшей мере около пяти, или по меньшей мере около шести, или по меньшей мере около семи, или по меньшей мере около восьми, или по меньшей мере около девяти, или по меньшей мере около 10, при измерении с помощью гель-проникающей хроматографии или сопоставимого способа.

В отдельных вариантах осуществления гибридного белка CFXTEN, один или несколько XTEN присоединены к FVIII посредством одной или двух расщепленных последовательностей, каждая из которых расщепляется с помощью протеазы млекопитающего, выбранной из группы, которая состоит из фактора XIa, фактора XIIa, калликреина, фактора VIIa, фактора IXa, фактора Xa, фактора IIa (тромбина), эластазы-2, MMP-12, MMP13, MMP-17 и MMP-20, при том, что расщепление в расщепленной последовательности с помощью протеазы млекопитающего высвобождает фактор VIII последовательности из последовательности XTEN, и при этом высвобожденная последовательность фактора VIII проявляет повышение прокоагулянтной активности, по сравнению с нерасщепленным гибридным белком. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения последовательность(и) расщепления расщепляются с помощью фактора XIa.

В соответствии с другим подходом, гибридные белки CFXTEN содержат по меньшей мере три XTEN, расположенные в различных локализациях полипептида фактора VIII, при том, что указанные различные локализации выбирают из: расположение вставки в или в пределах от 1 до 6 аминокислот от сайта, выбранного из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9; расположение в, или в пределах, от 1 до 6 аминокислот аминокислотного остатка 32, 220, 224, 336, 339, 390, 399, 416, 603, 1656, 1711, 1725, 1905 и 1910 зрелого фактора VIII; расположение между любыми двумя соседними доменами в последовательностях фактора VIII, при том, что указанные два соседние домены выбирают из группы, которая состоит из A1 и A2, A2 и B, B и A3, A3 и C1, и C1 и C2; расположение в пределах внутриклональной делеции домена B начинается с первого положения от аминокислотного остатка с номером около 741 до около 750 и заканчивается на втором положении на аминокислотном остатке с номером 1635 до около 1648, по

отношению к непроцессированной последовательности фактора VIII человека, как проиллюстрировано на фиг. 3 и С-конец последовательности фактора VIII, при том, что суммарная длина нескольких XTEN составляет по меньшей мере от около 100 до около 3000 аминокислотных остатков и при этом гибридный белок сохраняет по меньшей мере около 30%, или около 40%, или около 50%, или около 60%, или около 70%, или около 80%, или около 90% прокоагулянтной активности, по сравнению с соответствующим фактором VIII, не связанным с XTEN, при том, что прокоагулянтную активность анализируют с помощью in vitro анализа коагулирующей активности. В отдельном варианте осуществления вышеизложенного гибридный белок проявляет пролонгированное конечное время полужизни при введении субъекту, по сравнению с соответствующим полипептидом фактора VIII, который испытывает недостаток указанного XTEN, при том, что указанный гибридный белок проявляет конечное время полужизни по меньшей мере около 3 ч, или 4 ч, или 6 ч, или 12 ч, или 13 ч, или 14 ч, или 16 ч, или 24 ч, или 48 ч, или 72 ч, или 96 ч, или 120 ч, или 144 ч, или 7 дней, или 14 дней, или 21 день при введении субъекту. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения субъект выбирают из группы, которая состоит из человека и мыши с двумя нокаутированными генами фактора VIII/фактора фон Виллебранда. В отдельном варианте осуществления вышеизложенного, гибридный белок не содержит последовательность, выбранную из GTPGSGTASSSP (SEQ ID NO: 31), GSSTPSGATGSP (SEQ ID NO: 32), GSSPSASTGTGP (SEQ ID NO: 33), GASPGTSSTGSP (SEQ ID NO: 34), и GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSTEPSEGSAP (SEQ ID NO: 59).

В дополнительном варианте осуществления вышеизложенного, гибридный белок не содержит последовательности XTEN, которые состоят из GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSTEPSEGSAP (SEQ ID NO: 59), PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSS (SEQ ID NO: 71), или PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSS PSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS (SEQ ID NO: 80).

В дополнительном аспекте настоящее изобретение имеет отношение к гибридным белкам CFXTEN с улучшенными фармакокинетическими свойствами, которые содержат улучшенные параметры, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, при том, что улучшенные свойства содержат, но без ограничения ими, более продолжительное конечное время полужизни, большую площадь под кривой, увеличенное время, в течение которого концентрация в крови остается в пределах терапевтического окна, увеличенное время между последовательными дозами приводит к концентрациям в крови в пределах терапевтического окна, и уменьшенной дозе в МЕ в течение времени, за которое вводят, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, и все еще приводит к концентрации в крови выше пороговой концентрации, необходимой для прокоагулирующего эффекта. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения гибридные белки CFXTEN проявляют пролонгированное конечное время полужизни при введении субъекту, по сравнению с соответствующим полипептидом фактора VIII, который испытывает недостаток указанного XTEN. Субъект может быть человеком или мышью, таким как мышь с двумя нокаутированными генами фактора VIII/фактора фон Виллебранда. В отдельном варианте осуществления вышеизложенного, CFXTEN при введении субъекту проявляет конечное время полужизни, которое составляет по меньшей мере около двукратно, или около трехкратно, или около четырехкратно, или около пятикратно, или около 10-кратно или около 20-кратно более продолжительное, по сравнению с соответствующим фактором VIII, не связанным с XTEN. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок CFXTEN проявляет конечное время полужизни по меньшей мере около 3 ч, или 4 ч, или 6 ч, или 12 ч, или 13 ч, или 14 ч, или 16 ч, или 24 ч, или 48 ч, или 72 ч, или 96 ч, или 120 ч, или 144 ч, или 7 дней, или 14 дней или 21 день при введении субъекту. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения улучшенное фармакокинетическое свойство гибридных белков по варианту осуществления настоящего изобретения является свойством поддержания циркулирующей концентрации в крови прокоагулирующего гибридного белка у субъекта, который нуждается в этом, выше пороговой концентрации 0,01 МЕ/мл, или 0,05 МЕ/мл, или 0,1 МЕ/мл, или 0,2 МЕ/мл, или 0,3 МЕ/мл, или 0,4 МЕ/мл или 0,5 МЕ/мл в течение периода, который является по меньшей мере около двукратно, или по меньшей мере около трехкратно, или по меньшей мере около четырехкратно, или по

меньшей мере около пятикратно, или по меньшей мере около шестикратно, или по меньшей мере в около восемь раз, или по меньшей мере в около десять раз, или по меньшей мере около 20-кратно, или по меньшей мере около 40-кратно, или по меньшей мере около 60-кратно более продолжительным, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN, и вводят субъекту в сопоставимой дозе. Повышение времени полужизни и времени, проведенного выше пороговой концентрации, позволяет использовать менее частое дозирование и уменьшенные количества гибридного белка (в эквиваленте вещества), которое вводят субъекту, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения введение заявленного гибридного белка субъекту с использованием терапевтически-эффективного режима дозирования приводит к выигрышу во времени по меньшей мере в два раза, или по меньшей мере в три раза, или по меньшей мере в четыре раза, или по меньшей мере в пять раз, или по меньшей мере в шесть раз, или по меньшей мере в восемь раз, или по меньшей мере в 10 раз, или по меньшей мере в около 20 раз, или по меньшей мере в около 40 раз, или по меньшей мере в около 60 раз или более между по меньшей мере двумя последовательными пиками Смакс и/или самыми низкими точками Смин в случае уровней гибридного белка в крови, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN, и вводят субъекту с использованием аналогичного режима дозирования.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения гибридные белки CFXTEN сохраняют по меньшей мере около 30%, или около 40%, или около 50%, или около 60%, или около 70%, или около 80% или около 90% прокоагулянтной активности, по сравнению с соответствующим фактором VIII, не связанным с XTEN, при том, что прокоагулянтную активность анализируют с помощью in vitro анализа коагулирующей активности, такого как, но без ограничения ими, хромогенный анализ или одно- или двухэтапный анализ коагулирующей активности.

В соответствии с другим подходом настоящее изобретение обеспечивает гибридные белки рекомбинантного фактора VIII, которые содержат полипептид фактора VIII и по меньшей мере один расширенный рекомбинантный полипептид (XTEN), при том, что указанный полипептид фактора VIII содержит домен A1, домен A2, домен A3, домен C1, домен C2 и, необязательно, весь, или его часть, домен B, и при этом указанный по меньшей мере один XTEN связан с указанным полипептидом фактора VIII в инсерционном сайте, выбранном из остатка с номерами 18-32, или 40, или 211-224, или 336-403, или 599, или 745-1640, или 1656-1728, или 1796-1804, или 1900-1912, или 2171-2332; и при этом гибридный белок сохраняет по меньшей мере около 30%, или около 40%, или около 50%, или около 60%, или около 70%, или около 80% или около 90% прокоагулянтной активности, по сравнению с соответствующим фактором VIII, не связанным с XTEN. В отдельном варианте осуществления вышеизложенного гибридный белок содержит по меньшей мере второй XTEN, или по меньшей мере третий, или по меньшей мере четвертый XTEN, при том, что XTEN связан с фактором VIII в пределах сайта или в пределах 1-6 аминокислот сайта, выбранного из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает гибридный белок рекомбинантного фактора VIII, который дополнительно содержит по меньшей мере второй XTEN, или по меньшей мере третий, или по меньшей мере четвертый XTEN, связанный с указанным полипептидом FVIII в пределах инсерционного сайта, выбранного из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8, табл. 9, в или в пределах 6 аминокислот к стороне N- или C-конца расположения вставки в одной или нескольких расположениях вставки с фиг. 8 и в пределах одного или нескольких диапазонов вставки с фиг. 9, при том, что по меньшей мере два XTEN разделяют аминокислотной последовательностью по меньшей мере от 100 до около 400 аминокислот.

Настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, при том, что XTEN имеет пределы отношения XTEN по меньшей мере 2,3 или по меньшей мере 2,5, и разделяют аминокислотной последовательностью из по меньшей мере около 20 аминокислотных остатков, или по меньшей мере около 50, или по меньшей мере около 100, или по меньшей мере около 200, или по меньшей мере около 300, или по меньшей мере около 400 аминокислотных остатков. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения CFXTEN составляет по меньшей мере четыре XTEN, при том, что имеет пределы отношения XTEN по меньшей мере 2,3, или по меньшей мере 2,5, или по меньшей мере 2,8, и при том, что по меньшей мере три из четырех XTEN, связанных с гибридным белком, разделяют аминокислотной последовательностью из по меньшей мере около 20 аминокислотных остатков, или по меньшей мере около 50, или по меньшей мере около 100, или по меньшей мере около 200, или по меньшей мере около 300, или по меньшей мере около 400 аминокислотных остатков, и четвертый XTEN связан в домене B (или его фрагменте) или в пределах домена C (или их конца).

В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения заявленные композиции выполнены для того, чтобы иметь сниженную аффинность связывания в случае рецептора выведения у субъекта, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок CFXTEN проявляет аффинность связывания в случае рецептора выведения FVIII в пределах около 0,01%-30%, или от около 0,1% до около 20%, или от около 1% до около 15%, или от около 2% до около 10% аффинности связывания соответствующего FVIII, не связанного с XTEN. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок со сниженной аффинностью в случае рецептора выведения имеет сниженное активное выведение и соот-

ветствующее повышение времени полужизни по меньшей мере в около 2 раза, или в 3 раза, или по меньшей мере в 4 раза, или по меньшей мере в около 5 раз, или по меньшей мере в около 6 раз, или по меньшей мере в около 7 раз, или по меньшей мере в около 8 раз, или по меньшей мере в около 9 раз, или по меньшей мере в около 10 раз, или по меньшей мере в около 12 раз, или по меньшей мере в около 15 раз, или по меньшей мере в около 17 раз, или по меньшей мере в около 20 раз более продолжительное, по сравнению с соответствующим FVIII, который не связан с XTEN.

В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения обеспечивают гибридный белок рекомбинантного фактора VIII, который содержит FVIII и один или несколько XTEN, при том, что гибридный белок проявляет растворимость, увеличенную по меньшей мере в три раза, или по меньшей мере в около четыре раза, или по меньшей мере в около пять раз, или по меньшей мере в около шесть раз, или по меньшей мере в около семь раз, или по меньшей мере в около восемь раз, или по меньшей мере в около девять раз, или по меньшей мере в около десять раз, или по меньшей мере в около 15 раз, или по меньшей мере в 20 раз, или по меньшей мере в 40 раз, или по меньшей мере в 60 раз при физиологических условиях, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, которая содержит гибридный белок по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, описанного в данном документе, и фармацевтически приемлемые носитель.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения коагулопатии у субъекта, который включает введение указанному субъекту композиции, которая содержит эффективное для свертывания количество фармацевтической композиции. В отдельном варианте осуществления способа после указанного введения концентрацию прокоагулирующего фактора VIII в крови поддерживают на уровне около 0,05, или 1, или 1,5 МЕ/мл или более в случае по меньшей мере 48 ч после указанного введения. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ свертывания крови у субъекта, который включает взаимодействие эффективного для свертывания количества фармацевтической композиции с кровью.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения коагулопатии у субъекта с циркулирующими ингибиторами фактора VIII, который включает введение указанному субъекту композиции, которая содержит терапевтически эффективное количество фармацевтической композиции CFXTEN, при том, что композиция проявляет более высокие прокоагулянтные активности в случае указанного субъекта, по сравнению с композицией, которая содержит соответствующий фактор VIII, не связанный с XTEN, и вводят с использованием аналогичного количества. В отдельном варианте осуществления способа коагулопатия представляет собой гемофилию А. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения коагулопатия представляет собой результат травмы, операции или инфекции.

Настоящее изобретение обеспечивает способ лечения в случае кровотечения у субъекта, который включает введение указанному субъект композиции, которая содержит эффективное для свертывания количество фармацевтической композиции CFXTEN, при том, что эффективное для свертывания количество гибридного белка останавливает случай кровотечения в течение периода, который по меньшей мере в три раза, или по меньшей мере в четыре раза, или по меньшей мере в пять раз более продолжителен, по сравнению с соответствующим фактором VIII, не связанным с XTEN, и которое вводят с использованием аналогичного количества указанному субъект. Неограничивающие примеры соответствующего фактора VIII, не связанного с XTEN, содержат природный FVIII, последовательности из табл. 1, BDD-FVIII и pCB0114 FVIII.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает гибридный белок CFXTEN рекомбинантного фактора VIII для использования в фармацевтическом режиме лечения пациента с гемофилией А, указанный режим содержит фармацевтическую композицию, которая содержит гибридный белок CFXTEN. В отдельном варианте осуществления фармацевтического режима, режим дополнительно включает этап определения количества фармацевтической композиции, которая содержит CFXTEN, необходимый для того, чтобы позволить достигнуть гемостаза у пациента с гемофилией А. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтический режим лечения субъекта с гемофилией А содержит введение фармацевтической композиции двумя или более последовательными дозами субъекту в эффективном количестве, при том, что введение приводит к по меньшей мере на 10%, или 20%, или 30%, или 40%, или 50%, или 60%, или 70%, или 80%, или 90% более значительному улучшению по меньшей мере одного, двух или трех параметров, связанных с заболеваниемм гемофилией А, по сравнению с фактором VIII, не связанным с XTEN, и вводят с использованием аналогичной дозы. Неограничивающие примеры улучшенных параметров содержат концентрацию в крови прокоагулянта FVIII, сниженное время анализа частичной протромбопластиновой активизации (aPTT), сниженное время одноэтапного или двухэтапного анализа коагулирующей активности, отложенное начало случая кровотечения, сниженное время хромогенного анализа, сниженное время анализа кровотечения, разрешение эпизода кровотечения или снижение титра Бетезда к природному FVIII.

В дополнительных аспектах настоящее изобретение обеспечивает изолированную нуклеотидную последовательность, которая кодирует гибридные белки любого из вариантов осуществления гибридного

белка CFXTEN. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения изолированный нуклеотид является комплементарной последовательностью, которая кодирует гибридный белок CFXTEN по вариантам осуществления настоящего изобретения. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения изолированный нуклеотид дополнительно содержит последовательность, которая кодирует сигнальную последовательность, при том, что указанная последовательность представляет собой ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGT (SEQ ID NO: 1613) или комплементарную ей последовательность. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает экспрессирующий вектор, который содержит нуклеотид, кодирующий гибридный белок, или комплементарную ему последовательность. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает изолированную клетку-хозяин, которая содержит вышеуказанный экспрессирующий вектор. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ получения гибридного белка по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, который содержит обеспечение клетки-хозяина, которая содержит экспрессирующий вектор; культивирование клетки-хозяина для обеспечения получения гибридного белка; и извлечение гибридного белка.

В отдельном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает изолированный гибридный белок, содержащий полипептид, который имеет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или 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%, до около 100% идентичности последовательности, по сравнению с последовательностью сопоставимой длины, выбранной из табл. 21, при оптимальном выравнивании.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает изолированный нуклеотид, который содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из (a) последовательности, которая имеет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или 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 до около 100% идентичности последовательности, по сравнению с последовательностью сопоставимой длины, выбранной из табл. 21, при оптимальном выравнивании, или (b) комплемента полинуклеотида (a). В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения изолированный нуклеотид содержит последовательность ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGT (SEQ ID NO: 1613), связанную с 5' концом нуклеотида (a), или комплемент последовательности, связанный с 3' концом (b).

Отдельно предусмотрено, что гибридные белки рекомбинантного фактора VIII могут проявлять один или несколько, или любую комбинацию свойств, раскрытых в данном документе.

Включение в описание изобретения сведений путем ссылки

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в этом описании, включены в виде ссылки в той же степени, как если бы каждая индивидуальная публикация, патент или патентная заявка были конкретно и индивидуально указаны как включенные посредством ссылки.

Краткое описание графических материалов

Признаки и преимущества настоящего изобретения могут быть далее объяснены со ссылкой на последующее подробное описание и прилагаемые графические материалы, в которых изложены иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения. Фиг. 1 иллюстрирует схематическую представление строение FVIII и пространственное расположение доменов во время обработки и свертывания, и предназначен для представление и природного варианта FVIII, и варианта без домена B. Домен A1 изменяется в диапазоне от 1 до 372 остатка (нумерация относительно зрелой формы последовательности FVIII NCBI Protein RefSeq NP_000123 и охватывает остатки a1), домен A2 изменяется в диапазоне от 373 до 740 остатка, домен B изменяется в диапазоне от 741 до 1648 остатка, домен A3 изменяется в диапазоне от 1649 до 2019 остатка (охватывает кислую область a3), домен C1 изменяется в диапазоне от 2020 до 2172, а домен C2 изменяется в диапазоне от 2173 до 2332 остатка. Варианты BDD содержат делеции в диапазоне от 741 до 1648, оставляя некоторые или без оставшихся остатков, с оставшейся последовательность неограничивающей BDD, которая представляет собой SFSQNPPVLKRHQR (SEQ ID NO: 1614). Фиг. 1A иллюстрирует строение домена одноцепочечного FVIII перед обработкой. Стрелки указывают сайты на остатках R372, R740, R1648 и R1689, которые расщепляют при обработке и превращении FVIII в FVIIIa. Фиг. 1B иллюстрирует молекулу FVIII, которую перерабатывают в гетеродимер с помощью расщепления остатка R1648, с кислой областью a3a домен A3, указанной на N-конце A3. Фиг. 1C иллюстрирует молекулу FVIII, которую перерабатывают в гетеротример FVIIIa с помощью расщепления на R372, R740 и R1689 остатках.

Фиг. 2 представляет собой схему каскада свертывания, которая демонстрирует внутреннюю и внешнюю ветви, которые ведут к общему пути.

Фиг. 3 иллюстрирует аминокислотную последовательность зрелого фактора VIII человека (SEQ ID NO: 1592).

Фиг. 4 иллюстрирует последовательность фактора VIII с делециям части домена B (SEQ ID NO: 1593).

Фиг. 5 иллюстрирует несколько примеров конформации CFXTEN FVIII, связанной с XTEN (последний показан как толстые, волнистые линии). Во всех случаях FVIII может быть либо природным, либо BDD формой FVIII, либо одноцепочечной формой, в которой удаляют весь домен B, который содержит природные расщепленные сайты. Фиг. 5A иллюстрирует, слева направо, три варианта одноцепочечного фактора VIII с XTEN, связанного с N-концом, C-концом, и два XTEN, связанных с N- и C-концом. Фиг. 5B иллюстрирует шесть вариантов зрелого гетеродимера FVIII с, слева направо, XTEN, связанным с N-концом домена A1; XTEN, связанным с C-концом домена C2; XTEN, связанным с N-концом домена A1 и C-концом домена C2; XTEN, связанным с N-концом домена A1 и с N-концом домена A3; XTEN, связанным с C-концом домена C2 и с N-концом домена A3 посредством остаточных аминокислот домена B; и XTEN, связанным с N-концом домена A1, C-концом домена A2 посредством остаточных аминокислот домена B, и с C-концом домена C2. Фиг. 5C иллюстрирует, слева направо, три варианта одноцепочечного фактора VIII: XTEN, связанный с N-концом домена A1, XTEN связанный в пределах наружной петли домена A1 и XTEN, связанный в пределах наружной петли домена A3; XTEN, связанный в пределах наружной петли домена A2, XTEN, связанный в пределах наружной петли домена C2 и XTEN, связанный с C-концом домена C2; XTEN, связанный с N-концом домена A1 и в пределах наружной петли домена C1 и с C-концом домена C. Фиг. 5D иллюстрирует шесть вариантов зрелого гетеродимера FVIII с, слева направо, XTEN, связанный с N-концом домена A1, XTEN, связанный в пределах наружной петли домена A1, и XTEN, связанный в пределах наружной петли домена A3; XTEN, связанный в пределах наружной петли домена A2, и XTEN, связанный в пределах наружной петли домена C1, и XTEN, связанный с C-концом домена C2; XTEN, связанный с N-концом домена A1, XTEN, связанный в пределах наружной петли домена A1, XTEN, связанный в пределах наружной петли домена A3, и XTEN, связанный с C-концом домена C2; XTEN, связанный с N-концом домена A1, XTEN, связанный с N-концом домена A3 посредством остаточных аминокислот домена B, и XTEN, связанный в пределах наружной петли домена C2; XTEN, связанный в пределах наружной петли домена A2, XTEN, связанный с N-концом домена A3 посредством остаточных аминокислот домена B, XTEN, связанный в пределах наружной петли домена C1, и XTEN, связанный с C-концом домена C2; и XTEN, связанный в домене B или между остаточными остатками домена B варианта BDD (а настоящее изобретение также предусматривает вариант, в котором XTEN заменяет полный объем домена B, который содержит все сайты природного расщепления, связывая домены A2 и A3, что приводит к одноцепочечной форме фактора VIII). Данная фигура также воплощает все варианты, в которых одну или несколько последовательностей XTEN вводят в домен B, а получаемые слияния расщепляют в одном или нескольких сайтах (например, по сайту R1648) во время внутриклеточной обработки.

Фиг. 6 представляет собой графическое изобрежение конструкции CFXTEN с XTEN, вводимым в домен B и связанным с C-концом домена C2, которое иллюстрирует неструктурированную характеристику XTEN, которая приводит к образованию случайной спирали, которая может охватывать участки фактора VIII, близкие к XTEN. В нижней части, графический материал иллюстрирует, что если XTEN находится в случайной спирале, от может принять конформацию, которая приводит к стерическому затруднению, которое блокирует связывание антител ингибитора фактора VIII, которые иначе могли бы иметь аффинность к эпитопам, близким к сайту XTEN вставки.

Фиг. 7 представляет собой графическое изобрежение различных анализов, выполненных на последовательности FVIII без B-доменов для идентификации инсерционных сайтов XTEN в пределах последовательности FVIII. Каждая из линий A-H представлена в произвольном масштабе по значениям по оси Y по всей последовательности BDD FVIII, так что минимальные значения представляют области с высокопрогнозируемой толерантностью к вставке XTEN, с количествами остатков по оси X. Линия A иллюстрирует границы домена; все разрывы в этой линии представляют границы, которые могут принять XTEN. Линия B иллюстрирует границы экзона; т.е. каждый этап линии представляет собой новый экзон. Линия C иллюстрирует области, которые не были видны на рентгеновской структуре из-за отсутствия порядка в кристалле. Линии, обозначенные D, представляют собой несколько прогнозов, которые были рассчитаны с использованием соответствующих программ FoldIndex, взятых с интернет-сайта bip.weizmann.ac.il/fldbin/findex (последнее посещение 23 февраля 2011) (см. Jaime Prilusky, Clifford E. Felder, Tzviya Zeev-Ben-Mordehai, Edwin Rydberg, Orna Man, Jacques S. Beckmann, Israel Silman и Joel L. Sussman, 2005, биоинформатика, основанная на алгоритме Kyte & Doolitlle, а также RONN, обнаруженном на интернет-сайте strubi.ox.ac.uk/RONN (последнее посещение 23 февраля 2011) (см. Yang, Z.R., Thomson, R., McMeil, P. and Esnouf, R.M. (2005) RONN: the bio-basis function neural network technique applied to the detection of natively disordered regions in proteins Bioinformatics 21: 3369-3376. Линии E и F рассчитывают, основываясь на множественном выравнивании последовательностей генов FVIII от 11 млекопитающих, доступных в GenBank. Линия E представляет сохранение отдельных остатков. Линия F представляет консервативность 3 аминокислотных сегментов FVIII. Линии G и H представляют разрывы и вставки, наблюдаемые во множественном выравнивании последовательностей 11 генов FVIII млекопитающего. Линия J перечисляет точки вставки XTEN по числу аминокислот, которые были получены путем объединения множества вышеприведенных измерений.

Фиг. 8 иллюстрирует сайты в последовательностях FVIII без B-доменов (SEQ ID NO: 1594), опре-

деленные в качестве точки активной вставки в случае XTEN с использованием информации, проиллюстрированной на фиг. 8 и как подтверждено в анализах в примере 34.

Фиг. 9 иллюстрирует диапазон сайтов в последовательностях FVIII без B-доменов (SEQ ID NO: 1595), определенных для вставки XTEN с использованием информации, проиллюстрированной на фиг. 8 и или в примере 34 плюс диапазон аминокислот около каждой точка вставки, которые считаются подходящими для вставки XTEN.

Фиг. 10 представляет собой схему сборки библиотеки CFXTEN, созданной с помощью определения точек вставки, как описано в случае фиг. 7 с последующей вставкой отдельной XTEN (черные полосы) в различных точках вставки с использованием способов молекулярной биологии. Конструкции экспрессируют и восстанавливают, затем оценивают активность FVIII и фармакокинетические свойства для идентификации тех конформаций CFXTEN, которые приводят к улучшенным свойствам.

Фиг. 11 представляет собой схему сборки библиотеки компонентов CFXTEN, в которых сегменты доменов BDD FVIII, либо отдельные, либо связаные с различными длинами XTEN (черные полосы), собирают в комбинаторной форме в библиотеки генов, кодирующих CFXTEN, которые затем могут быть оценены на активность FVIII и фармакокинетические свойства для идентификации конформаций CFXTEN, которые приводят к улучшенным свойствам.

Фиг. 12 иллюстрирует несколько примеров конформаций CFXTEN с XTEN (показаны толстыми, волнистыми линиями) с некоторыми XTEN, которые являются секретируемыми с помощью вставки расщепленных последовательностей (обозначены черными треугольниками), которые являются расщепляемыми с помощью прокоагулирующих протеаз. Фиг. 12A иллюстрирует scFVIII с двумя конечными секретируемыми XTEN. Фиг. 12B иллюстрирует конформацию, аналогичную Фиг. 12A, но с дополнительным несекретируемым XTEN, связывающим домены A3 и C1. Фиг. 12C иллюстрирует зрелый гетеродимер FVIII с двумя конечными секретируемыми XTEN. Фиг. 12D иллюстрирует такую же конформацию, как 10C, но с дополнительным несекретируемым XTEN, связывающим домены A3 и C1.

Фиг. 13 представляет собой принципиальную блок-схему репрезентативных этапов сборки, получения и оценки XTEN.

Фиг. 14 представляет собой принципиальную блок-схему репрезентативных этапов сборки конструкции полинуклеотида CFXTEN, кодирующего гибридный белок. Отдельные олигонуклеотиды 501 ренатурируют в мотивы последовательности 502, такие как мотив из 12 аминокислот ("12-мер"), который лигируют дополнительными мотивами последовательности из библиотеки для создания пула, который охватывает нужную длину XTEN 504, а также лигируют меньшей концентрацией олигосодержащего BbsI и сайтов рестрикции KpnI 503. Получаемый пул продуктов лигирования очищают на геле и обрезают бэнд с нужной длиной XTEN, что приводит к образованию изолированного гена XTEN с последовательностью-стоппером 505. Ген XTEN клонируют в спейсерный вектор. В данном случае вектор кодирует дополнительную последовательность CBD 506 и ген GFP 508. Затем осуществляют расщепление с BbsI/HindIII для удаления 507 и 508 и размещения стоп-кодона. Получаемый продукт затем клонируют в вектор, расщепляемый BsaI/HindIII, который содержит ген, кодирующий FVIII, в результате чего получают ген 500, кодирующий гибридный белок FVIII-XTEN.

Фиг. 15 представляет собой принципиальную блок-схему репрезентативных этапов сборки гена, кодирующего гибридный белок, который содержит CF и XTEN, его экспрессия и восстановление в качестве гибридного белка, и его оценка в качестве продукта кандидата CFXTEN.

Фиг. 16 иллюстрирует использование донорной последовательности XTEN для получения процессированного XTEN. Фиг. 16A иллюстрирует последовательность AG864 (SEQ ID NO: 1596), с подчеркнутой последовательностью, которую используют для генерирования длины последовательности 576 (SEQ ID NO: 1597). Фиг. 16B иллюстрирует последовательность AG864 (SEQ ID NO: 1598), с подчеркнутой последовательностью, которую используют для генерирования длины последовательности 288 (SEQ ID NO: 1599). Фиг. 16C иллюстрирует последовательность AG864 (SEQ ID NO: 1600), с подчеркнутой последовательностью, которую используют для генерирования длины последовательности 144 (SEQ ID NO: 1601). Фиг. 16D иллюстрирует последовательность AE864 (SEQ ID NO: 1602), с подчеркнутой последовательностью, которую используют для генерирования длины последовательности 576 (SEQ ID NO: 1603). Фиг. 16E иллюстрирует последовательность AE864 (SEQ ID NO: 1604), с подчеркнутой последовательностью, которую используют для генерирования длины последовательности 288 (SEQ ID NO: 1605). Фиг. 16F иллюстрирует последовательность AE864 (SEQ ID NO: 1606), которую используют для генерирования четырех последовательностей с длиной 144 (SEQ ID NOS 1607-1610, соответственно, в порядке появления) (двойное подчеркивание указывает первую аминокислоту в последовательностях 144 и одним подчеркивание представляет баланс этой последовательности).

Фиг. 17 представляет собой схематическое представление строения экспрессирующих векторов фактора VIII-XTEN с различными стратегиями введения элементов XTEN в последовательность, кодирующую FVIII. Фиг. 17A иллюстрирует экспрессирующий вектор, который кодирует слитый с 3' концом последовательности XTEN, которая кодирует FVIII. Фиг. 17B иллюстрирует экспрессирующий вектор, который кодирует элемент XTEN, вводимый в середину кодирующей последовательности, которая кодирует отдельный FVIII. Фиг. 17C иллюстрирует экспрессирующий вектор, который кодирует два эле-

мента XTEN: один вводимый во внутрь последовательности, кодирующей FVIII, и другой, слитый с 3' концом последовательности, кодирующей FVIII.

Фиг. 18 иллюстрирует способ сборки гибридных генов, которые кодируют XTEN. В данном случае, гены собирают из 6 основных фрагментов, а каждый фрагмент доступен в 4 различных вариантах кодона (A, B, C и D). Это допускает теоретическое разнообразие 4096 в сборке из 12-аминокислотных мотивов.

Фиг. 19 иллюстрирует фармакокинетический профиль (концентрации в плазме) у яванских макак после однократных доз различных композиций GFP, связанных с неструктурированными полипептидами различной длины, которые вводят либо подкожно или внутривенно, как описано в примере 41. Композиции представляют собой GFP-L288, GFP-L576, GFP-XTEN_AF576, GFP-Y576 и XTEN_AD836-GFP. Образцы крови анализируют в различные моменты времени после инъекции и концентрацию GFP в плазме измеряют с помощью ELISA с использованием поликлонального антитела против GFP для захвата и биотинилированного получения того же поликлонального антитела для детектирования. Результаты представлены в виде концентрация в плазме в зависимости от времени (ч) после дозирование и демонстрируют, в частности, значительное повышение времени полужизни в случае XTEN_AD836-GFP, композиции с самой большой длиной последовательностей XTEN. Конструкция с самой короткой длиной последовательности, GFP-L288, имеет самое короткое время полужизни.

Фиг. 20 иллюстрирует SDS-PAGE образцов из исследования стабильности гибридного белка XTEN_AE864, слитого с N-концом GFP (см. пример 42). GFP-XTEN инкубируют в плазме яванской макаки и лизате почек крыс в течение до 7 дней при 37°C. Кроме того, также оценивают GFP-XTEN, который вводят яванской макаке. Образцы отбирают через 0, 1 и 7 дней и анализируют с помощью SDS PAGE с последующим детектированием с использованием Вестерн-блоттинга с антителом против GFP.

Фиг. 21 иллюстрирует результаты анализа при помощи гель-проникающей хроматографии образцов конструкции глюкагон-XTEN, которую измеряют против стандартов протеина с известной молекулярной массой, с графическим представлением результатов в виде поглощения в зависимости от удерживаемого объема, как описано в примере 40. Конструкции глюкагон-XTEN представляют собой 1) глюкагон-Y288; 2) глюкагон Y-144; 3) глюкагон-Y72; и 4) глюкагон-Y36. Результаты указывают на повышение средней молекулярной массы с возрастанием длины фрагмент XTEN (для данных см. пример 40).

Фиг. 22 иллюстрирует результаты Вестерн-блоттинга протеинов, экспрессированных клеточной культурой клеток, которые трансформированы с помощью обозначенных конструкций (пример 25). Образцы на дорожках 1-12 представляют собой: стандарты MW, FVIII (42,5 нг), pBC0100B, pBC0114A, pBC0100, pBC0114, pBC0135, pBC0136, pBC0137, pBC0145, pBC0149 и pBC0146 соответственно. Дорожки 8, 9 и 12 демонстрируют полосы соответствующие FVIII с C-конечным XTEN288, с предполагаемой молекулярной массой 95 кДа. Дорожки 7 и 11 демонстрируют полосы, соответствующие FVIII с C-конечным XTEN42, с предполагаемой молекулярной массой 175 кДа. Дорожки 2-6 демонстрируют полосы, соответствующие FVIII и тяжелой цепи. Дорожки 10 и 23 демонстрируют полосы, соответствующие тяжелой цепи. Дорожка 7 иллюстрирует бэнд, соответствующий тяжелой цепи и связанному XTEN42.

Фиг. 23 иллюстрирует результаты анализа FVIII в образцах, полученных у мышей с двумя нокаутированными факторами, FVIII и фактора фон Виллебранда, с гидродинамической инъекцией плазмидной ДНК, как описано в примере 36.

Фиг. 24 представляет собой графическое и табличное отображение фармакокинетических свойств rBDD-FVIII и очищенных гибридных белков CFXTEN pBC0145 и pBC0146 (с C-концевым XTEN), введенных мышам с двумя нокаутированными либо HemA, либо в FVIII/VWF, генами, как описано в примере 30, которые демонстрируют улучшенное время полужизни CFXTEN в обоих штаммах мышей.

Фиг. 25 представляет собой графическое и табличное отображение фармакокинетических свойств rBDD-FVIII и гибридных белков CFXTEN pSD0050 и pSD0062 (с вводимыми вовнутрь XTEN), введенных мышам с двумя нокаутированными, либо HemA (фиг. 25A), либо FVIII/VWF, генами (фиг. 25B), с использованием анализа PK культуры клеток у мышей HemA. Показаны доза, 5-минутное восстановление и время полужизни (T1/2), как описано в примере 32, которые подчеркивают улучшенное восстановление и время полужизни CFXTEN, по сравнению с положительным контролем FVIII в обоих штаммах мышей.

Фиг. 26 представляет собой графическое изображение титрования ингибитора FVIII GMA8021 с использованием pBC0114 BDD-FVIII и конструкции CFXTEN LSD0049.002 с тремя вставками XTEN из 144 аминокислот на остатках 18, 745 и 2332. Данные указывают на сдвиг количества антитела, необходимых для ингибирования CFXTEN до 50% уровня, по сравнению с положительным контролем FVIII в мкг/мл вправо на приблизительно 0,7 порядка величин.

Фиг. 27 представляет собой схему логической блок-схемы алгоритма SegScore. На фигуре используют следующие обозначения: i, j - счетчики, которые используют в системах управления, проходящих через всю последовательность; HitCount- эта переменная представляет собой счетчик, который отслеживает, сколько раз подпоследовательность сталкивается в блоке с идентичной подпоследовательностью; SubSeqX - эта переменная содержит подпоследовательность, которую проверяют на избыточности; SubSeqY - эта переменная содержит подпоследовательность, которую снова проверяет SubSeqX; BlockLen - эта переменная содержит длину блока, определенную пользователем; SegLen - эта переменная содержит

длину сегмента. Программу жестко задают для того, чтобы генерировать результаты в случае подпоследовательности с длинами 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10; Block - эта переменная содержит строку с длиной BlockLen. Строка состоит из букв из входящей последовательности XTEN и определяется с помощью положения счетчика i; SubSeqList - это список, который содержит все результаты сгенерированных подпоследовательностей. Фиг. 28 иллюстрирует применение алгоритма SegScore к гипотетическому XTEN из 11 аминокислот (SEQ ID NO: 1591), для того, чтобы определить повторяемость. Последовательность XTEN состоит из N аминокислот, разделенных на N-S+1 подпоследовательностей с длиной S (в данном случае S=3). Осуществляют попарное сравнение всех подпоследовательностей и рассчитывают среднее число одинаковых подпоследовательностей, для того, чтобы привести к количеству подпоследовательностей 1, 89.

Фиг. 29 представляет собой график величины отдельных конструкций отношения активности FVIII в анализируемом CFXTEN к таковому в случае pBC114 положительного контроля FVIII после воздействия антитела GMA8021 на FVIII, сгруппированный в соответствии с количеством XTEN в конструкции гибридного белка (см. пример 28). Результаты показывают существенную линейную зависимость способности CFXTEN сохранять активность FVIII с возрастанием количества встроенных XTEN.

Фиг. 30 иллюстрирует первичную последовательность и структуру домена конструкции зрелого FVIII человека без B-доменов (BDD) (пример 46). Проиллюстрировано расположение введенных сайтов рестрикции NheI и ClaI. Следует отметить, что нумерация аминокислот соответствует аминокислотным позициям в первичной последовательности зрелого фактора FVIII (фиг. 30). Отдельные домены ограничены серыми линиями/рамками с обозначением домена серым текстом. Кислые области (a1, a2, a3) указаны пунктирными рамками. Сплошные клинья/треугольники обозначают сайты расщепления тромбина при активации FVIII до FVIIIa. Незаполненные клинья/треугольник обозначают сайт внутриклеточной протеолитической обработки в двуцепочечную форму FVIII. Шестиугольники указывают сайты N-связанного гликозилирования. Круги указывают сайты сульфатирования Tyr. Уникальные неприродные сайты рестрикции (NheI, GCTAG; ClaI, ATCGAT), введенные в cDNA для облегчения вставки/рекомбинации XTEN, выделены серым с двойным подчеркиванием.

Фиг. 31 иллюстрирует графическое представление конструкции FVIII, описанной на фиг. 30, с указанием организации домена и расположения природных и неприродных сайтов рестрикции.

Фиг. 32 иллюстрирует графические выходные данные ASAView в случае структурных наборов данных 2R7E, 3CDZ и PM0076106. Показаны доступные адсорбции поверхности (ASA) в случае аминокислот в доменах A1, A2, A3, C1 и C2. Анализы выполняют в рентгеноструктурных кристаллографических координатах 3CDZ (Ngo et al., Structure 16: 597-606 (2008)) и 2R7E (Shen et al., Blood 111:1240-1247 (2008)) внесенных в Protein Data Bank, который обеспечивает Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB; http://www.rcsb.org/pdb), а также в атомных координатах PM0076106 в случае прогнозируемой уточненной структуры FVIII, полученной из исследования симулирования молекулярной динамики (Venkateswarlu, BMC Struct. Biol. 10:7 (2010)), внесенных в Protein Model Database (http://mi.caspur.it/PMDB/main.php), которые обеспечивает Consorzio Interuniversitario per le Applicazioni di Supercalcolo per Universitа e Riserca (CASPUR) и Department of Biochemical Sciences of the University of Rome.

Фиг. 33 иллюстрирует структурное представление о расположении инсерционных сайтов XTEN. Центральный графический материал соответствует кристаллической структуре FVIII (PDB: 2R7E), окруженной подробным видом доменов A1, A2, A3, C1 и C2. Бета-тяжи и альфа-спирали показаны в виде ленточного представления. Петли показаны в виде альфа-карбоновых трубок. Аминокислоты в инсерционных сайтах XTEN показаны в виде сферического представления CPK. Номер каждого изображения указывает расположение инсерционных сайтов XTEN в соответствии с нумерацией на фиг. 30.

Фиг. 34 иллюстрирует структурное представление о расположении инсерционных сайтов XTEN, показанных на фиг. 33, при том, что получаемый рекомбинантный протеин FVIII демонстрирует активность FVIII.

Фиг. 35 иллюстрирует структурное представление о расположении инсерционных сайтов XTEN, показанных на фиг. 34, при том, что получаемый рекомбинантный протеин FVIII демонстрирует активность FVIII.

Фиг. 36 иллюстрирует структурное представление о расположении инсерционных сайтов XTEN, показанных на фиг. 35, при том, что получаемый рекомбинантный протеин FVIII демонстрирует активность FVIII.

Фиг. 37 иллюстрирует множественное выравнивание последовательностей ClustalW доменов A1, A2, A3, C1 и C2 FVIII, которое демонстрирует расположение вставок XTEN, которые приводит к рекомбинантным протеинам FVIII, отображающие активность FVIII (черное поле, белый текст) или не отображающие активность FVIII (серое поле, жирный текст).

Фиг. 38 иллюстрирует графическое представление DSSP вторичной структуры двух полипептидных цепей в кристаллической структуре природного активного FVIII человека, депонированного под кодом 2R7E в Protein Data Bank (см. пример 47). Нумерация аминокислотной последовательности является такой же, как и в белковой последовательности на фиг. 30. Области бета-листа показаны заполненными

стрелками и обозначены от β1 до β66. Расположение петель XTEN, доступных для встраивания, обозначают заштрихованными рамками. Домен A1 петли XTEN, доступной для встраивания, обозначен Loop A1-1 и Loop A1-2. Домен A2 петли XTEN, доступной для встраивания, обозначен Loop A2-1 и Loop A2-2. Домен A3 петли XTEN, доступной для встраивания, обозначен Loop A3-1 и Loop A3-2.

Фиг. 39 иллюстрирует графическое представление DSSP о вторичной структуре двух полипептидных в кристаллической структуре природного активного FVIII человека, депонированного под кодом 2R7E в Protein Data Bank (см. пример 47). Нумерация аминокислотной последовательности является такой же, как и в белковой последовательности на фиг. 30. Области бета-листа показаны заполненными стрелками и обозначены от β1 до β66. Расположение петель XTEN, доступных для встраивания, обозначают заштрихованными рамками. Домен A1 петли XTEN, доступной для встраивания, обозначен Loop A1-1 и Loop A1-2. Домен A2 петли XTEN, доступной для встраивания, обозначен Loop A2-1 и Loop A2-2. Домен A3 петли XTEN, доступной для встраивания, обозначен Loop A3-1 и Loop A3-2.

Фиг. 40 иллюстрирует множественное выравнивание ClustalW последовательностей доменов A1, A2, A3, C1 и C2 FVIII, которое демонстрирует расположение вставок XTEN, приводящих к рекомбинантным протеинам FVIII, отображающих активность FVIII (черное поле, белый текст) или не отображающих активность FVIII (серое поле, жирный текст). Локализации петель XTEN, доступных для встраивания, указаны пунктирными прямоугольниками (см. пример 47).

Фиг. 41. Фиг. 41A представляет вид спереди структурного представления FVIII человека (PDB:2R7E), который демонстрирует расположение доменов A1, A2, A3, C1 и C2 (обведено пунктирными линиями) и локализации петель XTEN, доступных для встраивания, A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 и A3-2 выделены в виде сферических представлений CPK. Фиг. 41B представляет вид сбоку структурного представления FVIII человека (PDB:2R7E), который демонстрирует расположение доменов A1, A2, A3, C1 и C2 (обведено пунктирными линиями) и локализации петель XTEN, доступных для встраивания, A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 и A3-2 выделены в виде сферических представлений CPK.

Фиг. 42 иллюстрирует вид сверху структурного представления A доменов изолированного FVIII человека (PDB:2R7E), которые демонстрируют расположение петель XTEN, доступных для встраивания, выделенные в виде в виде сферических представлений CPK. Фиг. 42B, 42D и 42F демонстрируют вид сбоку структурных представлений доменов A изолированного FVIII человека (PDB:2R7E), которые демонстрируют расположение петель XTEN, доступных для встраивания, выделенные в виде в виде сферических представлений CPK.

Фиг. 43 иллюстрирует последовательности различных делеций B-доменов фактора VIII и отдельные мутации. Линии 4-10 демонстрируют различные делеций B-домена с указанным XTEN, связывающим остаточный фланкирующий B-домен или остатки домена A3. Мутация R1648A обозначена стрелкой на линии 5 и 8, в то время как мутация Y1680F стрелкой на линиях 8-10.

Фиг. 44 представляет собой гистограмму хромогенного анализа и анализа активности aPTT различных CFXTEN с одиночными вставками XTEN (пример 49).

Фиг. 45 представляет собой гистограмму хромогенного анализа и анализа активности aPTT различных CFXTEN с 2 вставками XTEN (пример 49).

Фиг. 46 представляет собой гистограмму хромогенного анализа и анализа активности aPTT различных CFXTEN с 3 вставками XTEN (пример 49).

Фиг. 47 представляет собой график уровней плазмы у мышей DKO различных введений CFXTEN с одиночными вставками XTEN, по сравнению с контролем BDD-FVIII, на котором показано от 10- до 20 раз более продолжительное время полужизни, которое выполняют с помощью вставки XTEN в различных локализациях (пример 50).

Фиг. 48 представляет собой график уровней плазмы у мышей DKO различных вводят CFXTEN с одной, двумя и тремя вставками XTEN, по сравнению с контролем BDD-FVIII, на котором показано увеличение времени полужизни, которое выполняют с помощью включения дополнительных вставок XTEN, по сравнению с одиночной или двумя вставками (пример 51).

Фиг. 49 представляет собой графики зависимости построенных кривых ингибирования для оставшейся прокоагулянтной активности фактора VIII в образцах, проанализированных в Бетезда-анализе с тремя сыворотками больных гемофилией (фиг. 49A-C) или анти-FVII овцы (фиг. 49D), описано в примере 52, который явным образом демонстрирует сдвиг влево кривой ингибирования в случае двух молекул CFXTEN, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN.

Подробное описание изобретения

Перед тем как будут описаны варианты осуществления настоящего изобретения, следует понимать, что подобные варианты осуществления настоящего изобретения представлены исключительно в качестве примера, и что в практической реализации настоящего изобретения могут быть использованы различные альтернативы вариантам осуществления настоящего изобретения, описанные в данном документе. Многочисленные вариации, изменения и замены будут очевидны специалистам в данной области техники без отступления от изобретения.

Если не определено иначе, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, как обычно понимают специалисты с обычной квалификацией в данной области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Хотя способы и материалы, подобные или эквивалентные описанным в данном документе, могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. В случае конфликта, будет контролироваться описание патента, включая определения. Кроме того, материалы, способы и примеры являются только иллюстративными и не предназначены для ограничения. Многочисленные вариации, изменения и замены будут очевидны специалистам в данной области без отступления от изобретения.

Определения

В контексте настоящего изобретения следующие термины имеют значения, закрепленные за ними, если не указано иное.

Как использовано в описании и формуле изобретения, формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Например, термин "клетка" содержит в себе множество клеток, в том числе их смеси.

Термины "полипептид", "пептид" и "протеин" используются здесь взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и может прерываться не аминокислотами. Термины также содержат аминокислотный полимер, который был модифицирован, например, путем образования дисульфидных связей, гликозилирования, липидизации, ацетилирования, фосфорилирования или любой другой манипуляцией, например, конъюгацией с компонентом метки.

Термин "аминокислота", который используется в данном документе, относится к любой природной и/или ненатуральной или синтетической аминокислоте, в том числе, но без ограничения ими, как D, так и L оптические изомеры и аналоги аминокислот и пептидомиметиков. Для обозначения аминокислот используют стандартные одно- или трехбуквенные коды.

Термин "домен", если используется в отношении к полипептиду фактора VIII, относится либо ко всему домену или его функциональному фрагменту, например, полной длине или функциональным фрагментам домена A1, домена A2, домена A3, домена B, домена C1 и/или домена C2 фактора VIII.

Термин "природная L-аминокислота" означает L формы оптического изомера глицина (G), пролина (P), аланина (A), валина (V), лейцина (L), изолейцина (I), метионина (M), цистеина (C), фенилаланина (F), тирозина (Y), триптофана (W), гистидина (H), лизина (K), аргинина (R), глутамина (Q), аспарагина (N), глутаминовой кислоты (E), аспарагиновой кислоты (D), серина (S) и треонина (T).

Термин "не встречающиеся в природе", в применении к последовательностям и как используется в данном документе, означает полипептидные или полинуклеотидные последовательности, которые не имеют аналогов, не комплементарны или не имеют высокую степень гомологии с последовательностью дикого типа или встречающейся в природе, обнаруженной у млекопитающего. Например, не встречающийся в природе полипептид или фрагмент может проявлять не более 99, 98, 95, 90, 80, 70, 60, 50% или даже меньше идентичности аминокислотной последовательности, по сравнению с природной последовательностью при соответствующем выравнивании.

Термины "гидрофильный" и "гидрофобный" относятся к степени аффинности, которую имеет вещество с водой. Гидрофильное вещество имеет высокую аффинность к воде, стремясь раствориться в, смешаться с, или смачиваться водой, тогда как гидрофобное вещество, по существу, не имеет аффинности к воде, стремится к отражению, а не поглощению воды, и стремится не раствориться, или не смешаться с, или не смачиваться водой. Аминокислоты могут быть охарактеризованы на основе их гидрофобности. Были разработаны ряд шкал. Примером является шкала, разработанная Levitt, M, et al., J Mol Biol (1976) 104:59, который приведена в Hopp, TP, et al., Proc Natl Acad Sci U S (1981) 78:3824. Примеры"гидрофильных аминокислот" представляют собой аргинин, лизин, треонин, аланин, аспарагин и глутамин. Особый интерес представляют гидрофильные аминокислоты аспартат, глутамат, серин и глицин. Примеры "гидрофобных аминокислот" представляют собой триптофан, тирозин, фенилаланин, метионин, лейцин, изолейцин и валин.

"Фрагмент" в применении к протеину, представляет собой процессированную форму природного биологически активного протеина, который сохраняет по меньшей мере часть терапевтической и/или биологической активности. "Вариант", в применении к протеину, представляет собой протеин с гомологией последовательностей с природному биологически активному протеину, который сохраняет по меньшей мере часть терапевтической и/или биологической активности биологически активного протеи-

на. Например, альтернативный протеин может разделять по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности аминокислотной последовательности, по сравнению с соответствующим биологически активным протеином. Как используется в данном документе, термин "биологически активный фрагмент протеина" содержит протеины, измененные преднамеренно, как например, с помощью сайт-направленного мутагенеза, синтеза кодирующего гена, вставок или случайно, через мутации.

Термин "вариант последовательности" означает полипептиды, которые были изменены, по сравнению с их природной или исходной последовательностью на одну или несколько аминокислотных вставок, делеций или замен. Вставки могут быть расположены на одном или на обоих концах белка, и/или могут быть расположены во внутренних районах аминокислотной последовательности. Не ограничивающим примером является вставка последовательности XTEN в последовательность протеина с биологически-активной функцией. В случае вариантов делеции удаляют один или несколько аминокислотных остатков полипептида, как описано в данном документе. Варианты делеции, таким образом, содержат все фрагменты функциональной полипептидной последовательности. В вариантах замены, один или несколько аминокислотный остаток полипептида удаляют и замещают на альтернативные остатки. В отдельном аспекте, замены являются консервативными по природе, а консервативные замены этого типа хорошо известны в данной области техники. Как используется в данном документе, "внутренний XTEN" соответствует последовательностям XTEN, которые вводят в последовательность фактора свертывания. Внутренний XTEN может быть построен с помощью вставки последовательности XTEN в последовательность фактора свертывания, такого как FVIII, либо с помощью вставки между двумя соседними аминокислотами в домене ("внутридоменный") или между двумя доменами ("междоменный") фактора свертывание, или при этом XTEN частично заменяет внутреннюю последовательность фактора свертывания.

Как используется в данном документе, "концевой XTEN" соответствует последовательности XTEN, которая была слита с или в N- или C-концом фактора свертывания или с протеолитической последовательностью расщепления или линкером на N- или C-концц фактора свертывания. Концевой XTEN может быть слитым с природным концом фактора свертывания. Кроме того, концевой XTEN может заменить часть концевой последовательности фактора свертывания.

Термин "сайт секретирования XTEN" соответствует последовательности расщепления гибридных белков CFXTEN, которые могут быть распознаны и расщеплены протеазами млекопитающего, влияя на секретирование XTEN или части XTEN из гибридного белка CFXTEN. Как используется в данном документе, "протеаза млекопитающего" означает протеазу, которая, как правило, существует в жидкостях организма, клетках или тканях млекопитающих. Сайты секретирования XTEN могут быть разработаны для расщепления различными протеазами млекопитающих (также известные как "протеазы секретирования XTEN"), такие как FXIa, FXIIa, калликреин, FVIIIa, FVIIIa, FXa, FIIa (тромбин), эластаза-2, MMP-12, MMP13, MMP-17, MMP-20 или любая протеаза, которая присутствует в процессе свертывания. Могут быть использованы другие эквивалентные протеазы (эндогенные или экзогенные), которые способны распознавать определенный сайт расщепления. Сайты расщепления могут быть скорректированы и адаптированы к используемым протеазам.

Термин "в пределах", если соответствует первому полипептиду, который является связанный со вторым полипептидом, охватывает соединение, которое соединяет N-конец первого или второго полипептида с C-концом второго или первого полипептида, соответственно, а также вставку первого полипептид в последовательность второго полипептид. Например, если XTEN связан "в пределах" домена полипептида фактора VIII, XTEN может быть связан с N-концом, C-концом, или может быть введен в указанный домен.

Как используется в данном документе, термин "сайт", если используется по отношению к инсерционному сайту XTEN в пределах, или с, биологического полипептида, такого как фактор VIII, представляет положение аминокислоты, в котором связан XTEN. Когда описаны пронумерованные сайты, такие как первый, второй, третий, четвертый, пятый или шестой сайт вставки XTEN в пределах, или в, фактора VIII, каждый сайт понимают как представляющий особый сайт фактора VIII; например, второй сайт представляет собой расположение в факторе VIII, отличное от первого сайта, третий сайт является отличным от второго и первого, и т.д.

"Активность" или "прокоагулянтная активность" в применении к форме(ам) полипептида CFXTEN, представленной в данном документе, соответствует способности связываться с целевым субстратом коагулирующего протеина или кофактора и обеспечивает случай свертывания, будь то измеренной с помощью in vitro, ex vivo, либо in vivo анализа. Подобные анализы содержат, но без ограничения ими, одноэтапные анализы коагулирующих активности, двухэтапные анализы коагулирующей активности, хромогенные анализы и анализы ELISA. "Биологическая активность" соответствует in vitro или in vivo биологической функции или влиянию, которое содержит, но без ограничения ими, либо связывание рецептора или лиганда, либо влияние на свертывание, как правило, известное в данной области техники в случае фактора свертывания FVIII, или клеточного, физиологического или клинического ответа, который содержит остановку случая кровотечения.

Как используется в данном документе, термин "ELISA" соответствует ферментному иммуносорбентному анализу, как описано в данном документе, или как иначе известно в данной области техники.

"Клетка-хозяин" содержит отдельную клетку или культуру клеток, которая может быть или была реципиентом для зависимых векторов. Клетки-хозяева содержат потомство отдельной клетки-хозяина. Потомство может быть не обязательно полностью идентичным (по морфологии или генетически от общего комплемента ДНК) первоначальной родительской клетке за счет естественной, случайной или преднамеренной мутации. Клетка-хозяин содержит клетки, трансфицированные в естественных условиях с вектором по данному изобретению.

"Изолированный" ("выделенный"), если используется для описания различных полипептидов, раскрытых в данном документе, означает полипептид, который был идентифицирован и отделен и/или выделен из компонента его природной среды. Загрязняющие компоненты его природного окружение представляют собой вещества, которые обычно мешают диагностическим или терапевтическим применениям полипептида и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. Как очевидно специалистам в данной области, не встречающийся в природе полинуклеотид, пептид, полипептид, белок, антитело или его фрагменты, не требует "изолирования", чтобы отличить его от природного аналога. Кроме того, "концентрированный", "отделенный" или "разбавленный" полинуклеотид, пептид, полипептид, протеин, антитело, или их фрагменты, отличается от его природного аналога тем, что концентрация или число молекул в единице объема, как правило, больше, чем в его встречающейся в природе копии. В общем, полипептид, созданный с помощью рекомбинантного способа и экспрессированный в клетку-хозяин, считается "изолированным".

"Изолированный" полинуклеотид, или кодирующий полипептид нуклеотид, или другой кодирующий полипептид нуклеотид, представляет собой молекулу нуклеотида, которую определяют и отделяют от по меньшей мере одной загрязняющей молекулы нуклеотида, с которой она обычно связана в природном источнике кодирующего полипептид нуклеотида. Изолированная молекула кодирующего полипептид нуклеотида отличается по форме или условиям, от той, которая существует в природных клетках. Изолированный молекулы кодирующего полипептид нуклеотида, таким образом, отличаются от конкретной кодирующей полипептид молекулы нуклеиновой кислоты, как она существует в природных клетках. Несмотря на это, изолированная молекула кодирующего полипептид нуклеотида содержит молекулы кодирующего полипептид нуклеотида, содержащиеся в клетках, которые обычно экспрессируют полипептид, если, например, молекула нуклеотида находится в хромосомном или внехромосомном расположении, отличном от такового в природных клетках.

"Слитый" протеин содержит по меньшей мере один слитый полипептид, который содержит по меньшей мере одну область в последовательности в положении, отличном от того, который встречается в природе. Области могут, как правило, существовать в раздельных протеинах и объединяются в слитый полипептид; или они могут нормально существовать в том же протеине, но размещены в новой компоновке в слитом полипептиде. Слитый протеин может быть создан, например, с помощью химического синтез или с помощью создания и транслирования полинуклеотида, в котором пептидные области закодированы в нужном соотношении.

"Конъюгированный", "связанный", "слитый" и "гибридный" используют в данном документе взаимозаменяемо. Эти термины относятся к соединению вместе двух или более химических элементов, последовательностей или компонентов любыми способами, которые содержат химическое конъюгирование или рекомбинантные способы. Например, промотор или энхансер функционально связан с кодирующей последовательностью, если он влияет на транскрипцию последовательности. Как правило, "функционально связанный" означает то, что последовательности DNA, будучи связанными, являются смежными, и в фазе считывания или внутри рамки считывания. "Слияние внутри рамки считывания" относится к соединению двух или более открытых рамок считывания (ORF) с образованием непрерывной длительный ORF, таким образом, что поддерживают правильную рамку считывания исходных ORF. Таким образом, получаемые рекомбинантный гибридный белок представляет собой отдельный протеин, который содержит два или более сегмента, которые соответствуют полипептидам, кодируемым исходным ORF (сегменты которые обычно соединены не так, как в природе).

В контексте полипептидов, "линейная последовательность" или "последовательность" представляет собой порядок аминокислот в полипептиде в направлении от N- к С-концу, в котором остатки, которые граничат друг с другом в последовательностях, являются смежными в первичной структуры полипептида. "Частичная последовательность" представляет собой линейную последовательность части полипептида, которая, как известно, содержит дополнительные остатки в одном или обоих направлениях.

"Гетерологический" означает полученный из объекта, генотипически отличного от другого объекта, с которым его сравнивают. Например, богатая глицином последовательность, удаленная из его природной кодирующей последовательности и функционально связанная с кодирующей последовательностью, отличной от природной последовательности, является гетерологической богатой глицином последовательностью. Термин "гетерологический" в применении к полинуклеотиду, полипептиду, означает что полинуклеотид или полипептид получают из объекта, генотипически отличного от другого объекта, с которым его сравнивают.

Термины "полинуклеотиды", "нуклеотиды", "нуклеиновые кислоты" и "олигонуклеотиды" используют взаимозаменяемо. Они относятся к полимерной форме нуклеиновых кислот любой длины, либо

дезоксирибонуклеиновых кислот, либо рибонуклеиновых кислот, или их аналогов. Полинуклеотиды могут иметь любую трехмерную структуру и могут выполнять любую функцию, известную или неизвестную. Ниже приведены неограничивающие примеры полинуклеотидов: кодирующие или некодирующие области гена или фрагмента гена, локусы (локус) определяют из анализа сцепления, экзонов, интронов, матричной RNA (mRNA), транспортной RNA, рибосомальной RNA, рибозимов, cDNA, рекомбинантных полинуклеотидов, разветвленных полинуклеотидов, плазмидов, векторов, изолированной DNA любой последовательности, изолированной RNA любой последовательности, зонда для нуклеиновой кислоты и праймеров. Полинуклеотид может составлять измененные нуклеиновые кислоты, такие как метилированные нуклеиновые кислоты и аналоги нуклеотида. Если присутствует, модификация структуры нуклеотида может быть осуществлена перед или после сборкой полимера. Последовательность нуклеиновых кислот может прерываться ненуклеотидными компонентами. Полинуклеотид может быть дополнительно изменен после полимеризации, например, путем конъюгации с меченым компонентом.

Термин "комплемент полинуклеотида" означает молекулу полинуклеотида, имеющую комплементарную последовательность оснований и обратную ориентацию, по сравнению с эталонной последовательностью, так, что она может гибридизоваться с эталонной последовательности с полной точностью.

"Рекомбинантный" в применении к полинуклеотиду означает то, что является продуктом различных комбинаций этапов in vitro клонирования, рестрикции и/или лигирования, и других способов, которые приводят к конструкции, которая потенциально может быть выражена в виде рекомбинантного белка в клетке-хозяине.

Термины "ген" и "фрагмент гена" в данном документе используют взаимозаменяемо. Они относятся к полинуклеотиду, который содержит по меньшей мере одну открытую рамку считывания, которая способна кодировать конкретный белок после того, как его транскрибируют и транслируют. Ген или фрагмент гена может быть геномным или cDNA, при условии, что полинуклеотид содержит по меньшей мере одну открытую рамку считывания, которая может охватывать полную кодирующую область или ее сегмент. "Слитый ген" является геном, который состоит из по меньшей мере двух гетерологичных полинуклеотидов, которые связаны друг с другом.

"Гомология", "гомологичный" или "идентичность последовательности" соответствует сходству последовательности или взаимозаменяемости между двумя или более полинуклеотидными последовательностями, или между двумя или более полипептидная последовательности. При использовании для определения идентичности последовательности, сходства или гомологии между двумя различными аминокислотными последовательностями такой программы, как BestFit, могут быть использованы настройки по умолчанию или для оптимизации результатов идентичности, сходства или гомологии может быть выбрана соответствующая матрица замен, такая как blosum45 или blosum80. Предпочтительно, полинуклеотиды, которые являются гомологичными, представляют собой таковые, которые гибридизуются в жестких условиях, как определено в данном документе, и имеют по меньшей мере 70%, предпочтительно, по меньшей мере 80%, более предпочтительно, по меньшей мере 90%, еще более предпочтительно, 95%, наиболее предпочтительно 97%, еще наиболее предпочтительно, 98%, и еще наиболее предпочтительно 99% идентичности последовательности, по сравнению с теми последовательностями. Полипептиды, которые являются гомологичными, предпочтительно имеют идентичности последовательности, которые составляют по меньшей мере 70%, предпочтительно, по меньшей мере 80%, более предпочтительно, по меньшей мере 90%, еще более предпочтительно, по меньшей мере 95-99%, и наиболее предпочтительно, на 100% идентичны.

"Лигирование" соответствует способу образования фосфодиэфирных связей между двумя нуклеотидными фрагментами или генами, связывая их вместе. Для лигирования фрагментов DNA или генов вместе, концы DNA должны быть совместимы друг с другом. В некоторых случаях, концы будут совместимы непосредственно после расщепления эндонуклеазой. Несмотря на это, может быть необходимо, чтобы сначала преобразовать липкие концы, обычно получаемые после расщепления эндонуклеазой, до тупых концов, чтобы сделать их совместимыми для лигирования.

Термины "жесткие условия" или "жесткие условия гибридизации" содержат ссылку на состояния, при которых полинуклеотид будет гибридизоваться до его целевой последовательности, к детектируемо более высокой степени, чем другие последовательности (например, по меньшей мере в 2 раза выше фона). Как правило, точность гибридизации выражают, в частности, по отношению к температуре и концентрации соли, при которой выполняют этап промывания. Обычно, жесткими условиями будут те, в которых концентрация соли составляет менее около 1,5 M иона Na, как правило, концентрация иона Na (или других солей) составляет от около 0,01 до 1,0 M при pH от 7,0 до 8,3 и температура составляет по меньшей мере около 30°C в случае коротких полинуклеотидов (например, от 10 до 50 нуклеиновых кислот) и по меньшей мере около 60°C в случае длинных полинуклеотидов (например, больше 50 нуклеиновых кислот) - например, "жесткие условия" могут содержать гибридизацию в 50% формамиде, 1 M NaCl, 1% SDS при 37°C, и три промывания, по 15 мин каждое, в 0,1 × SSC/l% SDS при от 60°C до 65°C. Кроме того, могут использовать температуры около 65°C, 60°C, 55°C или 42°C. Концентрация SSC может изменяться от около 0,1 до 2×SSC, с SDS, которая находится около 0,1%. Подобные температуры

промывания, как правило, выбирают от около 5 до 20°C ниже точки плавления конкретной последовательности при определенной ионной силе и значении pH. Tm представляет собой температуру (при определенных ионной силе и pH), при которой 50% целевой последовательности гибридизуется с отлично подходящим зондом. Уравнение для расчета Tm и условий гибридизации нуклеотида хорошо известны и могут быть найдены в Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. Обычно, блокирующий вещества используют для блокирования неспецифической гибридизации. Такие блокирующие вещества содержат, например, деградированная и денатурированная DNA из молок лососевых при около 100-200 мкг/мл. Органический растворитель, такой как формамид, при концентрации около 35-50% об./об., также могут быть использованы при определенных обстоятельствах, например, в случае гибридизаций RNA:DNA. Используемые варианты этих условий промывания будут очевидны специалистам с обычной квалификацией в данной области техники.

Термины "процент идентичности", "процент идентичности последовательности" и "% идентичности", в применении к полинуклеотидной последовательности, относятся к проценту совпадений остатков между по меньшей мере двумя полинуклеотидными последовательностями, которые выравнивают с использованием стандартизированного алгоритма. Такой алгоритм может вставить, стандартизированным и воспроизводимым способом, пробелы в сравниваемые последовательности в целях оптимизации выравнивания двух последовательностей, и, следовательно, достижения более значимого сравнения двух последовательностей. Процент идентичности измеряют по длине определенной полинуклеотидной последовательности объекта, или измеряют по меньшей длине, например, по длине фрагмента, которую получают из наибольшей определенной полинуклеотидной последовательности, например, фрагмента из по меньшей мере 45, по меньшей мере 60, по меньшей мере 90, по меньшей мере 120, по меньшей мере 150, по меньшей мере 210 или по меньшей мере 450 смежных остатков. Такие длины являются только иллюстративными и следует понимать, что любая длина фрагмента, основанная на последовательностях, представленных в данном документе, в таблицах, фигурах или списке последовательностей, может быть использована для описания длины, на которой может быть измерен процент идентичности. Процент идентичности последовательности рассчитывают с помощью сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, определяя количество совпадающих положений (в которых идентичные остатки встречаются в обеих полипептидных последовательностей), деления количества совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения (т.е. размер окна) и умножения результата на 100 для получения процента идентичности последовательностей. Если необходимо сравнивать последовательности с различными длинами, самая короткая последовательность определяет длину окна сравнения. При расчете идентичности последовательности консервативные замены не учитывают.

"Процент (%) идентичности последовательности", по отношению к полипептидным последовательностям, определенным в данном документе, определяют как процент аминокислотных остатков в искомой последовательности, которая идентична аминокислотным остаткам второй, контрольной полипептидной последовательности или ее части, после выравнивания последовательностей и введения пробелов, при необходимости, для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и без учета любых консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивание в целях определения процента идентичности последовательностей аминокислот может быть достигнуто различными способами, которые известны специалистам в данной области техники, например, с использованием общедоступного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Процент идентичности может быть измерен по всей длине определенной полипептидной последовательности или может быть измерен по меньшей длине, например, по длине фрагмента, взятого из большей, определенной полипептидной последовательности, например, ее фрагмента, из по меньшей мере 15, по меньшей мере, 20, по меньшей мере, 30, по меньшей мере, 40, по меньшей мере, 50, по меньшей мере 70 или по меньшей мере 150 смежных остатков. Подобные длины являются только иллюстративными, и следует понимать, что любая длина фрагмента, представленная последовательностями, показанными в данном документе, в таблицах, фигурах или списке последовательностей, может быть использована для описания длины, для которой может быть измерен процент идентичности.

Термин "неповторяемость", который используют в данном документе в контексте полипептида, относится к отсутствию или ограничению степени внутренней гомологии в пептиде или полипептидной последовательности. Термин "по существу неповторяющийся" может означать, например, что есть несколько, или совсем нет, экземпляров четырех смежных аминокислот в последовательности, которые представляют собой идентичные типы аминокислот, или полипептид, которая имеет количество подпоследовательностей (определяется ниже) равное 10 или меньше, или что не существует паттерна в порядке, от N- до C-конца, мотивов последовательности, которые составляют полипептидную последовательность. Термин "повторяемость", который используют в данном документе в контексте полипептида, соответствует степени внутренней гомологии в пептиде или полипептидной последовательности. В противоположность этому, "повторяющаяся" последовательность может содержать несколько идентичных

копий последовательностей коротких аминокислот. Например, полипептидная последовательность, представляющая интерес, может быть разделены на n-мерные последовательности, а количество идентичных последовательностей может быть подсчитано. Часто повторяющиеся последовательности содержат большую долю одинаковых последовательностей, в то время как не-повторяющиеся последовательности содержат несколько идентичных последовательностей. Последовательность может содержать множественные копии более коротких последовательностей, определенной или различной длины, или мотивы, в которых сами мотивы имеют не-повторяющиеся последовательности, что делает полноразмерный полипептид по существу не повторяющимся. Длина полипептида, в пределах которого измеряется не-повторяемость, может изменяться от 3 аминокислот до около 200 аминокислот, от около 6 до около 50 аминокислот, или от около 9 до около 14 аминокислот. "Повторяемость", как используют в контексте полинуклеотидной последовательности, соответствует степени внутренней гомологии в последовательности, такой как, например, частоте одинаковых нуклеотидных последовательностей данной длины. Повторяемость могут, например, измерять с помощью анализирования частоты одинаковых последовательностей.

"Вектор" представляет собой молекулу нуклеотида, предпочтительно, самореплицирующуюся в соответствующем хозяине, который транспортирует вводимую молекулу нуклеотида в, и/или между, клетки-хозяева. Термин содержит векторы, которые функционируют прежде всего в случае вставки DNA или RNA в клетку, репликации векторов, которые функционируют преимущественно в случае репликации DNA или RNA, и экспрессирующие векторы, которые функционируют в случае транскрипции и/или трансляции DNA или RNA. Кроме того, содержаться векторы, которые обеспечивают более чем одну из вышеперечисленных функций. "Экспрессирующий вектор" представляет собой полинуклеотид, который при введении в соответствующую клетку-хозяина, может транскрибироваться и транслироваться в полипептид(ы). "Экспрессирующая система" обычно обозначает подходящую клетку-хозяина, которая содержит экспрессирующий вектор, который может функционировать с получением желаемого продукта экспрессии.

"Устойчивость сыворотки к деградации" в применении к полипептиду соответствует способности полипептидов выдерживать деградацию в крови или ее компонентах, которые, как правило, содержат протеазы в сыворотке или плазме крови. Устойчивость сыворотки к деградации могут измерять с помощью объединения протеина с сывороткой или плазмой крови человека (или мыши, крысы, обезьяны, по мере необходимости), как правило, в случае различного количества дней (например, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 дней), как правило, при около 37°C. Образцы для этих временных точек могут подвергать Вестерн-блоттингу, а протеин обнаруживают с антителом. Антитело может быть к метке протеине. Если протеин в иммуноблотинге демонстрирует отдельный бэнд, при условии что размер белка является идентичным размеру впрыскиваемого белка, то никакой деградации не происходит. В этом иллюстративном способе, момент времени, когда расщепляется 50% протеина, если судить по вестерн-блоттингу или эквивалентным способам, представляет собой время полужизни сыворотки при деградации или "время полужизни в сыворотке" протеина.

Термин "$t_{1/2}$", который используют в данном документе, означает конечное время полужизни, рассчитанное как $\ln(2)/K_{el}$. K_{el} представляет собой конечную константу скорости элиминации, рассчитанную с помощью линейной регрессии линейной части log концентрации в зависимости от времени. Время полужизни, как правило, соответствует времени, которое необходимо для того, чтобы половина количества вводимого вещества, внесенного в живой организм, метаболизируют или устраняют с помощью обычных биологических способов. Термины "$t_{1/2}$", "конечное время полужизни", "период полувыведения" и "время полужизни в кровотоке" используют в данном документе взаимозаменяемо.

"Активный клиренс" означает механизмы, с помощью которых протеин удаляют из кровотока, отличные от фильтрации или свертывания, и которые содержат удаление из кровотока с помощью клеток, рецепторов, метаболизма или деградации белка.

"Коэффициент средней молекулярной массы" и "средняя молекулярная масса" представляют собой связанные термины, относящиеся к степени относительного увеличения или уменьшения кажущейся молекулярной массы, проявляемой определенной аминокислотной последовательностью. Среднюю молекулярную массу определяют с помощью гель-проникающей хроматографии (SEC) или схожих способов, с помощью сравнения со стандартами глобулярных белков, и измеряют в единицах "кажущиеся кДа". Коэффициент средней молекулярной массы представляет собой отношение между кажущейся молекулярной массой и фактической молекулярной массой; последнюю прогнозируют с помощью добавления, основываясь на композиции аминокислоты, рассчитанной молекулярной массой каждого типа аминокислоты в композиции или с помощью оценивания в сравнении со стандартами молекулярной массы в гель-электрофорезе SDS.

Термины "гидродинамический радиус" или "радиус Стокса" представляют собой эффективный радиус (R_h в нм) молекулы в растворе, измеренной при условии, что это тело движется через раствор и испытывает сопротивление вязкости раствора. В вариантах осуществления настоящего изобретения измерения гидродинамического радиуса гибридных белков XTEN коррелирует с "коэффициентом кажущейся молекулярной массы", который является более интуитивной мерой. "Гидродинамический радиус" про-

теина влияет на его скорость диффузии в водном растворе, а также на его способность проникнуть в гели макромолекул. Гидродинамический радиус протеина определяют с помощью его молекулярной массы, а также по его структуре, в том числе форме и компактности. Способы определения гидродинамического радиуса хорошо известны в данной области техники, например с использованием гель-проникающей хроматографии (SEC), как описано в патентах США № 6406632 и 7294513. Большинство белков имеют шаровидную структуру, которая является самой компактной трехмерной структурой белка, которую он может иметь с наименьшим гидродинамическим радиусом. Некоторые белки принимают случайную и открытую, неструктурированную или "линейную" конформации, и в результате имеют значительно больший гидродинамический радиус, по сравнению с типичными глобулярными белками аналогичной молекулярной массы.

"Физиологические условия" относятся к набору условий в живом хозяине, а также к условиям в пробирке, в том числе температуре, концентрации соли, pH, которые имитируют эти условия живого субъекта. Было создано множество физиологически соответствующих условий для использования в in vitro анализах. Как правило, физиологический буфер содержит физиологическую концентрацию соли и доводят до нейтрального pH в диапазоне от около 6,5 до около 7,8, и предпочтительно от около 7,0 до около 7,5. Множество физиологических буферов приведены в Sambrook et al. (2001). Физиологически соответствующая температура изменяется в диапазоне от около 25°C до около 38°C, и предпочтительно от около 35°C до около 37°C.

"Функциональная группа" представляет собой химическую структуру, которая может быть соединена со второй функциональной группой. Примеры функциональных групп представляют собой аминогруппы, карбоксильные группы, сульфгидрильные группы, гидроксильные группы, альдегидные группы, азидные группы. Некоторые функциональные группы могут быть активированы, чтобы облегчить связь со второй функциональной группой. Неограничивающими примерами активации являются реакция карбоксильной группы с карбодиимидом, превращение карбоксильной группы в активированный сложный эфир или превращение карбоксильной группы в функцию азида.

"Средство с контролируемым высвобождением", "средство замедленного действия", "депо-композиция" и "средство с замедленным высвобождением" используют взаимозаменяемо для обозначения средства, способного увеличить продолжительность высвобождения полипептида по настоящему изобретению, по сравнению с длительностью секретирования, когда полипептид вводят при отсутствии средства. Различные варианты осуществления настоящего изобретения могут иметь различные скорости секретирования, что приводит к различным терапевтическим количествам.

Термины "антиген", "целевой антиген" и "иммуноген" в данном документе используют взаимозаменяемо по отношению к структуре или детерминанте связывания, чей фрагмент антитела или терапевтическое средство на основе фрагмента антитела связано с, или обладает специфичностью по отношению к, нему.

Термин "полезная нагрузка", который используют в данном документе, соответствует протеиновой или пептидной последовательности, которая имеет биологическую или терапевтическую активность; аналог фармакофора малых молекул. Примеры полезных нагрузок содержат, но без ограничения ими, факторы свертывания, цитокины, энзимы, гормоны и факторы крови и роста.

Термин "антагонист", который используют в данном документе, содержат любую молекулу, которая частично или полностью блокирует, подавляет или нейтрализует биологическую активность нативного полипептида, раскрытого в данном документе. Способы идентификации антагонистов полипептида могут содержать контактирование природного полипептида с молекулой кандидата антагониста и измерение обнаруживаемого изменения одной или нескольких биологических активностей, обычно связанных с нативным полипептидом. В контексте настоящего изобретения антагонисты могут включать в себя белки, нуклеиновые кислоты, углеводы, антитела или любые другие молекулы, которые уменьшают эффект биологически активного протеина.

Термин "агонист", который используют в самом широком смысле, содержит любую молекулу, которая имитирует биологическую активность нативного полипептида, раскрытого в данном документе. Подходящие молекулы агонистов, в частности, содержат агониста антитела или фрагменты антител, фрагменты или варианты аминокислотной последовательности нативных полипептидов, пептидов, небольшие органические молекулы и т.д. Способы определения агонистов природного полипептида могут содержать взаимодействие природного полипептида с молекулой-кандидатом агониста и измерение детектируемого изменения одной или нескольких биологических активностей, обычно связанных с природным полипептидом.

Как используется в данном документе, "лечить" или "лечение", или "смягчение" или "улучшение" используют взаимозаменяемо и это означает введение лекарственного средства или биологического средства для достижения терапевтического эффекта, чтобы вылечить или уменьшить тяжесть существующего заболевания или для достижения профилактического эффекта, предотвращения или снижения вероятности появления или тяжести возникновение заболевания. Под терапевтический эффектом подразумевают ликвидацию или уменьшение интенсивности базового заболевания, подлежащего лечению, либо одного или более физиологических симптомов, связанных с причиной, так, что улучшение наблю-

дается у субъекта, несмотря на то, что субъект может все еще быть поражен основных заболеванием.

"Терапевтическое влияние" или "терапевтический эффект", как используют в данном документе, соответствует физиологическому влиянию, который содержит, но без ограничения ими, смягчение, уменьшение интенсивности, или предупреждение заболевания у людей или других животных, или иным образом повысить физическое или психическое благополучие людей или животных, в результате введения слитого белка по настоящему изобретению, кроме способности индуцировать продукцию антитела против антигенного эпитопа, которой обладает биологически активный белок. Для профилактической пользы, композиции могут быть введены субъекту с риском развития конкретного заболевания, состояния или симптома заболевания (например, кровотечение у субъекта с диагностированной гемофилией A), или субъекту, сообщающему об одном или нескольких физиологических симптомов заболевания, хотя диагноз этого заболевания, возможно, и не был поставлен.

Термины "терапевтически эффективное количество" и "терапевтически эффективная доза", которые используют в данном документе, относятся к количеству лекарственного средства или биологически активного протеина, либо отдельно или в качестве части композиции гибридного белка, которая способна иметь заметное, благоприятное воздействие на любой симптом, аспект, измеряемый параметр или характеристику болезненного состояния или заболевания при введении субъекту одной или многократными дозами. Такой эффект не должен быть абсолютным, чтобы быть выгодным. Определение терапевтически эффективного количества находится в пределах возможностей специалиста в данной области техники, особенно в свете наличия подробного описания в данном документе.

Термин "терапевтически эффективный режим дозирования", который используют в данном документе, соответствует графику последовательно вводимых нескольких доз (т.е. по меньшей мере двух или более) биологически активного протеина, либо отдельно, либо в качестве части композиции гибридного белка, при том, что дозы приведены в терапевтически эффективных количествах, чтобы привести к устойчивому благотворному влиянию на любой симптом, аспект, измеряемый параметр или характеристику болезненного состояния или заболевания.

I) Общие способы.

В практике настоящего изобретения использует, если не указано иное, обычные методы иммунологии, биохимии, химии, молекулярной биологии, микробиологии, клеточной биологии, генетики и рекомбинантной DNA, которые находятся в пределах компетентности в определенной области техники. Смотри Sambrook, J. et al., " Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001; "Current protocols in molecular biology", F. M. Ausubel, et al. eds., 1987; серии "Methods in Enzymology", Academic Press, San Diego, CA.; "PCR 2: a practical approach", M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds., Oxford University Press, 1995; "Antibodies, a laboratory manual" Harlow, E. and Lane, D. eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; "Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics", 11th Edition, McGraw-Hill, 2005; и Freshney, R.I., " Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique", 4th edition, John Wiley & Sons, Somerset, NJ, 2000, содержание которых включено в данном документе в полном объеме в виде ссылки.

II) Фактор свертывания VIII.

Настоящее изобретение относится, в частности, к композициям, которые содержат фактор свертывания фактора VIII (CF), связанный с одним или несколькими расширенными рекомбинантными протеинами (XTEN), что приводит к композиции гибридного белка CFXTEN. Как используется в данном документе, "CF" соответствует фактору VIII (FVIII) или миметикам, вариантам последовательности и процессированным вариантам FVIII, как описано ниже.

"Фактор VIII" или "FVIII" или "протеин FVIII" означает протеин фактора свертывания крови, виды (в том числе протеины FVIII человека, свиньи, собаки, крысы или мыши) и варианты их последовательности, которые содержат, но без ограничения ими одноцепочечный белок-предшественник из 2351 аминокислоты (с гидрофобной сигнальной последовательностью из 19 аминокислот), зрелый протеин кофактора фактора VIII из 2332 аминокислот с приблизительно 270-330 кДа со структурой домена A1-A2-B-A3-C1-C2, а также неферментативный "активный" или форма кофактора FVIII (FVIIIa), который представляет собой циркулирующий гетеродимер из двух цепей, которые образуют в результате протеолитического расщепления после R1648 формы тяжелой цепи, состоящей из A1-A2-B (в пределах 90-220 kD) 1-1648 аминокислот (нумерация относительно зрелой формы FVIII) и легкая цепь A3-C1-C2 в 80 кДа 1649-2232 аминокислот, каждая из который схематически проиллюстрирована на фиг. 1. Кроме того, и как он использован здесь, каждый домен из A1, A2 и A3 охватывает кислые участки-спейсеры; кислые области a1, a2, и a3 соответственно. Таким образом, следует понимать, что конструкции CFXTEN, описанные как имеющие домены A1, A2, A3, B, C1 и C2 содержат кислые области a1, a2 и a3. Как используется в данном документе, "фактор VIII" или "FVIII" или "полипептид FVIII" также содержит формы варианта, который содержит протеины с заменами, добавлениями и/или делециями до тех пор, пока вариант сохраняет требуемую биологическую активность, такую как прокоагулянтная активность. Были построены огромные количества вариантов функционального FVIII и могут быть использованы в качестве рекомбинантных протеинов FVIII, как описано в данном документе. Смотри PCT заявки с № WO 2011/069164 A2, WO 2012/006623 A2, WO 2012/006635 A2 или WO 2012/006633 A2, все из которых

включены в данном документе в виде ссылки во всей их полноте. Известны очень многие функциональные варианты FVIII. Кроме того, у больных гемофилией были идентифицированы сотни нефункциональных мутаций FVIII. Смотри, например, Cutler et al., Hum. Mutat. 19:274-8 (2002), включенный в данном документе в виде ссылки во всей своей полноте. Кроме того, сравнения между FVIII от человека и других видов определили консервативные остатки, которые могут потребоваться для функционирования. Смотри, например, Cameron et al., Thromb. Haemost. 79:317-22 (1998) и US 6251632, включенные в данном документе в виде ссылки во всей их полноте.

В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения домены фактора VIII человека определяют с помощью следующих аминокислотных остатков: A1, остатки Ala1-Arg372; A2, остатки Ser373-Arg740; B, остатки Ser741-Arg1648; A3, остатки Ser1649-Asn2019; C1, остатки Lys2020-Asn2172; C2, остатки Ser2173-Tyr2332. Последовательность A3-C1-C2 содержит остатки Ser1649-Tyr2332. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения остатки Arg336-Arg372 обычно соответствуют области a1, а Arg372 расщепляют помощью тромбина. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения область a2 представляет собой часть домена A1. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения остатки Glu1649-Arg1689 соответствуют кислой области a3. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения кислый область a3 представляет собой часть домена A3. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения природный протеин FVIII имеет следующую формулу: A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2, где A1, a2 и a3 представляют собой структурно родственные "домены A", B представляет собой "домен B", C1 и C2 представляют собой структурно родственные "домены C", и a1, a2 и a3 представляют собой кислые участки-спейсеры. В приведенной выше формуле и со ссылкой на первичное положение аминокислотной последовательности на фиг. 30, домен A1 FVIII человека распространен от Ala1 до около Arg336, участок-спейсер a1 распространяется от около Met337 до около Arg372, домен A2 распространяется от около Ser373 до около Tyr719, участок-спейсер a2 распространяется от около Glu720 до около Arg740, домен B распространяется от около Ser741 до около Arg1648, участок-спейсер a3 распространяется от около Glu1649 до около Arg1689, домен A3 распространяется от около Ser1690 до около Asn2019, домен C1 распространяется от около Lys2020 до около Asn2172, и домен C2 распространяется от около Ser2173 до Tyr2332 (Saenko et al., 2005, J Thromb Hemostasis, 1, 922-930). Кроме конкретных протеолитических сайтов расщепления, обозначение мест расположения границ между доменами и регионов фактора VIII в разных литературных источниках может варьироваться. Границы отмеченные здесь, поэтому обозначены как приблизительное с использованием термина "около".

Такой фактор VIII содержит процессированные последовательности, такие как последовательности "BDD" без B-доменов, в которых удаляют часть или большую часть последовательности домена B (такой как последовательности BDD, раскрытые или описанные в патентах США № 6818439 и 7632921). Пример FVIII BDD представляет собой REFACTO® или XYNTHA® (рекомбинантный BDD FVIII), который содержит первый полипептид, соответствующий аминокислотам от 1 до 743 на фиг. 30, слитый со вторым полипептидом, соответствующим аминокислотам от 1638 до 2332 на фиг. 30. Иллюстративные конструкции BDD FVIII, которые могут быть использованы для получения рекомбинантных белков по настоящему изобретению содержат, но без ограничения ими, FVIII с делецией аминокислот, соответствующих аминокислотам 747-1638 зрелого FVIII человека (фиг. 30) (Hoeben R.C., et al. J. Biol. Chem. 265 (13): 7318-7323 (1990), включенные в данном документе в виде ссылки во всей их полноте), и FVIII с делецией аминокислоты, соответствующей аминокислотам 771-1666 или аминокислотам 868-1562 зрелого человека FVIII (фиг. 30) (Meulien P., et al. Протеин Eng. 2(4): 301-6 (1988), включенные в данном документе в виде ссылки во всей их полноте).

Кроме того, последовательности, которые содержат гетерологические аминокислотные вставки или замены (например, аспарагиновую кислоту заменяют на валин в положении 75), или одноцепочечный FVIII (scFVIII), в котором тяжелая и легкая цепи ковалентно соединены с помощью линкера. Как используется в данном документе, "FVIII" должен быть любой функциональной формой молекулы фактора VIII с типичными характеристиками фактора свертывания крови VIII, способного изменять недостатки фактора VIII человека, при введении такому субъекту, например, субъекту с гемофилией A. FVIII или варианты последовательности изолируют, определяют и клонируют, как описано в патенте США или заявках № 4757006; 4965199; 5004804; 5198349, 5250421; 5919766; 6228620; 6818439; 7138505; 7632921; и 20100081615. Фактор VIII человека кодируют с помощью однокопийного гена, который расположен на кончике длинного плеча X-хромосомы (q28). Он содержит около 186000 пар оснований (bp) и составляет приблизительно 0,1% X-хромосомы (White, G.C. и Shoemaker, C.B., Blood (1989) 73:1-12). Аминокислотную последовательность FVIII человека расшифровывают из cDNA, как показано в патенте США № 4965199, который приведен в данном документе в виде ссылки во всей своей полноте. Природный зрелый FVIII человека, полученный из последовательности cDNA (т.е. без секреторного сигнального пептида, но перед другим посттрансляционным процессингом), проиллюстрирован на фиг. 3.

Зрелый фактор VIII mRNA, кодирующий DNA, находится в 26 отдельных экзонах размером от 69 до 3106 п.о. 25 областей промежуточного интрона разделяют диапазон экзонов по размеру от 207 до 32400 п.о. Полный ген состоит из приблизительно 9 т.п.н. экзона и 177 т.п.н. интрона. Три повторяю-

щихся домена A имеют приблизительно 30% гомологии последовательности. Домен B содержит 19 из приблизительно 25 прогнозируемых гликозилированных сайтов, а домен A3, как полагают, содержит сайт связывания фактора фон Виллебранда. Спаренные домены C идут следом за доменом A3 и имеют приблизительно 37% гомологии друг с другом (White, G.C. и Shoemaker, C.B., Blood (1989) 73:1-12).

Домен B разделяет домен A2 и A3 природного фактор FVIII во вновь синтезированной одночепочечной молекуле предшественнике. По различным данным точные границы домена B продолжаются от 712 до 1648 аминокислоты последовательности предшественника (Wood et al., Nature (1984) 312:330-337) или 741-1648 аминокислоты (Pipe, SW, Haemophilia (2009) 15:1187-1196 и патент США №. 7560107) или аминокислоты 740-1689 (Toole, JJ. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:5939-5942). Как используется в данном документе, "домен B" означает аминокислоты 741-1648 зрелого фактора VIII. Как используется в данном документе, "делеция домена B FVIII" или "FVIII BDD" означает последовательность FVIII с удаленной любой аминокислоты, фрагмента или всех аминокислот от 741 до 1648. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения FVIII варианты BDD сохраняют оставшиеся аминокислоты домена B с N-конца ("B1", как используется в данном документе) и C-конца ("B2", как используется в данном документе). В отдельном варианте BDD FVIII, оставшиеся аминокислоты домена B представляют собой SFSQNPPVLKRHQR (SEQ ID NO: 1614). В отдельном варианте BDD FVIII, остаток B1 представляет собой SFS, а остаток B2 представляет собой QNPPVLKRHQR (SEQ ID NO: 1615). В дополнительном варианте BDD FVIII, остаток B1 представляет собой SFSQN (SEQ ID NO: 1616), а остаток B2 представляет собой PPVLKRHQR (SEQ ID NO: 1617). "Фактор VIII без B-домена", "FVIII", или "BDD FVIII" могут иметь полные или частичные делеции, раскрытый в патентах США № 6316226, 6346513, 7041635, 5789203, 6060447, 5595886, 6228620, 5972885, 6048720, 5543502, 5610278, 5171844, 5112950, 4868112 и 6458563, каждый из которых приведен в данном документе в виде ссылки во всей своей полноте. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность фактора VIII без домена B по настоящему изобретению содержит любую из делеций, раскрытых в кол. 4, линия 4 до кол. 5, линия 28 и примерах 1-5 патента США № 6316226 (а также в US 6346513). В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения фактор VIII без B-доменов представляет собой S743/Q1638 фактор VIII без B-доменов (вариант SQ фактора VIII) (например, фактор VIII, который имеет делецию от аминокислоты 744 до аминокислоты 1637, например, фактор VIII, который имеет аминокислоты 1-743 и аминокислоты 1638-2332 непроцессированного фактора VIII). В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения фактор VIII без B-домена по настоящему изобретению имеет делецию, раскрытую в кол. 2, линии 26-51 и примерах 5-8 патента США № 5789203 (также патента США 6060447, патента США 5595886 и патента США 6228620). В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения фактор VIII без B-домена имеет делецию, описанную в кол. 1, линии 25 до кол. 2, линия 40 патента США № 5972885; кол. 6, линии 1-22 и пример 1 патента США № 6048720; кол. 2, линии 17-46 патента США № 5543502; кол. 4, линия 22 до кол. 5, линия 36 патента США № 5171844; кол. 2, линии 55-68, фиг. 2, и пример 1 патента США № 5112950; кол. 2, линия 2 до кол. 19, линия 21 и табл. 2 патента США № 4868112; кол. 2, линия 1 до кол. 3, линия 19, кол. 3, линия 40 до кол. 4, линия 67, кол. 7, линия 43 до кол. 8, линия 26, и кол. 11, линия 5 до кол. 13, линия 39 патента США № 7041635; или кол. 4, линии 25-53, патента США № 6458563. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения фактор VIII без B-домена имеет делецию большинства доменов B, но все еще содержит амино-концевые последовательности домена B, которые являются естественными в случае in vivo протеолитической обработки продукта первичной трансляции в две полипептидные цепи, как раскрыто в WO 91/09122, который приведен в данном документе в виде ссылки во всей своей полноте. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения фактор VIII без B-домена с делецией аминокислот 747-1638, т.е. виртуально полная делеция домена B. Hoeben R.C., et al. J. Biol. Chem. 265 (13): 7318-7323 (1990), включенный в данный документ в виде ссылки во всей своей полноте. Фактор VIII без B-домена может также содержать делецию аминокислот 771-1666 или аминокислот 868-1562 фактора VIII. Meulien P., et al.. Protein Eng. 2(4): 301-6 (1988), включенный в данный документ в виде ссылки во всей своей полноте. Дополнительный домен B делеции, который является частью настоящего изобретения, содержит: делецию аминокислот от 982 до 1562 или от 760 до 1639 (Toole et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1986) 83, 5939-5942)), от 797 до 1562 (Eaton, et al. Biochemistry (1986) 25:8343-8347)), от 741 до 1646 (Kaufman (опубликованная PCT заявка № WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver, et al., DNA (1987) 6:553-564)), от 741 до 1648 (Pasek (PCT заявка №88/00831)), или от 816 до 1598 или от 741 до 1648 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988) No 82:16-25, EP 295597)), каждый из которых приведен в данном документе в виде ссылки во всей своей полноте. Каждая из предыдущих делеций может быть сделана в любой последовательности фактора VIII, используемого в вариантах осуществления настоящего изобретения.

Протеины, которые участвуют в свертывании, содержат фактор I, фактор II, фактор III, фактор IV, фактор V, фактор VI, фактор VII, фактор VIII, фактор IX, фактор X, фактор XI, фактор XII, фактор XIII, протеин C и тканевой фактор (сообща или независимо "свертывающий протеин(ы)"). Взаимодействие основных белков свертывания на внутренних и внешних путях свертывания показаны на фиг. 2. Большая часть протеинов свертывания присутствуют в зимогенной форме, но при активации, проявляют прокоагулирующую протеазную активность, в которой они активируют другие протеины свертывания, которые

способствуют внутреннему или внешнему пути свертывания и образованию тромба. Во внутреннем пути каскада свертывания, FVIII ассоциируется с комплексом активированного фактора IX, фактора X, кальция и фосфолипида. Гетеродимер фактора VIII не имеет энзиматической активности, но гетеродимер становится активным в качестве кофактора фактора IXa после протеолитической активации с помощью тромбина или фактора Xa, с активностью фактора VIIIa, который характеризуется своей способностью образовывать мембранный участок связывания в случае факторов IXa и X в конформации, подходящей для активации фактора X с помощью фактора IXa. После расщепления тромбином, активированный FVIII (FVIIIa) диссоциирует от фактора фон Виллебранда и связывается с отрицательно заряженным фосфолипидом PL, а полученный комплекс участвует в качестве кофактора фактора IXa в активизация комплекса фактора X (теназа). В пределах домена C2 и аминокислотных остатков от 1649 до 1689 в домене A3 находятся связывающие фактор фон Виллебранда (vWF) сайты, которые действуют в комплексе с фактором фон Виллебранда, в результате чего циркулирующий комплекс защищает FVIII от быстрой деградации в крови (Weiss HJ, et al. Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor. Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebrand's disease. J Clin Invest (1977) 60:390).

Активированный фактор VIII представляет собой гетеротример, который состоит из домена A1, домена A2 и легкой цепи, которая содержит домены A3-C1-C2. Активацию фактора IX выполняют с помощью двухэтапного удаления активационного пептида (Ala 146-Arg 180) из молекулы (Bajaj et al., Human factor IX and factor IXa, in METHODS IN ENZYMOLOGY. 1993). Первое расщепление производится на сайте Arg 145-Ala 146 с помощью либо фактора Xia, либо фактора VIIa/тканевого фактора. Второе, и скорость-лимитирующее расщепление производится на сайте Arg 180-Val 181. Активация удаляет 35 остатка. Активированный фактор IX человека существует в виде гетеродимера C-концевой тяжелой цепи (28 кДа) и N-концевой легкой цепи (18 кДа), которые удерживаются вместе с помощью одного дисульфидного мостика, прикрепляющего энзим к домену Gla. Фактор IXa в свою очередь активирует фактор X во взаимодействии с активированным фактором VIII. Кроме того, оба фактора IX и X могут быть активированы фактором VIIa, объединенным в комплекс с липидированным тканевым фактором, получаемым посредством внешнего пути. Фактор Xa затем участвует в итоговом общем пути, посредством чего протромбин превращается в тромбин, а тромбин, в свою очередь, превращает фибриноген в фибрин с образованием тромба.

Дефекты в процессе свертывания могут привести к нарушениям свертываемости крови (коагулопатии) в случае которых время, необходимое для образования тромба возрастает. Такие дефекты могут быть врожденными и приобретенными. Например, гемофилии A и B являются наследуемыми заболеваниями, характеризующимися недостатками в FVIII и FIX соответственно. Иными словами, биологически активный фактор VIII исправляет дефект коагуляции в плазме, полученной от индивидуумов, страдающих гемофилией A. Было показано, что рекомбинантный FVIII является эффективным и одобрен при лечении гемофилии A у взрослых и детей, а также используется для остановки кровотечений или предотвращения кровотечения, связанного с травмой и/или хирургическим вмешательством. Таковые терапевтические применения фактора VIII могут быть проблематичными при лечении индивидуумов, которые демонстрируют дефицит фактора VIII, а также индивидуумов с болезнью Виллебранда. Кроме того, индивидуумы, которые получают фактор VIII в заместительной терапии, часто вырабатываются антитела к этим белкам, которые часто уменьшают или устраняют прокоагулянтную активность связанного фактора FVIII. Продолжение лечения является чрезвычайно трудным, ввиду наличия этих антител, которые снижают или сводят на нет эффективность лечения.

В отдельном аспекте настоящее изобретение предусматривает содержание в композиции гибридного белка CFXTEN последовательностей FVIII, которые являются идентичными FVIII человека, последовательностей, которые имеют гомологию с последовательностями FVIII, последовательностей, которые являются природными, такие как от человека, приматов, млекопитающих (в том числе домашних животных), или процессированного варианта FVIII; все из которых сохраняют по меньшей мере часть прокоагулянтной активности природного FVIII и которые являются применимыми для профилактики, лечения, опосредования или улучшения гемофилии A или случая кровотечения, связанного с травмой, хирургическим вмешательством или дефицитом фактора свертывания VIII. Последовательности с гомологией с FVIII могут быть найдены с помощью стандартных методик поисковых гомологии, таких как NCBI BLAST, или в публичных базах данных, таких как Chemical Abstracts Services Databases (например, CAS Registry), GenBank, The Universal Protein Resource (UniProt) и подписок,обеспечивающих доступ к базам данных, таким как GenSeq (например, Derwent).

В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения FVIII, встроенные в композиции субъекта CFXTEN, представляют собой рекомбинантный полипептид с последовательностью, соответствующей протеину FVIII, обнаруженному в природе. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения FVIII представляют собой не-природный вариант последовательности FVIII, фрагмент, гомолог или миметик природной последовательности, которая сохраняет по меньшей мере часть прокоагулянтной активности соответствующего природного FVIII. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения FVIII представляют собой процессированный вариант с полностью или частич-

но удаленным доменом B ("FVIII BDD"), который может находиться в любой гетеродимерной форме, или может оставаться в одноцепочечном виде ("scFVIII"), позже описанном у Meulien et al., Protein Eng. (1988) 2(4):301-306. Неограничивающие примеры FVIII BDD представляют собой последовательности фактора VIII, в которых удаляют аминокислоты между остатком с номером 741 и остатком с номером 1640 (нумерация относительно нативного, зрелого FVIII), или между остатком с номером 745 и остатком с номером 1640, или между остатком с номером 745 и остатком с номером 1640, или между остатком с номером 741 и остатком с номером 1690, или между остатком с номером 745 и остатком с номером 1667, или между остатком с номером 745 и остатком с номером 1657, или между остатком с номером 747 и остатком с номером 1642, или между остатком с номером 751 и остатком с номером 1667.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения в FVIII содержатся гетерологические последовательности, который могут содержать XTEN, как более подробно описано ниже. Табл. 1 обеспечивает неограничивающий список аминокислотных последовательностей FVIII, которые охватываются слитыми белками CFXTEN по настоящему изобретению. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения FVIII, встроенные в слитые белки CFXTEN, содержат протеины, которые имеют по меньшей мере около 70% идентичности последовательности, или, альтернативно, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности последовательности, по сравнению с аминокислотной последовательность сопоставимой длины, выбранной из табл. 1.

Таблица 1

Аминокислотные последовательности FVIII

Название (источник)	**Аминокислотная последовательность**	**SEQ ID NO:**
полипептид-предшественник FVIII (человек)	MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVD ARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLG PTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQT SQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSW HSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKS VYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTL LMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAE DYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAE EEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTD ETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGIT DVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPR CLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNV ILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGY VFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYED TLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCD	1

	KNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNA TTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSL SDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTP ESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGT DNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDS KLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNAL FKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTE FKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKE GPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQ LVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRN LFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGT KNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHT AHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRS KRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYN EKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRV LFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMT GDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKV HIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKV PFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKT AFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLC SQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDED ENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVP QFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVT FRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQ HHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNP AHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPT FKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIH FSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLI GEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWA PKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFS SLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFN PPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDA QITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQV DFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQN GKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRME VLGCEAQDLY	
зрелый FVIII (человек)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVV YKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNM ASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHT YVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASA RAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIF LEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQH DGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSY KSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD FPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASG LIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQR	2

	FLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYI LSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENP GLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYL LSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRT PMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGA IDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATE LKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQL DTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKN VSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSAT NRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKN ATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKM LFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLS EKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHN QEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNV EGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLG NQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELE KRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLT RSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKK DSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSV TYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPG HLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLL DPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESN HAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRT TLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFI AAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQ PLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISY EEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAW AYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFT IFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMD TLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYK MALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVY SNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAW STKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGK KWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSI RSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATW SPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQG VKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTP VVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	
FVIII (собака)	MQVELYTCCFLCLLPFSLSATRKYYLGAVELSWDYMQSDLLSALH ADTSFSSRVPGSLPLTTSVTYRKTVFVEFTDDLFNIAKPRPPWMGLL GPTIQAEVYDTVVIVLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYEDQ TSQKEKEDDNVIPGESHTYVWQVLKENGPMASDPPCLTYSYFSHV DLVKDLNSGLIGALLVCKEGSLAKERTQTLQEFVLLFAVFDEGKS WHSETNASLTQAEAQHELHTINGYVNRSLPGLTVCHKRSVYWHVI GMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTFLMDLGQ FLLFCHIPSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEDKDYDDGLY DSDMDVVSFDDDSSSPFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYA PSGPTPNDRSHKNLYLNNGPQRIGKKYKKVRFVAYTDETFKTREAI QYESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGINYVTPLHTGR	3

	LPKGVKHLKDMPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFI NLERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQMMSDKRNVILFSVFDENR SWYLTENMQRFLPNADVVQPHDPEFQLSNIMHSINGYVFDNLQLS VCLHEVAYWYILSVGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFS GETVFMSMENPGLWVLGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCNRNIDDY YEDTYEDIPTPLLNENNVIKPRSFSQNSRHPSTKEKQLKATTTPENDI EKIDLQSGERTQLIKAQSVSSSDLLMLLGQNPTPRGLFLSDLREATD RADDHSRGAIERNKGPPEVASLRPELRHSEDREFTPEPELQLRLNEN LGTNTTVELKKLDLKISSSSDSLMTSPTIPSDKLAAATEKTGSLGPP NMSVHFNSHLGTIVFGNNSSHLIQSGVPLELSEEDNDSKLLEAPLM NIQESSLRENVLSMESNRLFKEERIRGPASLIKDNALFKVNISSVKTN RAPVNLTTNRKTRVAIPTLLIENSTSVWQDIMLERNTEFKEVTSLIH NETFMDRNTTALGLNHVSNKTTLSKNVEMAHQKKEDPVPLRAEN PDLSSSKIPFLPDWIKTHGKNSLSSEQRPSPKQLTSLGSEKSVKDQN FLSEEKVVVGEDEFTKDTELQEIFPNNKSIFFANLANVQENDTYNQ EKKSPEEIERKEKLTQENVALPQAHTMIGTKNFLKNLFLLSTKQNV AGLEEQPYTPILQDTRSLNDSPHSEGIHMANFSKIREEANLEGLGNQ TNQMVERFPSTTRMSSNASQHVITQRGKRSLKQPRLSQGEIKFERK VIANDTSTQWSKNMNYLAQGTLTQIEYNEKEKRAITQSPLSDCSMR NHVTIQMNDSALPVAKESASPSVRHTDLTKIPSQHNSSHLPASACN YTFRERTSGVQEGSHFLQEAKRNNLSLAFVTLGITEGQGKFSSLGK SATNQPMYKKLENTVLLQPGLSETSDKVELLSQVHVDQEDSFPTKT SNDSPGHLDLMGKIFLQKTQGPVKMNKTNSPGKVPFLKWATESSE KIPSKLLGVLAWDNHYDTQIPSEEWKSQKKSQTNTAFKRKDTILPL GPCENNDSTAAINEGQDKPQREAMWAKQGEPGRLCSQNPPVSKH HQREITVTTLQPEEDKFEYDDTFSIEMKREDFDIYGDYENQGLRSFQ KKTRHYFIAAVERLWDYGMSRSPHILRNRAQSGDVQQFKKVVFQE FTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIVVTFKNQASRPYS FYSSLISYDEDEGQGAEPRRKFVNPNETKIYFWKVQHHMAPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLICRSNTLNPAHGRQVTVQE FALVFTIFDETKSWYFTENLERNCRAPCNVQKEDPTLKENFRFHAI NGYVKDTLPGLVMAQDQKVRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVR KKEEYKMAVYNLYPGVFETVEMLPSQVGIWRIECLIGEHLQAGMS TLFLVYSKKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYS GSINAWSTKDPFSWIKVDLLAPMIIHGIMTQGARQKFSSLYVSQFII MYSLDGNKWHSYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIAQYI RLHPTHYSIRSTLRMELLGCDFNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYL SSMLATWSPSQARLHLQGRTNAWRPQANNPKEWLQVDFRKTMK VTGITTQGVKSLLISMYVKEFLISSSQDGHNWTLFLQNGKVKVFQG NRDSSTPVRNRLEPPLVARYVR LHPQSWAHHIALRLEVLGCDTQQPA	
FVIII (свинья)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVV YKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNM ASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHT YVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASA RAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIF LEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQH DGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD	4

	DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSY KSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD FPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASG LIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQR FLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYI LSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENP GLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYL LSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRT PMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGA IDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATE LKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQL DTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKN VSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSAT NRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKN ATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKM LFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLS EKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHN QEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNV EGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLG NQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELE KRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLT RSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKK DSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSV TYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPG HLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLL DPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESN HAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRT TLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFI AAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQ PLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISY EEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAW AYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFT IFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMD TLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYK MALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVY SNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAW STKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGK KWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSI RSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATW SPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQG VKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTP VVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	
FVIII (Мышь)	AIRRYYLGAVELSWNYIQSDLLSVLHTDSRFLPRMSTSFPFNTSIMY KKTVFVEYKDQLFNIAKPRPPWMGLLGPTIWTEVHDTVVITLKNM ASHPVSLHAVGVSYWKASEGDEYEDQTSQMEKEDDKVFPGESHT YVWQVLKENGPMASDPPCLTYSYMSHVDLVKDLNSGLIGALLVC KEGSLSKERTQMLYQFVLLFAVFDEGKSWHSETNDSYTQSMDSAS ARDWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEIHSI	5

	FLEGHTFFVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLIDLGQFLLFCHISSHKH DGMEAYVKVDSCPEESQWQKKNNNEEMEDYDDDLYSEMDMFTL DYDSSPFIQIRSVAKKYPKTWIHYISAEEEDWDYAPSVPTSDNGSYK SQYLSNGPHRIGRKYKKVRFIAYTDETFKTRETIQHESGLLGPLLYG EVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVSPLHARRLPRGIKHVKDLPI HPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFINPERDLASGLIGP LLICYKESVDQRGNQMMSDKRNVILFSIFDENQSWYITENMQRFLP NAAKTQPQDPGFQASNIMHSINGYVFDSLELTVCLHEVAYWHILSV GAQTDFLSIFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLW VLGCHNSDFRKRGMTALLKVSSCDKSTSDYYEEIYEDIPTQLVNEN NVIDPRSFFQNTNHPNTRKKKFKDSTIPKNDMEKIEPQFEEIAEMLK VQSVSVSDMLMLLGQSHPTPHGLFLSDGQEAIYEAIHDDHSPNAID SNEGPSKVTQLRPESHHSEKIVFTPQPGLQLRSNKSLETTIEVKWKK LGLQVSSLPSNLMTTTILSDNLKATFEKTDSSGFPDMPVHSSSKLST TAFGKKAYSLVGSHVPLNASEENSDSNILDSTLMYSQESLPRDNILS IENDRLLREKRFHGIALLTKDNTLFKDNVSLMKTNKTYNHSTTNEK LHTESPTSIENSTTDLQDAILKVNSEIQEVTALIHDGTLLGKNSTYLR LNHMLNRTTSTKNKDIFHRKDEDPIPQDEENTIMPFSKMLFLSESSN WFKKTNGNNSLNSEQEHSPKQLVYLMFKKYVKNQSFLSEKNKVT VEQDGFTKNIGLKDMAFPHNMSIFLTTLSNVHENGRHNQEKNIQEE IEKEALIEEKVVLPQVHEATGSKNFLKDILILGTRQNISLYEVHVPVL QNITSINNSTNTVQIHMEHFFKRRKDKETNSEGLVNKTREMVKNYP SQKNITTQRSKRALGQFRLSTQWLKTINCSTQCIIKQIDHSKEMKKF ITKSSLSDSSVIKSTTQTNSSDSHIVKTSAFPPIDLKRSPFQNKFSHVQ ASSYIYDFKTKSSRIQESNNFLKETKINNPSLAILPWNMFIDQGKFTS PGKSNTNSVTYKKRENIIFLKPTLPEESGKIELLPQVSIQEEEILPTET SHGSPGHLNLMKEVFLQKIQGPTKWNKAKRHGESIKGKTESSKNT RSKLLNHHAWDYHYAAQIPKDMWKSKEKSPEIISIKQEDTILSLRP HGNSHSIGANEKQNWPQRETTWVKQGQTQRTCSQIPPVLKRHQRE LSAFQSEQEATDYDDAITIETIEDFDIYSEDIKQGPRSFQQKTRHYFI AAVERLWDYGMSTSHVLRNRYQSDNVPQFKKVVFQEFTDGSFSQ PLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFKNQASRPYSFYSSLISY KEDQRGEEPRRNFVKPNETKIYFWKVQHHMAPTEDEFDCKAWAY FSDVDLERDMHSGLIGPLLICHANTLNPAHGRQVSVQEFALLFTIFD ETKSWYFTENVKRNCKTPCNFQMEDPTLKENYRFHAINGYVMDTL PGLVMAQDQRIRWYLLSMGNNENIQSIHFSGHVFTVRKKEEYKMA VYNLYPGVFETLEMIPSRAGIWRVECLIGEHLQAGMSTLFLVYSKQ CQIPLGMASGSIRDFQITASGHYGQWAPNLARLHYSGSINAWSTKE PFSWIKVDLLAPMIVHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWL SYQGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNSFNPPIIARYIRLHPTHSSIRST LRMELMGCDLNSCSIPLGMESKVISDTQITASSYFTNMFATWSPSQ ARLHLQGRTNAWRPQVNDPKQWLQVDLQKTMKVTGIITQGVKSL FTSMFVKEFLISSSQDGHHWTQILYNGKVKVFQGNQDSSTPMMNS LDPPLLTRYLRIHPQIWEHQIALRLEILGCEAQQQY	
вариант FVIII BDD (патент США №	MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVD ARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLG PTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQT SQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSW	6

7632921, SEQ ID NO: 3)	HSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKS VYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTL LMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAE DYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAE EEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTD ETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGIT DVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPR CLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNV ILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGY VFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYED TLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCD KNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRT TLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFI AAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQ PLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISY EEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAW AYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFT IFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMD TLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYK MALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVY SNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAW STKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGK KWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSI RSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATW SPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQG VKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTP VVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	
BDD-2 FVIII	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVV YKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNM ASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHT YVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASA RAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIF LEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQH DGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSY KSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD FPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASG LIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQR FLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYI LSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENP GLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYL LSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEM KKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHV LRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYI RAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKP NETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIG PLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNC	7

	RAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLP SKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQ ITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIH GIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFG NVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSM PLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRP QVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQ SWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	
BDD-3 FVIII (G1648)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVV YKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNM ASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHT YVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASA RAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIF LEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQH DGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSY KSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD FPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASG LIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQR FLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYI LSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENP GLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYL LSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQGEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVE MKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPH VLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPY IRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKP NETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIG PLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNC RAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLP SKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQ ITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIH GIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFG NVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSM PLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRP QVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQ SWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	8
BDD-4 FVIII	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVV YKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNM ASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHT YVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASA RAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIF LEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQH	9

	DGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSY KSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD FPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASG LIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQR FLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYI LSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENP GLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYL LSKNNAIEPRSFSQQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHV LRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYI RAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKP NETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIG PLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNC RAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLP SKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQ ITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIH GIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFG NVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSM PLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRP QVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQ SWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	
BDD-5 FVIII	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVV YKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNM ASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHT YVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASA RAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIF LEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQH DGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSY KSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD FPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASG LIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQR FLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYI LSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENP GLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKQSPRSFQKKTRHYFIAA VERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPL YRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEE DQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAY FSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFD ETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLP GLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMAL YNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNK CQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTK EPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKW	10

	QTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRS TLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSP SKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGV KSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPV VNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	
BDD-6 FVIII	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVV YKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNM ASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHT YVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASA RAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIF LEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQH DGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSY KSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD FPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASG LIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQR FLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYI LSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENP GLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYL LSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDTISVEMKK EDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRN RAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAE VEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNET KTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLL VCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRA PCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLS MGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQI TASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHG IKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGN VDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMP LGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQ VNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQS WVHQIALRMEVLGCEAQDLY	11
BDD-7 FVIII	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVV YKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNM ASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHT YVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASA RAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIF LEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQH DGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSY KSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD FPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASG	12

	LIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQR FLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYI LSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENP GLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYL LSKNNAIEPRSFSQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVL RNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIR AEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPN ETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGP LLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCR APCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLL SMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQI TASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHG IKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGN VDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMP LGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQ VNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQS WVHQIALRMEVLGCEAQDLY	
предшественник BDD-8 FVIII (Патент США № 6818439 SEQ ID NO: 47)	MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVD ARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLG PTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQT SQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSW HSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKS VYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTL LMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAE DYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAE EEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTD ETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGIT DVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPR CLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNV ILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGY VFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYED TLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCD KNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRT TLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFI AAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQ PLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISY EEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAW AYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFT IFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMD TLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYK MALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVY SNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAW STKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGK KWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSI RSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATW SPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQG	13

	VKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTP VVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	
зрелый BDD-9 FVIII (Патент США № 6818439)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVV YKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNM ASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHT YVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASA RAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIF LEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQH DGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSY KSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD FPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASG LIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQR FLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYI LSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENP GLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYL LSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEM KKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHV LRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYI RAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKP NETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIG PLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNC RAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLP SKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQ ITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIH GIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFG NVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSM PLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRP QVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQ SWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	14
BDD-10 FVIII	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVV YKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNM ASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHT YVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASA RAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIF LEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQH DGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSY KSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD FPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASG LIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQR FLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYI LSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENP	15

	GLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYL LSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVE MKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPH VLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPY IRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKP NETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIG PLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNC RAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLP SKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQ ITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIH GIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFG NVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSM PLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRP QVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQ SWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	
BDD-11 FVIII	ATRATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNT SVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITL KNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGG SHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALL VCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDA ASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEV HSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISS HQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDV VRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPD DRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGIL GPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERD LASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTE NIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVA YWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMS MENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDI SAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTI SVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSS SPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLL GPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNF VKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHS GLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENM ERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIR WYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETV EMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHI RDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLM VFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLN SCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNA WRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLI SSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRI HPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	16

BDD-12 FVIII	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVV YKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNM ASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHT YVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASA RAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIF LEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQH DGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSY KSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD FPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASG LIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQR FLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYI LSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENP GLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYL LSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVE MKKEDFDIFDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPH VLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPY IRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKP NETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIG PLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNC RAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLP SKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQ ITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIH GIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFG NVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSM PLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRP QVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQ SWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	17
BDD-13 FVIII	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVV YKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNM ASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHT YVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASA RAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIF LEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQH DGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSY KSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD FPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASG LIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQR FLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYI LSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENP GLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYL LSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEM KKEDFDIFDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVL RNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIR AEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPN ETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGP LLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCR APCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLL SMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQI TASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHG IKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGN VDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMP LGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQ VNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQS WVHQIALRMEVLGCEAQDLY	18
	KKEDFDIFDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVL RNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIR AEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPN ETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGP LLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCR APCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLL SMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQI TASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHG IKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGN VDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMP LGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQ VNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQS WVHQIALRMEVLGCEAQDLY	

Настоящее изобретение также предусматривает CFXTEN, который содержит FVIII с различными делециями аминокислот, вставками и заменами, сделанными в последовательностях FVIII из табл. 1, которые сохраняют прокоагулянтную активность. Примеры консервативных замен аминокислот в полипептидных последовательностях показаны в табл. 2. В вариантах осуществления CFXTEN, в котором идентичность последовательности FVIII составляет менее 100%, по сравнению со специфической последовательностью, раскрытой в данном документе, настоящее изобретение предусматривает замену любой из других 19 природных L-аминокислот на данный аминокислотный остаток данного FVIII, который может быть в любом положении в пределах последовательности FVIII, которая содержит смежные амино-

кислотные остатки. Если какая-либо замена приводит к нежелательному изменению прокоагулянтной активности, то могут быть использованы одни из альтернативных аминокислот, а конструкцию протеина оценивают с помощью способов, описанных в данном документе (например, анализы из табл. 49), или использования любых способов и принципов консервативных и неконсервативных мутаций, изложенных, например, в патенте США № 5364934, содержание которого включено в виде ссылки в полном объеме, или с использованием способов, обычно известных в данной области. В предпочтительной замене, компонент FVIII вариантов осуществления CFXTEN модифицируют с помощью замены остатка R1648 (нумерация относительно природной зрелой формы FVIII) глицином или аланином, чтобы предотвратить протеолитический процессинг в форму гетеродимера. В дополнительной замене, компонент FVIII вариантов осуществления CFXTEN модифицируют с помощью замены остатка Y1680 (нумерация относительно природной зрелой формы FVIII) фенилаланином. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения компонент FVIII вариантов осуществления CFXTEN модифицируют с помощью замены остатка Y1680 (нумерация относительно природной зрелой формы FVIII) фенилаланином и остатка R1648 (нумерация относительно природной зрелой формы FVIII) глицином или аланином.

В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения композиция FVIII гибридного белка имеет одну или несколько аминокислотных замен, направленных на снижение связывания ингибиторов фактора FVIII в эпитопах, распознаваемых антителами из табл. 9, которые содержат, но без ограничения ими, замены Lys(377), Lys(466), Lys(380), Ser(488), Arg(489), Arg(490), Leu(491), Lys(493), Lys(496), His(497), Lys(499), Lys(512), Lys(523), Lys(556), Met (2199), Phe(2200), Leu(2252), Val(2223) и Lys(2227). Кроме того, варианты могут содержать, например, полипептиды, при том, что один или несколько аминокислотных остатков добавляют или удаляют на, или около, N-или C-конце непроцессированной природной аминокислотной последовательности или домена FVIII до тех пор, пока вариант сохраняет часть, если не всю, прокоагулянтной активности нативного пептида. Получаемые последовательности FVIII, которые сохраняют по меньшей мере часть (например, по меньшей мере 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, или по меньшей мере 95% или более) прокоагулянтной активности, по сравнению с нативной циркулирующей FVIII считаются применимыми для слитого белка в композициях по настоящему изобретению. Примеры вариантов FVIII известные в данной области техники, содержат те, которые описаны в патенте США и заявках № 6316226; 6818439; 7632921; 20080227691, которые включены в данный документ в виде ссылки. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения вариант последовательности FVIII имеет в положении аминокислоты 75 аспарагиновую кислоту, замененную на валин (нумерация относительно природной зрелой формы FVIII).

Таблица 2

Иллюстративные консервативные аминокислотные замены

Исходный остаток	Иллюстративные замены
Ala (A)	val; leu; ile
Arg (R)	lys; gln; asn
Asn (N)	gin; his; lys; arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Pro
His (H)	asn: gin: lys: arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe: норлейцин
Leu (L)	норлейцин: ile: val; met; ala: phe
Lys (K)	arg: gin: asn
Met (M)	leu; phe; ile
Phe (F)	leu: val: ile; ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr(Y)	Trp: phe: thr: ser
Val (V)	Ile; leu; met; phe; ala; норлейцин

III) Расширенные рекомбинантные полипептиды.

В отдельном аспекте настоящее изобретение обеспечивает полипептидные композиции XTEN, которые являются применимыми в качестве партнера(ов) гибридного белка для связывания с, и/или встраивания в пределах, полипептидом FVIII, что приводит к гибридному белку CFXTEN. XTEN представляет собой, как правило, полипептиды с не встречающимися в природе, по существу, неповторяющимися последовательностями, которые имеют низкую степень, или не имеющие, вторичной или третичной структуры при физиологических условиях. XTEN, как правило, имеет от около 36 до около 3000 аминокислот, из которых большинство, или все, аминокислот представляют собой небольшие гидрофильные аминокислоты. Как используется в данном документе, "XTEN" в частности исключает целые антитела или фрагменты антител (например, одноцепочечные антитела и фрагменты Fc). Полипептиды XTEN применимы в качестве партнеров гибридного белка в том, что они играют различные роли, которым присущи определенные желательные фармакокинетические, физико-фармакологические и фармацевтические свойства при присоединении к протеину FVIII для создания гибридного белка CFXTEN. Такие композиции гибридного белка CFXTEN имеют повышенные свойства, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN, что делает их применимыми при лечении определенных состояний, связанных с недостатками FVIII или нарушениями свертываемости крови, как более подробно описано ниже.

Критерии отбора для XTEN, слитого с протеинами FVIII, используют для создания патентоспособных композиций гибридных белков, которые, как правило, относятся к атрибутам физических/химических свойств и конформационной структуры Xten что, в свою очередь, используют для придания повышенной фармацевтических, фармакологических и фармакокинетических свойств композиции гибридных белков FVIII. Неструктурированная характеристика и физические/химические свойства XTEN приводит к, в частности, общей аминокислотной композиции, непропорционально ограниченной 4-6 гидрофильными аминокислотами, связыванию аминокислот в количественном неповторяющемся строении и длине полипептида XTEN. В предпочтительном признаке, общем с XTEN, но нехарактерном для полипептидов, свойства XTEN, раскрытые в данном документе, не связаны с абсолютными последовательностями основных аминокислот, о чем свидетельствует разнообразие иллюстративных последовательностей из табл. 4, которые, в различных диапазонах длины, обладают сходными свойствами, многие из которых описаны в примерах. XTEN по настоящему изобретению могут проявлять один, или несколько, или все из следующих свойств: выгодные неструктурированные конформации, конформационная гибкость, повышение растворимости в воде, высокая степень устойчивости к протеазе, низкая иммуногенность, низкое связывание с рецепторами млекопитающих, определенная степень заряда и увеличение гидродинамических (или Стокса) радиусов; свойства, которые могут сделать их особенно применимыми в качестве партнеров гибридного белка. Неограничивающие примеры улучшенных свойств, которые XTEN возлагают на гибридные белки, содержащие FVIII, слитый с XTEN, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, содержат увеличение общей растворимости и/или метаболической стабильности, снижение восприимчивости к протеолизу, сниженную иммуногенность, снижение скорости абсорбции при введении подкожно или внутримышечно, снижение связывания с рецепторами клиренса фактора VIII, уменьшение реактивности к антиантителам, применимые улучшения взаимодействий с подложкой, и/или улучшенные фармакокинетические свойства при введении субъекту. Улучшенные фармакокинетические свойства композиций CFXTEN, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, содержат более продолжительное конечное время полужизни (например, в два раза, в три раза, в четыре раза или более), увеличенную площадь под кривой (AUC) (например, 25%, 50%, 100% или более), более низкий объем распределения и улучшенную абсорбцию после подкожной или внутримышечной инъекции (преимуществом, по сравнению с коммерчески доступных форм FVIII, которые должны быть введены внутривенно). Кроме того, считается, что композиции CFXTEN, которые содержат расщепленные последовательности (описанные более подробно ниже) позволяют замедлить секретирование биологически активного FVIII, так, что вводимый CFXTEN оказывает действие в качестве депо. Отдельно предусмотрено, что патентоспособные гибридные белки CFXTEN могут проявлять один или несколько, или любую комбинацию улучшенных свойств, раскрытых в данном документе. В результате этих улучшенных свойств, считается, что композиции CFXTEN позволяют менее частое дозирование, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, при введении в аналогичных дозировках. Подобные композиции гибридного белка CFXTEN могут применять для лечения определенных связанных с фактором VIII заболеваний, как описано в данном документе.

Множество способов и анализов известны в данной области техники определения физических/химических свойств протеинов, таких как композиции CFXTEN, которые содержат XTEN. Такие свойства содержат, но без ограничения ими, вторичную или третичную структуру, растворимость, агрегацию белков, стабильность, абсолютную и кажущуюся молекулярную массу, чистоту и однородность, свойства плавления, загрязнение и содержание воды. Способы анализа этих свойств содержат аналитическое центрифугирование, EPR, ионобменную HPLC, эксклюзионную HPLC, обращенно-фазовую HPLC, рассеяние света, капиллярный электрофорез, круговой дихроизм, дифференциальную сканирующую калориметрию, флуоресценцию, ионобменную HPLC, эксклюзионную HPLC, IR, NMR, спектроскопию рамановского рассеяния, рефрактометрию и UV/видимую спектроскопию. Дополнительный спо-

собы раскрыты в Arnau, et al., Prot Expr and Purif (2006) 48, 1-13.

Компонент(ы) XTEN CFXTEN предназначен для того, чтобы вести себя в физиологических условиях как денатурированные пептидные последовательности, несмотря на длину полимера. "Денатурированное" описывает состояние пептида в растворе, которое характеризуется большой конформационной свободой пептидной цепи. Большинство пептидов и белков принимают денатурированную конформацию в присутствии высоких концентраций денатурирующих средств или при повышенной температуре. Пептиды в денатурированной конформации имеют, например, характерные спектры кругового дихроизма (CD) и характеризуются отсутствием взаимодействий на больших расстояниях, что определяют с помощью NMR. "Денатурированную конформацию" и "неструктурированную конформацию" используют в данном документе в качестве синонимов. В отдельных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает последовательности XTEN, которые, при физиологических условиях, в значительной степени лишены вторичной структуры. В других случаях, последовательности XTEN по существу лишены вторичной структуры в физиологических условиях, тогда как XTEN может принимать случайная конформацию спирали. "В значительной степени лишены", как используется в этом контексте, означает, что по меньшей мере 50% аминокислотных остатков XTEN последовательности XTEN не способствуют образованию вторичной структуры, как измерено или определено с помощью описанного в данном документе. "По существу лишены", как используется в этом контексте, означает, что по меньшей мере около 60%, или около 70%, или около 80%, или около 90%, или около 95%, или по меньшей мере около 99% аминокислотных остатков XTEN последовательности XTEN не способствуют образованию вторичной структуры, как измерено или определено с помощью описанного в данном документе.

В данной области техники было разработано множество способов, чтобы различить наличие или отсутствие вторичных и третичных структур в данном полипептиде. В частности, вторичная структура может быть измерена спектрофотометрически, например, с помощью спектроскопии кругового дихроизма в "далекой ультрафиолетовой" области спектра (190-250 нм). Каждый из элементов вторичной структуры, таких как альфа-спираль и бета-лист, дает рост характеристики формы и величины спектров CD, так же как и отсутствие этих структурных элементов. Вторичная структура также может быть предсказана в случае полипептидной последовательности с помощью определенных компьютерных программ или алгоритмов, таких как широко известный алгоритм Chou-Fasman (Chou, P. Y., et al. (1974) Biochemistry, 13: 222-45) и алгоритм Garnier-Osguthorpe-Robson ("GOR") (Gamier J, Gibrat JF, Robson B. (1996), GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. Methods Enzymol 266:540-553), как описано в патенте США и опубликованной заявке № 20030228309A1. Для заданной последовательности, алгоритмы могут предсказать, существует или нет некоторая вторичная структура вообще, выраженная в виде общего количества и/или процентов остатков последовательности, которые образуют, например, альфа-спирали или бета-листы или процент остатков последовательностей, которые, как прогнозируют, приводят к образованию случайной спирали (которая нуждается во вторичной структуре).

В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения последовательности XTEN, которые используют в композициях гибридного белка субъекта, имеют процент альфа-спирали, изменяющийся в диапазоне от 0% до менее около 5%, что определяют с помощью алгоритма Chou-Fasman. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения последовательности композиции гибридного белка XTEN имеют процент бета-листов, который изменяется в диапазоне от 0% до менее около 5%, что определяют с помощью алгоритма Chou-Fasman. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения последовательности композиции гибридного белка XTEN имеют процент альфа-спирали, который изменяется в диапазоне от 0% до менее около 5% и процент бета-листов изменяется в диапазоне от 0% до менее около 5%, что определяют с помощью алгоритма Chou-Fasman. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения последовательности композиции гибридного белка XTEN имеют процент альфа-спирали менее около 2% и процент бета-листа менее около 2%. Последовательности композиции гибридного белка XTEN имеют высокий уровень процента случайной спирали, что определяют с помощью алгоритма GOR. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность XTEN имеет по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, и, более предпочтительно, по меньшей мере около 99% случайной спирали, что определяют с помощью алгоритма GOR. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения последовательности композиции гибридного белка XTEN имеют процент альфа-спирали, который изменяется в диапазоне от 0% до менее около 5% и процент бета-листа, который изменяется в диапазоне от 0% до менее около 5%, что определяют с помощью алгоритма Chou-Fasman и по меньшей мере около 90% случайной спирали, что определяют с помощью алгоритма GOR. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения последовательности композиции гибридного белка XTEN имеют процент альфа-спирали менее около 2% и процент бета-листов менее около 2%, по меньшей мере около 90% случайной спирали, что определяют с помощью алгоритма GOR.

1. Неповторяющиеся последовательности.

Предполагается, что последовательности XTEN вариантов осуществления CFXTEN являются по

существу неповторяющимися. В общем, повторяющиеся аминокислотные последовательности имеют тенденцию к агрегации или образуют более высокие структуры порядка, о чем свидетельствуют природные повторяющиеся последовательности, такие как коллагены и лейциновые "молнии". Эти повторяющиеся аминокислоты могут также иметь тенденцию к образованию контактов, что приводит к кристаллическим или псевдокристаллическим структурам. В противоположность этому, низкая тенденция неповторяющихся последовательностей к агрегированию позволяет существовать строению XTEN с длинной последовательностью с относительно низкой частотой заряженных аминокислот, которые иначе были бы более склонными к агрегации, если бы последовательности были повторяющимися. Неповторяемость субъекта XTEN можно наблюдать с помощью оценки одного или более из следующих признаков. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения "по существу неповторяющаяся" последовательность XTEN имеет около 36, или по меньшей мере 72, или по меньшей мере 96, или по меньшей мере 144, или по меньшей мере 288, или по меньшей мере 400, или по меньшей мере 500, или по меньшей мере 600, или по меньшей мере 700, или по меньшей мере 800, или по меньшей мере 864, или по меньшей мере 900, или по меньшей мере 1000, или по меньшей мере 2000, до около 3000 или более аминокислотных остатков, или имеет длину, которая изменяется в диапазоне от около 36 до около 3000, от около 100 до около 500, от около 500 до около 1000, от около 1000 до около 3000 аминокислот и остатков, в котором никакие три смежные аминокислоты в последовательностях не являются аминокислотами идентичного типа, при условии, что аминокислота не является серином, а в этом случае не более чем три смежные аминокислоты являются остатками серина. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения, как описано более подробно ниже, "по существу неповторяющаяся" последовательность XTEN содержит мотивы от 9 до 14 аминокислотных остатков, при том, что мотивы состоят из от 4 до 6 типов аминокислот, выбранных из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), и, при том, что последовательность любых двух смежных аминокислотных остатков в любом мотиве в мотиве последовательности не повторяется более двух раз.

Степень повторяемости полипептида или гена могут измерять с помощью компьютерных программ или алгоритмов, или другими способами, известными в данной области техники. Согласно настоящему изобретению, алгоритмы, которые будут использоваться для расчета степени повторяемости определенного полипептида, такого как XTEN, раскрыты в данном документе и обеспечивают примеры последовательностей, которые анализируют с помощью алгоритма (см. примеры, ниже). В отдельном аспекте, повторяемость полипептида заданной длины рассчитывают (в дальнейшем "количество подпоследовательностей") в соответствии с формулой, приведенной в Уравнении 1:

$$\text{Количество подпоследовательностей} \quad \frac{\sum_{i=1}^{m} Count_i}{m} \qquad \text{I}$$

где m = (длина аминокислот полипептида) - (длина аминокислот подпоследовательности) + 1; и $Count_i$ = общее число вхождений каждой уникальной подпоследовательности в последовательность$_i$.

Алгоритм, который носит название "SegScore" был разработан для применения вышеприведенного уравнения для количественной оценки повторяемости полипептидов, таких как XTEN, обеспечивая количество подпоследовательностей, при том, что последовательности аминокислот с заданной длиной "n" на повторяемость путем определения числа ("расчет") уникальных последовательностей с длиной "s", встречающихся в заданной длине, деленное на абсолютное число подпоследовательностей в пределах заданной длины последовательности. Фиг. 27 иллюстрирует логическую блок-схему алгоритма SegScore, в то время как на фиг. 28 проиллюстрирована схема того, как происходит оценка количества подпоследовательностей на примере фиктивной XTEN с 11 аминокислотами и длиной подпоследовательностей в 3 аминокислотных остатка. Например, заданная длина полипептид в 200 аминокислотных остатков имеет 192 перекрывающиеся подпоследовательности из 9 аминокислот и 198 подпоследовательностей из 3 аминокислот, но оценка подпоследовательности любого данного полипептида будет зависеть от абсолютного количества уникальных подпоследовательностей и от того, как часто каждая уникальная подпоследовательность (имеются в виду различные аминокислотные последовательности) появляется в заданной длине последовательности.

В контексте настоящего изобретения, "количество подпоследовательностей" означает сумму совпадений каждого уникального 3-мерного фрейма в пределах 200 последовательных аминокислот совокупного полипептида XTEN, деленную на абсолютное количество уникальных 3-мерных подпоследовательностей в пределах 200 аминокислотной последовательности. Примеры подобных количеств подпоследовательностей, полученные из 200 последовательных аминокислот, повторяющихся и неповторяющихся полипептидов, представлены в примере 45. В отдельном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, который содержит один XTEN, в котором XTEN имеет количество подпоследовательностей менее 12, более предпочтительно, менее 10, еще более предпочтительно менее 9, наиболее предпочтительно менее 8, еще более предпочтительно менее 7, еще более предпочтительно менее 6, и, еще более предпочтительно, менее 5. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, который содержит по меньшей мере от двух до около шести XTEN, в которых 200 аминокислот XTEN имеют количество подпоследовательностей менее 10, более предпочтительно

менее 9, еще более предпочтительно менее 8, наиболее предпочтительно менее 7, еще более предпочтительно менее 6, и, еще более предпочтительно, менее 5. В вариантах осуществления композиций гибридного белка CFXTEN, описанных в данном документе, компонент XTEN гибридного белка с количеством подпоследовательностей 10 или меньше (т.е. 9, 8, 7, и т.д.) также является по существу неповторяющимся.

Считается, что неповторяющаяся характеристика XTEN по настоящему изобретению вместе с конкретными типами аминокислот, которые преобладают в XTEN, а не абсолютная первичная последовательность, обеспечивает многие из расширенных физико-химических и биологических свойств гибридного белка CFXTEN. Эти улучшенные свойства содержат более высокую степень экспрессии слитого белка в клетке-хозяине, большую генетическую стабильность гена, кодирующего Xten, более высокую степень растворимости, меньшую тенденцию к агрегации и улучшенную фармакокинетику полученного CFXTEN, по сравнению со слитыми белками, содержащими полипептиды, имеющие повторяющиеся последовательности. Эти улучшенные свойства позволяют осуществлять более эффективное производство, более низкую стоимость товаров и содействовать разработке XTEN-содержащих фармацевтических составов, которые содержат чрезвычайно высокие концентрации протеина, которая, в отдельных случаях, превышает 100 мг/мл. Кроме того, полипептидные последовательности XTEN по вариантам осуществления настоящего изобретения предназначены для того, чтобы имели низкую степень внутренней повторяемости, для того, чтобы уменьшить или устранить по существу иммуногенность при введении млекопитающему. Полипептидные последовательности, состоящие из коротких повторяющихся мотивов, в значительной степени ограниченных только тремя аминокислотами, такими как глицин, серин и глутамат, при введении млекопитающему могут привести к относительно высоким титрам антител, несмотря на отсутствие предсказанных Т-клеточных эпитопов в этих последовательностей. Это может быть вызвано повторяющейся природой полипептидов, как это было показано, что иммуногены с повторяющимися эпитопами, которые содержат агрегаты протеина, перекрестносшитые иммуногены и повторяющиеся карбогидраты являются высокоиммуногенными и могут, например, приводить к перекрестному сшиванию В-клеточных рецепторов, которые приводят к активации В-клетки. (Johansson, J., et al. (2007) Vaccine, 25:1676-82; Yankai, Z., et al. (2006) Biochem Biophys Res Commun, 345:1365-71; Hsu, C. T., et al. (2000) Cancer Res, 60:3701-5); Bachmann MF, et al. Eur J Immunol. (1995) 25(12):3445-3451).

2. Иллюстративные мотивы последовательностей.

Настоящее изобретение охватывает XTEN, используемый в качестве партнеров слияния, который содержит несколько единиц коротких последовательностей, или мотивов, в которых аминокислотные последовательности мотивов являются неповторяющимися. Неповторяющееся свойство встречают, не смотря на использование модульного принципа конструирования с использованием библиотеки мотивов последовательности, которые являются мультимеризированными для создания последовательности XTEN. Таким образом, в то время как последовательность XTEN может состоять из нескольких единиц всего лишь четырех различных типов мотивов последовательности, потому что мотивы сами обычно состоят из последовательностей неповторяющихся аминокислотных, общая последовательность XTEN предназначена для визуализации, по существу, не повторяющейся последовательности.

В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения XTEN имеет, по существу, неповторяющуюся последовательность из более чем от около 36 до около 3000, или от около 100 до около 2000, или от около 144 до около 1000 аминокислотных остатков, или даже длиннее, при том, что по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 85%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 97%, или около 100% последовательности XTEN состоит из неперекрывающихся мотивов последовательностей, и при том, что каждый из мотивов имеет от около 9 до 36 аминокислотных остатков. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 85%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 97%, или около 100% последовательностей XTEN состоит из неперекрывающихся мотивов последовательностей, при том, что каждый из мотивов имеет от 9 до 14 аминокислотных остатков. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 85%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 97%, или около 100% последовательности XTEN состоит из неперекрывающихся мотивов последовательностей, при том, что каждый из мотивов имеет 12 аминокислотных остатков. В этих вариантах осуществления предпочтительно, чтобы мотивы последовательности состояли из в значительной степени (например, 90% или более), или полностью, из малых гидрофильных аминокислот, так что, в целом, последовательность имеет неструктурированную, конформационно-лабильную характеристику. Примеры аминокислот, которые включены в XTEN, представляют собой, например, аргинин, лизин, треонин, аланин, аспарагин, глутамин, аспартат, глутамат, серин и глицин. В результате тестирования переменных, таких как оптимизация кодона, монтажные полинуклеотиды, кодирующие мотивы последовательности, экспрессия белка, распределение заряда и растворимость экспрессированного белка и вторичная и третичная структуры, было обнаружено, что композиции XTEN с улучшенными характеристиками, раскрытыми в данном документе, в основном, или по большей части, содержат остатки глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P),

при том, что последовательности предназначены быть по существу неповторяющимися. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения последовательности XTEN имеют преимущественно от четырех до шести типов аминокислот, выбранных из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) или пролина (P), которые являются расположенными в по существу неповторяющейся последовательности, которая имеет больше чем от около 36 до около 3000, или от около 100 до около 2000, или от около 144 до около 1000 аминокислотных остатков в длину. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения последовательность XTEN сделана из 4, 5 или 6 типов аминокислот, выбранных из группы, которая состоит из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) или пролина (P). В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения XTEN имеет последовательности из более чем от около 36 до около 1000, или от около 100 до около 2000, или от около 400 до около 3000 аминокислотных остатков, при том, что по меньшей мере около 80% последовательности состоит из неперекрывающихся мотивов последовательностей, при том, что каждый из мотивов имеет от 9 до 36 аминокислотных остатков и, при том, что по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или 100% каждого из мотивов состоят из от 4 до 6 типов аминокислот, выбранных из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), и при том, что содержание любого одного типа аминокислоты в непроцессированном XTEN не превышает 30%. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере около 90% последовательности XTEN состоит из неперекрывающихся мотивов последовательностей, при том, что каждый из мотивов имеет от 9 до 36 аминокислотных остатков, при том, что мотивы состоят из от 4 до 6 типов аминокислот, выбранных из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), и при том, что содержание любого одного типа аминокислоты в непроцессированном XTEN не превышает 40%, или около 30%, или 25%, или около 17%. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере около 90% последовательности XTEN состоит из неперекрывающихся мотивов последовательностей, при том, что каждый из мотивов имеет 12 аминокислотных остатков, состоящих из от 4 до 6 типов аминокислот, выбранных из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), и, при том, что содержание любого одного типа аминокислоты в непроцессированном XTEN не превышает 40%, или 30%, или около 25%. В других вариантах осуществления настоящего изобретения 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%, до около 100% последовательности XTEN состоит из неперекрывающихся мотивов последовательностей, при том, что каждый из мотивов имеет 12 аминокислотных остатков, состоящих из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P).

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения XTEN содержит по существу неповторяющиеся последовательности из более чем от около 36 до около 3000 аминокислотных остатков, при том, что по меньшей мере около 80%, 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% последовательности состоит из неперекрывающихся мотивов последовательностей от 0 до 14 аминокислотных остатков, при том, что мотивы состоят из от 4 до 6 типов аминокислот, выбранных из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), и при том, что в любом мотиве последовательность любых двух смежных аминокислотных остатков не повторяется в мотиве последовательности более двух раз. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения 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% последовательности XTEN состоит из неперекрывающихся мотивов последовательностей из 12 аминокислотных остатков, при том, что мотивы состоят из от четырех до шести типов аминокислот, выбранных из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), и при том, что последовательность любых двух смежных аминокислотных остатков в любом мотиве последовательности в мотиве последовательности не повторяется более двух раз. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения 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% последовательности XTEN состоит из неперекрывающихся мотивов последовательностей из 12 аминокислотных остатков, при том, что мотивы состоят из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), и при том, что в любом мотиве последовательности последовательность любых двух смежных аминокислотных остатков не повторяется более двух раз в мотиве последовательности. В других вариантах осуществления настоящего изобретения XTEN состоит из мотивов последовательностей из 12 аминокислот, при том, что аминокислоты выбирают из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), и при том, что последовательность любых двух смежных аминокислотных остатков в любом мотиве последовательности не повторяется более двух раз, и при том, что содержание любого одного типа аминокислоты в непроцессированном XTEN не превышает 30%. Предыдущие варианты осуществления настоящего изобретения представляют собой примеры по существу неповторяющихся последовательностей XTEN. Дополнительные примеры подробно описаны ниже.

В отдельных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает композиции CFXTEN, которые содержат одну, или две, или три, или четыре, пять, шесть или более неповторяющейся последовательности(ей) XTEN из от около 36 до около 1000 аминокислотных остатков, или в совокупности от около 100 до около 3000 аминокислотных остатков, при том, что по меньшей мере около 80%, 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% до около 100% последовательности состоит из нескольких единиц четырех или более неперекрывающихся мотивов последовательностей, выбранных из аминокислотных последовательностей из табл. 3, при том, что, в целом, последовательность остается по существу неповторяющейся. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения XTEN содержит неперекрывающиеся мотивы последовательностей в которых около 80%, или по меньшей мере около 85%, или по меньшей мере около 90%, или около 91%, или около 92%, или около 93%, или около 94%, или около 95%, или около 96%, или около 97%, или около 98%, или около 99% или около 100% последовательности состоит из нескольких единиц неперекрывающихся последовательностей, выбранных из отдельного семейства мотивов, выбранных из табл. 3, что приводит к семейству последовательностей. Как используется в данном документе, "семейство" означает, что XTEN имеет мотивы, выбранные только из отдельной категории мотивов из табл. 3; т.е. AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC или BD XTEN, и что любые другие аминокислоты в XTEN не из семейства мотивов выбирают для того, чтобы достигнуть необходимого свойства, например, допускать возможность включения сайта рестрикции с помощью кодирования нуклеиновых кислот, включения последовательности расщепления, или достигать более лучшего связывания с компонентом фактора свертывания FVIII CFXTEN. В отдельных вариантах осуществления семейств XTEN, последовательность XTEN содержит несколько единиц неперекрывающихся мотивов последовательностей семейства мотивов AD, или семейства мотивов AE, или семейства мотивов AF, или семейства мотивов AG, или семейства мотивов AM, или семейства мотивов AQ, или семейства BC, или семейства мотивов BD, с получаемым XTEN, который демонстрирует диапазон гомологии, описанный выше. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения XTEN содержит несколько единиц мотивов последовательности из двух или более семейств мотивов из табл. 3. Эти последовательности могут быть выбраны для достижения желаемых физических/химических свойств, в том числе таких свойств, как суммарный заряд, гидрофильность, отсутствие вторичной структуры или отсутствие повторяемости, которые придают с помощью аминокислотной композиции мотивов, описанной ниже более полно. В вариантах осуществления настоящего изобретения, описанных выше в этом абзаце, мотивы, встроенные в XTEN, могут быть выбраны и собраны с использованием способов, описанных в данном документе, для того, чтобы достигнуть XTEN из от около 36 до около 3000 аминокислотных остатков.

Таблица 3

Мотивы последовательности XTEN из 12 аминокислот и семейства мотивов

Семейство мотивов	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ МОТИВА	SEQ ID NO:
AD	GESPGGSSGSES	19
AD	GSEGSSGPGESS	20
AD	GSSESGSSEGGP	21
AD	GSGGEPSESGSS	22
AE, AM	GSPAGSPTSTEE	23
AE, AM, AQ	GSEPATSGSETP	24
AE, AM, AQ	GTSESATPESGP	25
AE, AM, AQ	GTSTEPSEGSAP	26
AF, AM	GSTSESPSGTAP	27
AF, AM	GTSTPESGSASP	28
AF, AM	GTSPSGESSTAP	29
AF, AM	GSTSSTAESPGP	30
AG, AM	GTPGSGTASSSP	31
AG, AM	GSSTPSGATGSP	32
AG, AM	GSSPSASTGTGP	33
AG, AM	GASPGTSSTGSP	34
AQ	GEPAGSPTSTSE	35
AQ	GTGEPSSTPASE	36
AQ	GSGPSTESAPTE	37
AQ	GSETPSGPSETA	38
AQ	GPSETSTSEPGA	39
AQ	GSPSEPTEGTSA	40
BC	GSGASEPTSTEP	41
BC	GSEPATSGTEPS	42
BC	GTSEPSTSEPGA	43
BC	GTSTEPSEPGSA	44
BD	GSTAGSETSTEA	45
BD	GSETATSGSETA	46
BD	GTSESATSESGA	47
BD	GTSTEASEGSAS	48

Обозначает отдельные последовательности мотива, которые, если используются вместе в различных перестановках, приводят к "семейству последовательностей".

В отдельных вариантах осуществления семейств XTEN, последовательность XTEN содержит несколько единиц неперекрывающихся мотивов последовательностей семейства мотивов AD, семейства мотивов AE, или семейства мотивов AF, или семейства мотивов AG, или семейства мотивов AM, или семейства мотивов AQ, или семейства BC, или семейства BD, с получаемым XTEN, который демонстрирует диапазон описанной выше гомологии. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения XTEN содержит несколько единиц последовательностей мотива из двух или более семейств мотивов из табл. 3, выбранных для того, чтобы достигнуть нужных физико-химических характеристик, которые содержат такие свойства, как суммарный заряд, отсутствие вторичной структуры или отсутствие повторяемости, которые могут быть возложены на аминокислотную композицию мотивов, описанные ниже более полно. В вариантах осуществления настоящего изобретения, описанных выше в этом абзаце, мотивы или участки мотивов, встроенные в XTEN, могут быть выбраны и собраны с использованием способов, описанных в данном документе для того, чтобы достигнуть XTEN из от около 36, от около 42, от около 72, от около 144, от около 288, от около 576, от около 864, от около 1000, от около 2000 до около 3000 аминокислотных остатков, или любой промежуточной длины. Неограничивающие примеры последовательностей семейства XTEN, используемые для включения субъекту CFXTEN, представлены в табл. 4. Предполагается, что указанная последовательность, которая упоминается относительно табл. 4, имеет последовательность, приведенную в табл. 4, в то время как обобщенная ссылка на последовательность AE144, например, охватывает любую последовательность AE, имеющую 144 аминокислотных остатка; например, AE144_1 A, AE144_2A, и т.д., или обобщенная ссылка на последовательность AG144, например, предназначена для того, чтобы охватывать любую последовательность AG, которая имеет 144 аминокислотных остатка, например, AG144_1, AG144_2, AG144_A, AG144_B, AG144_C, и т.д.

Таблица 4
Полипептиды XTEN

Название XTEN	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
AE42	GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS	49
AE42_1	TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS	50
AE42_2	PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG	51
AE42_3	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP	52
AG42_1	GAPSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGPSGP	53
AG42_2	GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASP	54
AG42_3	SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA	55
AG42_4	SASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG	56
AE48	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGS	57
AM48	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS	58
AE144	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP	59
AE144_1A	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG	60
AE144_2A	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG	61
AE144_2B	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG	62
AE144_3A	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG	63
AE144_3B	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG	64
AE144_4A	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG	65
AE144_4B	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG	66
AE144_5A	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG	67
AE144_6B	TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA	68

	PGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APG	
AF144	GTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPG PGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSA SPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESS TAP	69
AG144_1	SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GASP	70
AG144_2	PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSS	71
AG144_A	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSP	72
AG144_B	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSP	73
AG144_C	GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSP	74
AG144_F	GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSP	75
AG144_3	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSP	76
AG144_4	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSP	77
AE288_1	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAP	78
AE288_2	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG	79

	SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAP	
AG288_1	PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGS	80
AG288_2	GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSP	81
AF504	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSXPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSXPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT GSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP	82
AF540	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPG PGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSPSGESST APGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSG TAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPS GTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPES GSASPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPE SGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSE SPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGTST PESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTS TPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGT SPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPG TSTPESGSASPGSTSESPSGTAP	83
AD576	GSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGSSESGSSEG GPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGESPGGSS GSESGSEGSSGPGESSGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGS SEGGPGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGESPGGSSGSESGSGGE PSESGSSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSEG SSGPGESSGESPGGSSGSESGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGS GGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGESPGGSSGSESGESPGGSSGSES GESPGGSSGSESGESPGGSSGSESGESPGGSSGSESGSSESGSSEG GPGSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESSGSSESGSSEGGPGSGGEPSE	84

	SGSSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGESPGG SSGSESGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGSGG EPSESGSSGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGSEGSSGPGESSGSS ESGSSEGGPGSEGSSGPGESS	
AE576	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAP	85
AF576	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPG PGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSPSGESST APGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSG TAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPS GTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPES GSASPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPE SGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSE SPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGTST PESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTS TPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGT SPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPG TSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASP GTSTPESGSASP	86
AG576	PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGS	87
AE624	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST GSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP	88

	ATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAP	
AD836	GSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGESPGGSSGSESGSGGEPSESG SSGESPGGSSGSESGESPGGSSGSESGSSESGSSEGGPGSSESGSSE GGPGSSESGSSEGGPGESPGGSSGSESGESPGGSSGSESGESPGGS SGSESGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESG SSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGESP GGSSGSESGESPGGSSGSESGSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESSGS SESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESSGSSESGSSEGGP GSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGSGGEPSESGSSGSGGEPSESG SSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSEGSSGP GESSGESPGGSSGSESGSEGSSGPGESSGSEGSSGPGESSGSGGEP SESGSSGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGESPGGSSGSESGSGG EPSESGSSGSEGSSGPGESSGESPGGSSGSESGSEGSSGPGSSESGS SEGGPGSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESSGSEGSSGPGESSGSEGS SGPGESSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGESP GGSSGSESGSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESSGESPGGSSGSESGS SESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSS GSSESGSSEGGPGESPGGSSGSESGSGGEPSESGSSGSSESGSSEG GPGESPGGSSGSESGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGSGGEPSE SGSS	89
AE864	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP	90
AF864	GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTA PGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGT APGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESS	91

	TAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAE SPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPS GTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESP SGTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPE SGSASPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSS TAESPGPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTST PESGPXXXGASASGAPSTXXXXSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGS TSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPG TSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGP GTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTA PGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSA SPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGSTSESPSG TAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGES STAPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGE SSTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGSSPSA STGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP	
AG864_2	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP	92
AM875	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPG PGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSA SPGTSTPESGSASPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTP SGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGASASGAPSTGGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSTSSTAESPGPGSTSSTAES PGPGTSPSGESSTAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSE	93

	GSAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP	
AE912	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST GSPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAP	94
AM923	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT GSPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAE SPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPES GSASPGTSTPESGSASPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGS STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGASASGAPSTGGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGTSPSGESS TAPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSTSSTAESPGPGSTSST AESPGPGTSPSGESSTAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSTPSGATGSPGSS PSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP	95
AM1318	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPG PGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSA SPGTSTPESGSASPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE	96

	GSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSSTP SGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGPEPTGPAPSGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGP GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTA PGTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSPSGESSTAPGTSPSGES STAPGTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASASGAPSTGGTSPS GESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGA SPGTSSTGSPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSTSESPSGTAP GSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSTSESPSG TAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGSSTPSGATGSPGASPGTSS TGSPGTPGSGTASSSPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAP	
BC 864	GTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTE PGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGSGASEPTST EPGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGSEPATSGT EPSGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGSEPATSG TEPSGSEPATSGTEPSGTSEPSTSEPGAGSGASEPTSTEPGTSEPST SEPGAGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGTSTEP SEPGSAGSGASEPTSTEPGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGSEPA TSGTEPSGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGA SEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTS TEPSEPGSAGSGASEPTSTEPGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGS EPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSG SGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSA GSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGS AGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTSEPSTSEP GAGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEP GSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGSEPATSGTEPSGSEPATS GTEPSGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGTSEPSTSEPGAGSEPAT SGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGAS EPTSTEPGTSTEPSEPGSA	97
BD864	GSETATSGSETAGTSESATSESGAGSTAGSETSTEAGTSESATSES GAGSETATSGSETAGSETATSGSETAGTSTEASEGSASGTSTEAS EGSASGTSESATSESGAGSETATSGSETAGTSTEASEGSASGSTA GSETSTEAGTSESATSESGAGTSESATSESGAGSETATSGSETAGT SESATSESGAGTSTEASEGSASGSETATSGSETAGSETATSGSETA	98

	GTSTEASEGSASGSTAGSETSTEAGTSESATSESGAGTSTEASEGS ASGSETATSGSETAGSTAGSETSTEAGSTAGSETSTEAGSETATS GSETAGTSESATSESGAGTSESATSESGAGSETATSGSETAGTSES ATSESGAGTSESATSESGAGSETATSGSETAGSETATSGSETAGT STEASEGSASGSTAGSETSTEAGSETATSGSETAGTSESATSESGA GSTAGSETSTEAGSTAGSETSTEAGSTAGSETSTEAGTSTEASEGS ASGSTAGSETSTEAGSTAGSETSTEAGTSTEASEGSASGSTAGSE TSTEAGSETATSGSETAGTSTEASEGSASGTSESATSESGAGSETA TSGSETAGTSESATSESGAGTSESATSESGAGSETATSGSETAGTS ESATSESGAGSETATSGSETAGTSTEASEGSASGTSTEASEGSASG STAGSETSTEAGSTAGSETSTEAGSETATSGSETAGTSESATSESG AGTSESATSESGAGSETATSGSETAGSETATSGSETAGSETATSG SETAGTSTEASEGSASGTSESATSESGAGSETATSGSETAGSETAT SGSETAGTSESATSESGAGTSESATSESGAGSETATSGSETA	
AE948	GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGP	99
AE1044	GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE	100

	TPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTST	
AE1140	GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATS GSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPA	101
AE1236	GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTE	102

	PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEP	
AE1332	GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST	103
AE1428	GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPA	104
AE1524	GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE	105

	TPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGS ETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPA	
AE1620	GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST	106
AE1716	GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAG	107

	SPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATS GSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSE	
AE1812	GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEP	108
AE1908	GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPA TSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	109

	GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP	
AE2004A	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE	110
AG948	GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSAST GTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSS PSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSST PSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGS SPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST	111

	GTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSP	
AG1044	GTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGAT GSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATG SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSPSAST GTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPG SSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGS SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP GSST	112
AG1140	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGAS PGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP GSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATG SPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPS ASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP	113

	GSST	
AG1236	GSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSAS TGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPS ASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGAS PGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATG SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPS ASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGT ASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GASP	114
AG1332	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPG SGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS PSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPG SSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATG SPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSAST GTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGS GTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSP SASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGT PG	115
AG1428	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT	116

	GSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSS PSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTG SPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSP SASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGS STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTG SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGT ASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSA STGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTP SGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG ASP	
AG1524	GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTG SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSAST GTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGT SSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGT ASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPS ASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGS STPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSP GTPG	117
AG1620	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS TGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS	118

	TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGS STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSAST GTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTP GSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSST	
AG1716	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG TPG	119
AG1812	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGT ASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSST PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGT PGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG	120

	SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGT ASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG ASP	
AG1908	GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPG SSP	121
AG2004A	GSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSS PSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSG	122

	ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGT GPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSG TASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPG ASP	
AE72B	SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPG	123
AE72C	TSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG	124
AE108A	TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATS GSETPGSPAGSPTS	125
AE108B	GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAP	126
AE144A	STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGS	127
AE144B	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APG	128
AE180A	TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS	129
AE216A	PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT	130
AE252A	ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSE	131
AE288A	TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT	132

	SESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GTSESA	
AE324A	PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS	133
AE360A	PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT	134
AE396A	PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS	135
AE432A	EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATS	136
AE468A	EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT	137
AE504A	EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST	138

	EPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS	
AE540A	TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEP	139
AE576A	TPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATS GSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESA	140
AE612A	GSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESA T	141
AE648A	PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPA	142

	GSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT	
AE684A	EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS	143
AE720A	TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSTE	144
AE756A	TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA	145

	PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPG TSES	
AE792A	EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS	146
AE828A	PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT	147
AG72A	GPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS	148
AG72B	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT	149

	GPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP	
AG72C	SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGA	150
AG108A	SASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGASP	151
AG108B	PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSS	152
AG144A	PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSS	153
AG144B	PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGASP	154
AG180A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGS	155
AG216A	TGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSG	156
AG252A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGASPG	157
AG288A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGTPGS	158
AG324A	TSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTP	159
AG360A	TSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG	160

	SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGA TGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPG	
AG396A	GATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGASPGT	161
AG432A	GATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGSSTPS	162
AG468A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG ASPG	163
AG504A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTP	164
AG540A	TSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG	165

	SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPG	
AG576A	TSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGASPG	166
AG612A	STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GASPGTS	167
AG648A	GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT	168

	GPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTP	
AG684A	TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGA TGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPG	169
AG720A	TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT GSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGASPG	170
AG756A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGSSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGASPG	171

AG792A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG ASPG	172
AG828A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTP	173
AG288_DE	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSP	1699

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения композиция CFXTEN содержит одну или несколько неповторяющихся последовательностей XTEN с длинами, которые изменяются в диапазоне от около 36 до около 3000 аминокислотных остатков, при том, что по меньшей мере около 80%, 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% до около 100% последовательности состоит из неперекрывающихся мотивов последовательностей из 36 аминокислот, выбранных из одной или нескольких полипептидных последовательностей из табл. 13-17, либо в виде семейства последовательностей, или, при условии, что мотивы выбирают из двух или более семейств мотивов.

В тех вариантах осуществления настоящего изобретения, где компонент XTEN гибридного белка CFXTEN имеет менее 100% его аминокислот, состоящих из 4, 5, или 6 типов аминокислоты, выбранных из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), или менее 100% последовательности состоит из мотивов последовательностей из табл. 3 или последовательности XTEN из табл. 4 и 13-17, другие аминокислотные остатки XTEN выбирают из любых других 14 природных L-аминокислот, но предпочтительно выбирают из гидрофильных аминокислот, так, что последовательность XTEN содержит по меньшей мере около 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% или по меньшей мере около 99% гидрофильных аминокислот. Аминокислоты XTEN, которые являются не глицином (G), аланином (A), серином (S), треонином (T), глутаматом (E) и пролином (P), либо перемежаются на протяжении последовательности XTEN, которая располагается внутри или между мотивами последовательности, либо концентрированы в одном или более коротком отрезке последовательности XTEN, например, для создания линкера между XTEN и компонентами FVIII. В подобном случаях, когда компонент XTEN CFXTEN содержит аминокислоты, которые не являются глицином (G), аланином (A), серином (S), треонином (T), глутаматом (E) и пролином (P), предпочтительно, менее около 2% или менее около 1% аминокислот являются гидрофобными остатками, так, что получаемые последовательности как правило не имеют вторичную структуру, например, не имеют более чем 2% альфа-спирали или 2% бета-листов, что определяют с помощью способов, раскрытых в данном документе. Гидрофобные остатки, которые явля-

ются менее приемлемыми в построении XTEN, содержат триптофан, фенилаланин, тирозин, лейцин, изолейцин, валин и метионин. Дополнительно, возможно построить последовательности XTEN для того, чтобы они содержали менее 5%, или менее 4%, или менее 3%, или менее 2%, или менее 1%. Или не содержали ни одной из следующих аминокислот: цистеина (чтобы избежать образования дисульфида и окисления), метионина (чтобы избежать окисления), аспарагина и глутамина (чтобы избежать дезаминирования). Таким образом, в отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения компонент XTEN гибридного белка CFXTEN, который содержит другие аминокислоты, в дополнение к глицину (G), аланину (A), серину (S), треонину (T), глутамату (E) и пролину (P) имеет последовательность с менее 5% остатков, участвующих в альфа-спиралях и бета-листах, как измерено с помощью алгоритма Chou-Fasman и имеет по меньшей мере 90%, или по меньшей мере около 95%, или более образования случайной спирали, как измерено с помощью алгоритма GOR.

3. Длина последовательности.

В дополнительных аспектах настоящее изобретение обеспечивает XTEN различной длины для включения в композиции CFXTEN, при том, что длину последовательности(ей) XTEN выбирают, основываясь на свойстве или функции, получаемых в гибридном белке. В зависимости от предполагаемого свойства или функции, композиции CFXTEN содержат XTEN короткой или средней длины, расположенный внутри последовательности FVIII или между доменами FVIII и/или более длинных последовательностей XTEN, которые могут служить в качестве носителей, локализованных в гибридных белках, как описано в данном документе. Хотя это и не подразумевает ограничение, XTEN или фрагменты XTEN содержат короткие сегменты от около 6 до около 99 аминокислотных остатков, средней длины от около 100 до около 399 аминокислотных остатков, и более длинные от около 400 до около 1000 и до около 3000 аминокислотных остатков. Таким образом, XTEN для включения субъекту CFXTEN охватывает XTEN или фрагменты XTEN с длиной около 6, или около 12, или около 36, или около 40, или около 42, или около 72 или около 96, или около 144, или около 288, или около 400, или около 500, или около 576, или около 600, или около 700, или около 800, или около 864, или около 900, или около 1000, или около 1500, или около 2000, или около 2500, или до около 3000 аминокислотных остатков в длину. Кроме того, последовательности XTEN может быть от около 6 до около 50, от около 50 до около 100, от около 100 до 150, от около 150 до 250, от около 250 до 400, от около 400 до около 500, от около 500 до около 900, от около 900 до 1500, от около 1500 до 2000, или от около 2000 до около 3000 аминокислотных остатков в длину. Точная длина XTEN, встроенного субъекту CFXTEN, может меняться без отрицательного влияния на активность композиции CFXTEN. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения один или несколько XTEN, который используют в CFXTEN, раскрытом в данном документе, имеет 36 аминокислот, 42 аминокислот, 144 аминокислот, 288 аминокислот, 576 аминокислот или 864 аминокислоты в длину и может быть выбран из одной из последовательностей семейства XTEN; т.е. AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC или BD. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения два или более XTEN, которые используют в CFXTEN, раскрытом в данном документе, имеют 36 аминокислот, 42 аминокислот, 144 аминокислот, 288 аминокислот, 576 аминокислот, или 864 аминокислот в длину и могут быть выбраны из двух последовательностей семейства XTEN; т.е. AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC или BD, с предпочтительными комбинациями последовательностей семейств AE и AG. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения CFXTEN, который содержит один или несколько XTEN, используемых в данном документе, содержит XTEN, выбранный из любой из последовательностей из табл. 4, который может быть связан с компонентом FVIII напрямую или посредством последовательностей спейсера, раскрытых в данном документе.

В частности структуры конформации CFXTEN, где XTEN служит в качестве конформационно-лабильного линкера, или вводят во внешние петли или неупорядоченные области последовательности FVIII для того, чтобы повысить массу, гибкость или гидрофильность области, или которые предназначены для того, чтобы мешать выведению рецепторов в случае FVIII для повышения фармакокинетических свойств, или для того, чтобы помешать связыванию с ингибиторами FVIII или другими анти-FVIII антителами, или при условии, что XTEN короткой или средней длины используют для облегчения проникновения в ткань или для изменения силы взаимодействий гибридного белка CFXTEN с его мишенью, или при условии, что желательно распределить суммарную длину XTEN в сегментах короткой или средней длины в нескольких местах в пределах последовательности FVIII, настоящее изобретение предусматривает композиции CFXTEN с одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или более последовательностями XTEN короткой или средней длины, вводимыми между, или в пределах, одного или нескольких доменов FVIII или в пределах внешних петель, или в других сайтах в последовательностях FVIII, таких как, но без ограничения ими, локализации в или близко к инсерционных сайтах, которые определены в табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9 или, как проиллюстрировано на фиг. 8-9. В отдельном варианте осуществления вышеизложенного, гибридный белок CFXTEN содержит несколько сегментов XTEN, например, по меньшей мере два, или по меньшей мере три, или по меньшей мере четыре, или по меньшей мере пять или более сегментов XTEN, в которых сегменты XTEN могут быть идентичными или они могут быть различными и при этом CFXTEN сохраняет по меньшей мере 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70% или более прокоагулянтной активности природного FVIII, при условии, что анализируют с помощью одного из анали-

зов, раскрытых в данном документе. В других конкретных структурах конформации CFXTEN, при условии, что XTEN служит в качестве носителя, для того, чтобы повысить массу гибридного белка, или для изменения силы взаимодействий гибридного белка CFXTEN с его мишенью или для повышения фармакокинетических свойств гибридного белка, настоящее изобретение предусматривает композиции CFXTEN с одной или несколькими последовательностями XTEN средней или большой длины, вводимыми на С-конце, в домене B (или остатке последовательности BDD) между, или в пределах одного или нескольких, доменами FVIII, в пределах внешних петель, или в других сайтах в последовательностях FVIII таких как, но без ограничения ими, инсерционные сайты, которые определены в табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8, и табл. 9, или как проиллюстрировано на фиг. 8-9. Несмотря на это, считается, что включение нескольких XTEN от короткой до средней длины в композиции CFXTEN придает гибридным белкам улучшенные свойства, по сравнению с гибридными белками CFXTEN с тем же количеством аминокислот с меньшим количеством, но большей длиной, XTEN, и все еще приводят к композиции с прокоагулянтной активностью и расширенным временем полужизни; обоснование которого описано в данном документе в отношении полученных радиусов нескольких XTEN.

В вариантах осуществления настоящего изобретения, где гибридные белки CFXTEN составляют несколько последовательностей XTEN, суммарная длина общего объема остатков в последовательностях XTEN составляет более от около 100 до около 3000, или от около 200 до около 2000, или от около 400 до около 1000 аминокислотных остатков и XTEN могут быть идентичными или они могут быть различными в последовательности, суммарном заряде или длине. В отдельном варианте осуществления CFXTEN, который содержит несколько XTEN, каждая из отдельных последовательностей XTEN проявляет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или, альтернативно, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности последовательности, по сравнению с мотивом или XTEN, выбранным из табл. 3, 4 и 13-17 или их фрагментом, при оптимальном выравнивании с последовательностью сопоставимой длины.

Как описано более подробно ниже, способы, в которых раскрыты CFXTEN, создают с помощью выбора длины XTEN и его сайта включения в пределах CFXTEN, чтобы придать целевое время полужизни, сохранить прокоагулянтную активность, снизить связывание с ингибиторами FVIII или улучшить физико-химические свойства (например, стабильность или растворимость) гибридного белка CFXTEN, создают и экспрессируют кодирующую конструкцию и изолируют и восстанавливают рекомбинантные гибридные белки CFXTEN. В общем, суммарные длины XTEN, больше чем около 400 остатков, встроенных в композиции CFXTEN, приводят к более продолжительному времени полужизни, по сравнению с более короткими суммарными длинами, например, короче около 280 остатков. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения структуры гибридных белков CFXTEN, как предполагается, содержат в качестве носителя по меньшей мере отдельный XTEN, с длиной последовательности по меньшей мере около 400, или по меньшей мере около 600, или по меньшей мере около 800, или по меньшей мере около 900, или по меньшей мере около 1000 или более аминокислот. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения несколько XTEN включены в гибридные белки для того, чтобы достигнуть суммарной длины в по меньшей мере около 400, или по меньшей мере около 600, или по меньшей мере около 800, или по меньшей мере около 900, или по меньшей мере около 1000 или более аминокислот, при том, что XTEN в последовательностях или длине могут быть идентичными или различными. Как используется в данном документе, "суммарная длина" предназначена для того, чтобы охватывать общую длину, в аминокислотных остатках, при условии что в гибридный белок CFXTEN встраивают более чем один XTEN. Оба вышеприведенных варианта осуществления настоящего изобретения создают для того, чтобы после введения субъекту придать увеличенную биодоступность и/или увеличенное конечное время полужизни, по сравнению с CFXTEN, который содержит более короткие совокупные длины XTEN и все еще приводит к прокоагулянтной активности и эффекту гемостаза. При введении подкожно или внутримышечно, C_{max} снижено, но площадь под кривой (AUC) увеличивается, по сравнению с аналогичной дозой CFXTEN с более короткой суммарной длиной XTEN или FVIII, не связанного с XTEN, тем самым участвующего в способности поддерживать эффективные уровни композиции CFXTEN в течение более продолжительного периода времени и позволяет увеличить периоды до 2, 4, 7, 10, 14 или 21 день между дозами, как описано более подробно ниже. Таким образом, XTEN придает свойство депо введенному CFXTEN, в дополнение к другим физико-химическим свойствам, описанным в данном документе.

Если в качестве носителя используют XTEN, настоящее изобретение использует преимущество открытия того, что возрастание длины неповторяющихся, неструктурированных полипептидов усиливает неструктурированную природу XTEN и соответственно усиливает физические/химические и фармакокинетические свойства гибридных белков, которые содержат носитель XTEN. Как описано более подробно в примерах, пропорциональное увеличение длины XTEN, даже если создано с помощью повторяющегося порядка мотивов последовательностях отдельного семейства (например, четыре мотива AE из табл. 3), приводит к последовательности с большим процентом (например, 90% или более) образования случайной спирали, что определяют с помощью алгоритма GOR, или сниженному содержанию альфа-спиралей или бета-листов (например, менее 2%), что определяют с помощью алгоритма Chou-Fasman, по сравне-

нию с более короткими длинами XTEN. Кроме того, возрастание длины гибридного партнера неструктурированного полипептида, как описано в примерах, приводит к гибридному белку с непропорциональным повышением конечного времени полужизни (например, вплоть до 50, 100, 200 или более часов), по сравнению с гибридными белками с неструктурированными полипептидными партнерами с более короткими длинами последовательностей. Улучшенные фармакокинетические свойства CFXTEN, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, описаны более подробно ниже.

В дополнительных аспектах настоящее изобретение обеспечивает способы создания XTEN короткой или средней длины из более длинных "донорных" последовательностей XTEN, при том, что более продолжительная донорная последовательность XTEN является процессированной по N-концу, или C-концу, или фрагмент создают из внутренней части донорной последовательности, что, таким образом, приводит к короткой или средней длине XTEN. В неограничивающих примерах, как схематически проиллюстрировано на фиг. 16A-C, последовательность AG из 864 аминокислотных остатков может быть процессирована для получения последовательности AG из 144 остатков, последовательности AG из 288 остатков, последовательности AG из 576 остатков или другими средними длинами, если последовательность AE из 864 остатков (как проиллюстрировано на фиг. 16D, E) может быть процессирована для получения нескольких последовательностей AE из 144 остатков, последовательности AE из 288 или 576 остатков, или других более коротких или средних длин. Отдельно предусмотрено, что такой подход может быть использован с любым из вариантов осуществления XTEN, описанным в данном документе или с любой из последовательностей, приведенных в табл. 4 или 13-17 для того, чтобы привести к XTEN необходимой длины. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения CFXTEN, который содержит несколько XTEN, имеет XTEN, который демонстрирует по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностями, выбранными из AE42_1, AE42_2, AE42_3, AG42_1, AG42_2, AG42_3, AG42_4, AE144_1A, AE144_2A, AE144_2B, AE144_3A, AE144_3B, AE144_4A, AE144_4B, AE144_5A, AE144_6B, AG144_1, AG144_2, AG144_A, AG144_B, AG144_C, AG144_F, AG144_3, AG144_4, AE288_1, AE288_2, AG288_1, AG288_2 и AG288_DE.

4. Суммарный заряд.

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения неструктурированная характеристика полипептида XTEN может быть улучшена с помощью включения аминокислотных остатков с суммарным зарядом и/или уменьшения общего процента (например, менее 5%, или 4%, или 3%, или 2%, или 1%) гидрофобных аминокислот в последовательностях XTEN. В целом, суммарный заряд и плотность суммарного заряда контролируют изменением содержания заряженных аминокислот в последовательностях XTEN, либо положительных, либо отрицательных, с суммарным зарядом, как правило, представленным в виде процента аминокислот полипептида, которые создают заряженное состояние, помимо тех остатков, которые были аннулированы остатком с противоположным зарядом. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения плотность суммарного заряда XTEN композиций может быть выше +0,1 или ниже -0,1 заряда/остаток. Под "плотностью суммарного заряда" протеина или пептида в данном документе подразумевают суммарный заряд, деленный на общее количество аминокислот в протеине или пропептиде. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения суммарный заряд XTEN может составлять около 0%, около 1%, около 2%, около 3%, около 4%, около 5%, около 6%, около 7%, около 8%, около 9%, около 10% около 11%, около 12%, около 13%, около 14%, около 15%, около 16%, около 17%, около 18%, около 19%, или около 20% или более. Основываясь на суммарном заряде, некоторые XTEN имеют изоэлектрическую точку (pI), равную 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 или даже 6,5. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения XTEN будет иметь изоэлектрическую точку между 1,5 и 4,5 и несет отрицательный суммарный заряд при физиологических условиях.

Так как большинство тканей и поверхностей у человека или животного имеют отрицательный заряд, в некоторых вариантах осуществления последовательности XTEN разработаны, чтобы иметь отрицательный заряд, для того, чтобы минимизировать неспецифические взаимодействия между XTEN, который содержит композиции, и различными поверхностями, такими как кровяные сосуды, здоровые ткани или различные рецепторы. Без привязки к какой-либо теории, XTEN может принять открытые конформации в связи с электростатическим отталкиванием между отдельными аминокислотами полипептида XTEN, которые по отдельности несут отрицательный заряд, и которые распределены по последовательности полипептида XTEN. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность XTEN строят с по меньшей мере 90% или 95% заряженных остатков, разделенных другими остатками, такими как серин, аланин, треонин, пролин или глицин, что приводит к более равномерному распределению заряда, лучшей экспрессии или очищенному состоянию. Такое распределение чистого отрицательного заряда в расширенных длинах последовательности XTEN может привести к неструктурированной конформации, что, в свою очередь, может привести к эффективному увеличению гидроди-

намического радиуса. В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения отрицательный заряд конкретного XTEN обеспечивают с помощью включения остатков глутаминовой кислоты. Как правило, остатки глутаминовой кислоты разнесены равномерно по всей последовательности XTEN. В отдельных случаях, XTEN может содержать около 10-80, или около 15-60, или около 20-50 остатков глутаминовой кислоты на 20кДа XTEN, что может привести к XTEN с заряженными остатками, которые имеют очень похожие pKa, что может повысить гомогенность заряда продукта и уменьшает его изоэлектрическую точку, повышает физико-химические свойства получаемого гибридного белка CFXTEN в случае, как следствие, упрощения процедуры очистки. Например, когда XTEN с отрицательный заряд является желательным, XTEN может быть выбран только из семейства последовательностей AE, которое имеет приблизительно 17% суммарного заряда за счет включенной глутаминовой кислоты, или может включать в себя различные количества содержащих глутаминовую кислоту мотивов из табл. 3, чтобы обеспечить желаемую степень суммарного заряда. Неограничивающие примеры AE XTEN содержат, но без ограничения ими, 36, 42, 144, 288, 576, 624, 864 и 912 последовательностей семейства AE из табл. 4 и 14, или их фрагменты. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения последовательность XTEN из табл. 4, или 13-17 может быть изменена, чтобы включать в себя дополнительные остатки глутаминовой кислоты для достижения желаемого отрицательного заряда. Соответственно, в отдельном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает XTEN, в котором последовательности XTEN содержат около 1, 2, 4, 8, 10, 15, 17, 20, 25% или даже около 30% глутаминовой кислоты. В отдельном варианте осуществления настоящее изобретение для достижения отрицательного заряда в дополнение к глутаминовой кислоте предусматривает включение в XTEN до 5% остатков аспарагиновой кислоты.

В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения, в которых желательно отсутствие суммарного заряда, XTEN может быть выбран из, например, компонентов AG XTEN, таких как мотивы AG из табл. 3, или мотивов AM из табл. 3, которые не имеют суммарный заряд. Неограничивающие примеры AG XTEN содержат, но без ограничения ими, 36, 42, 144, 288, 576 и 864 последовательностей семейства AG из табл. 4 и 16, или их фрагменты. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения XTEN может содержать различные количества мотивов AE и AG (для того, чтобы иметь полный заряд, который считается оптимальным для данного использования или для поддержания заданного физико-химического свойства.

Без привязки к какой-либо теории, XTEN композиций CFXTEN с более высоким суммарным зарядом, как ожидается, имеют меньше неспецифических взаимодействий с различными отрицательно заряженными поверхностями, такими как кровеносные сосуды, ткани или различные рецепторы, что будет способствовать дальнейшему снижению активного клиренса. С другой стороны, считается, что XTEN композиций CFXTEN с низким (или без) суммарным зарядом будет иметь более высокую степень взаимодействия с поверхностями, которые могут усиливать активность соответствующего фактора свертывания крови, с учетом известного вклада клетки (например, тромбоцитов) и сосудистых поверхностей в процесс коагуляции и интенсивности активации факторов свертывания (Zhou, R., et al., Biomaterials (2005) 26(16):2965-2973; London, F., et al. Biochemistry (2000) 39(32):9850-9858).

XTEN композиций по настоящему изобретению как правило не имеют или имеют низкое содержание положительно заряженных аминокислот. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения XTEN могут иметь менее около 10% аминокислотных остатков с положительным зарядом, или менее около 7%, или менее около 5%, или менее около 2%, или менее около 1% аминокислотных остатков с положительным зарядом. Несмотря на это, настоящее изобретение предусматривает конструкции, в которых ограниченное количество аминокислот с положительным зарядом, таких как лизин, включено в XTEN, чтобы обеспечить конъюгацию между эпсилон-амином лизина и функциональной группой на пептиде, линкерном мостике или функциональной группе на лекарственном средстве или малой молекуле, которая конъюгируется с остовом XTEN. В отдельном варианте осуществления вышеизложенного, XTEN конкретного CFXTEN имеет от около 1 до около 100 остатков лизина, или от около 1 до около 70 остатков лизина, или от около 1 до около 50 остатков лизина, или от около 1 до около 30 остатков лизина, или от около 1 до около 20 остатков лизина, или от около 1 до около 10 остатков лизина, или от около 1 до около 5 остатков лизина, или, альтернативно, только один остаток лизина. С использованием вышеуказанного лизин-содержащего XTEN, могут быть построены гибридные белки, которые составляют XTEN, фактор свертывания FVIII, плюс химиотерапевтическое средство или другой фактор свертывания или кофактор, используемый при лечении коагулопатических состояний, при том, что максимальное количество молекул средства, встроенных в компонент XTEN, определяют с помощью количества лизина или других аминокислот с реакционноспособными боковыми цепями (например, цистеина), встроенных в XTEN.

Как гидрофобные аминокислоты придают структуру полипептиду, так настоящее изобретение обеспечивает то, что содержание гидрофобных аминокислот в XTEN составляет, как правило, менее 5%, или менее 2%, или менее 1% содержания гидрофобных аминокислот. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения содержание аминокислот метионина и триптофана в компоненте XTEN гибридного белка CFXTEN составляет, как правило, менее 5%, или менее 2%, и, более предпочтительно,

менее 1%. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения XTEN конкретных композиций CFXTEN будет иметь последовательность, которая имеет менее 10% аминокислотных остатков с положительным зарядом, или менее около 7%, или менее около 5%, или менее около 2% аминокислотных остатков с положительным зарядом, сумма остатков метионина и триптофана составляет менее 2%, а сумма остатков аспарагина и глутамина составляет менее 5% от общей последовательности XTEN.

5. Низкая иммуногенность.

В дополнительных аспектах последовательности XTEN, которые обеспечивают в данном документе, имеют низкую степень иммуногенности или являются по существу неиммуногенными. Ряд факторов может способствовать низкой иммуногенности XTEN, например, неповторяющаяся последовательность, неструктурированная конформация, высокая степень растворимости, низкая степень или отсутствие самоагрегатирования, низкая степень или отсутствие протеолитических сайтов в пределах последовательности и низкая степень или отсутствие эпитопов в последовательностях XTEN.

Конформационные эпитопы образуют с помощью области поверхности протеина, которая состоит из нескольких прерывистых аминокислотных последовательностей антигена протеина. Точное складывание белка переводит эти последовательности в четко определенные, устойчивые пространственные конформации, или эпитопы, которые могут быть признаны в качестве "чужеродной" гуморальной иммунной системой хозяина, что приводит к получение антитела к протеину или активации иммунного клеточного ответа. В последнем случае, иммунный ответ к белку человека в значительной степени зависит от распознавания эпитопа Т-клеток, что является функцией специфичности связывания пептида аллотипа HLA-DR этого индивидуума. Участие пептидного комплекса MHC Class II с помощью родственного Т-клеточного рецептора на поверхности Т-клетки, а также кросс-связывания некоторых других сорецепторов, таких как молекулы CD4, могут вызывать активированные состояния в пределах Т-клетки. Активация приводит к высвобождению цитокинов, активирующих дополнительно другие лимфоциты, такие как В-клетки, для получения антитела или активизации Т клеток-киллеров в качестве полного клеточного иммунного ответа.

Способность пептида связывать данную молекулу MHC Class II для представления на поверхности APC (антигенпрезентирующей клетки) зависит от ряда факторов; особенно от его первичной последовательности. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения более низкую степень иммуногенности выполняют с помощью создания последовательности XTEN, которые сопротивляются обработке антигена в антигенпрезентирующих клетках, и/или выбора последовательностей, которые также не связываются с MHC-рецепторами. Настоящее изобретение обеспечивает гибридные белки CFXTEN с по существу неповторяющимися полипептидами XTEN, созданными для снижения связывания с рецепторами MHC II, а также предотвращение образования эпитопов Т-клеточного рецептора или связывания антитела, что приводит к низкой степени иммуногенности. Избежание иммуногенности возможно приписать, по крайней мере частично, результату конформационной гибкости последовательностей XTEN; т.е. отсутствию вторичной структуры за счет выбора порядка и аминокислотных остатков. Например, особый интерес представляют собой последовательности, имеющие в водном растворе или в физиологических условиях низкую склонность принимать компактно сложенные конформации, что может привести к конформационным эпитопам. Введение гибридных белков, которые содержат XTEN, с использованием обычных терапевтических методов и дозирования, как правило, не приводит к образованию нейтрализующих антител к последовательности XTEN, а также снижает иммуногенность гибридного партнера FVIII в композициях CFXTEN.

В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения последовательности XTEN, которые используют в гибридных белках субъекта, может быть по существу свободными от эпитопов, распознаваемых Т-клеткой человека. Устранение таких эпитопов с целью генерации менее иммуногенных белков было раскрыто ранее; смотри например WO 98/52976, WO 02/079232 и WO 00/3317, которые включены в данный документ в виде ссылки. Анализы эпитопов Т-клеток человека были описаны (Stickler, M., et al. (2003) J Immunol Methods, 281: 95-108). Особый интерес представляют пептидные последовательности, которые могут быть олигомеризованы без генерации Т-клеточных эпитопов или нечеловеческих последовательностей. Это достигается путем тестирования прямых повторений этих последовательностей на наличие Т-клеточных эпитопов и для возникновения от 6- до 15-мерных и, в частности, 9-мерных последовательностей, которые не являются человеческими, а затем изменяют конструкцию последовательности XTEN для устранения или нарушения последовательности эпитопа. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения последовательности XTEN являются по существу неиммуногенными по рестрикциям количеств эпитопов XTEN, прогнозируемо связывающих рецепторы MHC. С уменьшением количества эпитопов, способных связываться с рецепторами MHC, существует сопутствующее уменьшение потенциала активации Т клетки, а также хелперной функции Т клетки, сниженная активация В клетки или положительная регуляция и сниженное получение антитела. Низкая степень прогнозируемых эпитопов Т-клеток может быть определена с помощью алгоритмов прогноза эпитопа, таких как, например, TEPITOPE (Sturniolo, T., et al. (1999) Nat Biotechnol, 17: 555-61), как показано в примере 46. Результат TEPITOPE в случае фрейма данного пептид в пределах протеина составляет log K_d (константа диссоциации, аффинность, скорость диссоциации) связывания фрейма этого пептида с несколькими из наибо-

лее распространенных человеческих аллелей MHC, как раскрыто в Sturniolo, T. et al. (1999) Nature Biotechnology 17:555). Результат изменяется в диапазоне по меньшей мере 20 единиц, от около 10 до около -10 (что соответствует ограничениям связывания от $10e^{10}$ K_d до $10e^{-10}$ K_d), и может быть уменьшено, если избегать гидрофобных аминокислот, которые служат в качестве якорных остатков во время отображения пептида в MHC, таком как M, I, L, V, F. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения компонент XTEN, встроенный в CFXTEN, не имеет прогнозируемого Т-клеточного эпитопа при пороговой величины TEPITOPE, составляющей около -5, или -6, или -7, или -8, или -9, или при результате TEPITOPE -10. Как используется в данном документе, результат "-9" является более жестким результатом TEPITOPE, чем результат -5.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения патентоспособные последовательности XTEN, в том числе содержащие встроенные субъекту гибридные белки CFXTEN, оказываются существенно неиммуногенным ограничением известных протеолитических сайтов из последовательности XTEN, уменьшая обработку XTEN в малые пептиды, которые могут связываться с рецепторами MHC II. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения последовательность XTEN оказывается по существу неиммуногенной при использовании последовательности, которая представляет собой по существу лишенную вторичной структуры, придающий устойчивость ко многим протеазам в соответствии с высокой энтропией структуры. Соответственно, сниженный результат TEPITOPE и устранение известных протеолитических сайтов из XTEN воспроизводят композиции XTEN, которые содержат XTEN композиций гибридного белка CFXTEN, по существу неспособные связываться рецепторами млекопитающих, в том числе иммунной системы или рецептором активного выведения целевого FVIII. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения XTEN гибридного белка CFXTEN может иметь >100 нмоль K_d связывания с рецепторами млекопитающих, или выше 500 нмоль кДа, или выше 1 мкмоль K_d к рецептору клеточной поверхности млекопитающего или рецептору циркулирующего полипептида.

Дополнительно, неповторяющаяся последовательность и соответствующее отсутствие эпитопов XTEN ограничивает способность В-клеток связываться с, или активироваться, XTEN. Повторяющаяся последовательность распознает и может образовывать мультивалентные контакты даже с некоторыми В-клетками и, как следствие, сшивание нескольких независимых рецепторов Т-клеток может стимулировать пролиферацию В-клеток и получение антител. В противоположность этому, в то время как XTEN может образовывать контакты с множеством различных В-клеток, по сравнению с его расширенной последовательностью, каждая отдельная В-клетка может образовывать только один или небольшое число контактов с отдельным XTEN, из-за отсутствия повторяемости последовательности. Не будучи связанными с какой-либо теорией, XTEN, как правило, имеет гораздо меньшую тенденцию стимулировать пролиферацию В-клеток и, таким образом, иммунный ответ. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN снижает иммуногенность, по сравнению с соответствующим FVIII, который является не слитым с XTEN. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения введение до трех парентеральных доз CFXTEN млекопитающему приводит к обнаруживаемому анти-CFXTEN IgG в титре сыворотки 1:100, но не при разбавлении 1:1000. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения введение до трех парентеральных доз CFXTEN млекопитающему приводит к обнаруживаемому анти-FVIII IgG в титре сыворотки 1:100 но не при разбавлении 1:1000. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения введение до трех парентеральных доз CFXTEN млекопитающему привести к обнаруживаемому анти-XTEN IgG в титре сыворотки 1:100 но не при разбавлении 1:1000. В вышеприведенных вариантах осуществления млекопитающее может быть мышью, крысой, кроликом или собакоподобной обезьяной.

Дополнительным признаком XTEN с неповторяющимися последовательностями, по отношению к последовательностям с высокой степенью повторяемости, является неповторяющейся формой XTEN с более слабыми контактами с антителом. Антитела представляют собой мультивалентные молекулы. Например, IgG имеет два идентичных связывающих сайта и IgM содержит 10 идентичных связывающих сайтов. Таким образом, антитела против повторяющихся последовательностей могут образовывать мультивалентные контакты с такими повторяющимися последовательностями с высокой авидностью, которые могут влиять на специфическую активность и/или ликвидацию таких повторяющихся последовательностей. В противоположность этому, антитела против неповторяющегося XTEN могут дать моновалентные взаимодействия, что приводит к меньшей возможности иммунного ответа, так, что композиции CFXTEN композиции могут оставаться в обращении в течение увеличенного периода времени. Кроме того, как полагают, как схематически проиллюстрировано на фиг. 6, конформационно-лабильная неструктурированная природа XTEN обеспечивает стерическое затруднение области FVIII, близкой к сайту вставки XTEN, и обеспечивает стерическое затруднение для связывания ингибиторами FVIII.

В дополнительных аспектах субъект XTEN, используемый в качестве гибридного партнер, имеет большой гидродинамический радиус; это свойство в отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения придает соответствующее увеличение кажущейся молекулярной массы гибридному белку CFXTEN, содержащему XTEN, в то время как в дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения увеличивает стерическое затруднение ингибиторам FVIII и анти-FVIII антителам, снижает

их способность связываться с CFXTEN. Как описано в примере 26, связывание XTEN с терапевтическими белковыми последовательностями приводит к композиции CFXTEN, которая может иметь увеличенные гидродинамические радиусы, увеличенную среднюю молекулярную массу и увеличенный коэффициент средней молекулярной массы, по сравнению с терапевтическим протеином, не связанным с XTEN. Например, в терапевтических применениях, в которых желательно пролонгированное время полужизни, композиции, в которых XTEN с большим гидродинамическим радиусом содержится в виде гибридного белка, содержащего лечебный белок, помимо клубочкового размера пор, который составляет приблизительно 3-5 нмоль, могут эффективно увеличивать гидродинамический радиус композиции, (что соответствует кажущейся молекулярной массе около 70 кДа) (Caliceti. 2003. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. Adv Drug Deliv Rev 55:1261-1277), что приводит к сниженному почечному клиренсу циркулирующих протеинов с соответствующим повышением конечного времени полужизни и других улучшенных фармакокинетических свойств. Гидродинамический радиус протеина обеспечивают с помощью его молекулярной массы, а также с помощью его структуры, в том числе формы или компактности. Без привязки к какой-либо теории, XTEN может принимать открытые конформации, в соответствии с электростатическим отталкиванием между отдельными зарядами пептида или врожденной гибкости сообщаемой конкретных аминокислот в последовательностях, которые не имеют возможности принимать вторичную структуру. Открытая, расширенная и неструктурированная конформация полипептида XTEN может иметь больший пропорциональный гидродинамический радиус, по сравнению с полипептидами последовательности аналогичной длины и/или молекулярной массой, которые имеют вторичную и/или третичную структуру, например, обычные глобулярные белки. Способы определения гидродинамического радиуса хорошо известны в данной области техники, например, с помощью использования гель-проникающей хроматографии (SEC), как описано в патентах США № 6406632 и 7294513. Пример 26 показывает, что увеличение длины XTEN приводит к пропорциональному повышению гидродинамического радиуса, средней молекулярной массы и/или коэффициента средней молекулярной массы, и, таким образом, позволяет сшивать CFXTEN до нужных предельных значений средних молекулярных масс или гидродинамических радиусов. Соответственно, в отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения гибридный белок CFXTEN может быть сконфигурирован с XTEN так, что гибридный белок может иметь гидродинамический радиус по меньшей мере около 5 нм, или по меньшей мере около 8 нм, или по меньшей мере около 10 нм, или около 12 нм, или около 15 нм, или около 20 нм, или около 30 нмоль или более. В предыдущих вариантах осуществления настоящего изобретения большой гидродинамический радиус, обеспеченный XTEN, в гибридном белке CFXTEN может привести к сниженному выведению получаемого гибридного белка, повышению конечного времени полужизни и повышению среднего времени удержания.

Как правило, фактическая молекулярная масса зрелой формы компонента FVIII составляет около 265 кДа, в то время как в случае FVIII BDD, она составляет около 165 кДа. Фактическая молекулярная масса гибридного белка CFXTEN, в случае содержания FVIII BDD, плюс одного или нескольких XTEN, изменяется в диапазоне от около 200 до около 270 кДа, в зависимости от длины компонентов XTEN. Как описано в примерах, если молекулярные массы гибридных белков CFXTEN получают из анализов с помощью гель-проникающей хроматографии, открытая конформация XTEN, в связи с низкой степенью вторичной структуры, приводит к повышению кажущейся молекулярной массы гибридных белков, в которые они встроены. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения CFXTEN, который содержит FVIII и по меньшей мере один или несколько XTEN, проявляет кажущуюся молекулярную массу по меньшей мере около 400 кДа, или по меньшей мере около 500 кДа, или по меньшей мере около 700 кДа, или по меньшей мере около 1000 кДа, или по меньшей мере около 1400 кДа, или по меньшей мере около 1600 кДа, или по меньшей мере около 1800 кДа, или по меньшей мере около 2000 кДа. Соответственно, гибридные белки CFXTEN, которые содержат один или несколько XTEN, проявляют кажущуюся молекулярную массу, которая составляет в около 1,3 раза больше, или в около 2 раза больше, или в около 3 раза выше или в около 4 раза больше, или в около 8 раз больше, или в около 10 раз больше, или в около 12 раз больше, или в около 15 раз выше фактической молекулярной массы гибридного белка. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения изолированный гибридный белок CFXTEN по любому из вариантов осуществления настоящего изобретения, раскрытый в данном документе, демонстрирует коэффициент средней молекулярной массы при физиологических условиях, который является выше в около 1,3, или около 2, или около 3, или около 4, или около 5, или около 6, или около 7, или около 8, или около 10, или выше в около 15 раз. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок CFXTEN имеет, при физиологических условиях, коэффициент средней молекулярной массы, который по отношению к фактической молекулярной массы гибридного белка больше в от около 3 до около 20, или от около 5 до около 15, или составляет от около 8 до около 12, или составляет от около 9 до около 10 раз. Считается, что увеличенная кажущаяся молекулярная масса заявленных композиций CFXTEN усиливает фармакокинетические свойства гибридных белков путем комбинирования факторов, которые содержат сниженный активный клиренс, сниженное связывание ингибиторами FVIII и снижение потерь при прикапиллярном и венозном кровотечении.

Композиции CFXTEN

Настоящее изобретение обеспечивает композиции, которые содержат гибридные белки, имеющие фактор VIII, связанный с одной или несколькими последовательностями XTEN, при том, что гибридный белок оказывает действие, чтобы при введении субъекту заменить или дополнить количество существующих во внутреннем или контактном активированном пути свертывания FVIII. Настоящее изобретение удовлетворяет давно испытываемую потребность в возрастании конечного времени полужизни экзогенно вводимого субъекту, нуждающемуся в этом, фактора VIII. Одним из способов повышения времени полужизни терапевтического протеина в кровотоке является обеспечение того, что уменьшается почечный клиренс или метаболизм белка. Другим способом повысить конечное время полужизни является снижение активного выведения терапевтического протеина, при условии опосредования рецепторами активного метаболизма протеина или других эндогенных механизмов. Оба способа могут осуществлять с помощью конъюгирования протеина с полимером, который, с одной стороны, способен обеспечивать увеличенный молекулярный размер (или гидродинамический радиус) протеина и, следовательно, сниженный почечный клиренс, и, с другой стороны, препятствует связыванию протеина для очистки рецепторов или других протеинов, которые вносят вклад в метаболизм или клиренс. Таким образом, определенные цели настоящего изобретения содержат, но без ограничения ими, обеспечение улучшенных молекул FVIII с более продолжительным временем полужизни в кровотоке или конечным временем полужизни, уменьшение количества или частоты необходимых введений композиции FVIII, сохраняя по меньшей мере часть активности, по сравнению с природным фактором свертывания VIII и/или увеличивая способность лечить дефекты свертывания и неконтролируемые кровотечения более успешно, более эффективно, более экономично и/или с более высоким уровнем безопасности, по сравнению с имеющимися доступными составами фактора VIII.

Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает композиции гибридного белка рекомбинантного фактора VIII, которые содержат FVIII, ковалентно связанный с одним или несколькими расширенными рекомбинантными полипептидами ("XTEN"), что приводит к композиции гибридного белка CFXTEN. Термин "CFXTEN", который используют в данном документе, подразумевает то, что охватывают гибридные полипептиды, которые составляют по меньшей мере одну область полезной нагрузки, которая содержит FVIII, или часть FVIII, способный с прокоагулянтной активностью связываться с фактором свертывания FVIII и по меньшей мере одной другой областью, которая содержит один или несколько полипептидов XTEN, которые могут быть рассеяны в пределах области полезной нагрузки и/или связаны с концом. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения FVIII представляет собой природный FVIII. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения FVIII представляет собой вариант последовательности, фрагмент, гомолог или миметик природной последовательности, который сохраняет по меньшей мере часть прокоагулянтной активности природного FVIII, как раскрыто в данном документе. Неограничивающие примеры FVIII, подходящего для включения в композиции, содержат последовательности из табл. 1 или последовательности, которые имеют по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 91%, или по меньшей мере 92%, или по меньшей мере 93%, или по меньшей мере 94%, или по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 96%, или по меньшей мере 97%, или по меньшей мере 98%, или по меньшей мере 99% идентичности последовательности с последовательностью из табл. 1. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения FVIII представляет собой вариант последовательность FVIII без B-доменов (BDD), такую как последовательности BDD из табл. 1, или другие подобные последовательности, известные в данной области техники. В дополнительном предпочтительный варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN содержит вариант последовательности FVIII без B-доменов (BDD), экспрессируемый с природной сигнальной последовательностью из 19 аминокислот, которая расщепляется во время созревания протеина.

Композиции по настоящему изобретению содержат гибридные белки, которые являются применимыми при введении субъекту, нуждающемуся в этом, в случае содействия или профилактики или нейтрализации заболевания, связанного с недостатками фактора VIII или дефектами в эндогенно полученном FVIII, или нарушениями свертываемости, связанными с травмой, операцией, недостатками фактора VIII или дефектами. Особый интерес представляют композиции гибридного белка CFXTEN, в случае которых повышается фармакокинетический параметр, ищут увеличенную растворимость, увеличенную стабильность или некоторое другое улучшенное фармацевтическое свойство, по сравнению с природным FVIII, или в случае которого возрастание конечного времени полужизни улучшало бы эффективность, безопасность или приводило к сниженной частоте дозирования и/или улучшения обслуживания пациентов. Гибридные белки CFXTEN вариантов осуществления настоящего изобретения, раскрытые в данном документе, проявляют одно или несколько, или любую комбинацию, улучшенное свойство и/или варианты осуществления настоящего изобретения, как описано в данном документе. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения композиция слияния CFXTEN остается на уровне выше порогового значения на по меньшей мере 0,01-0,05, или от 0,05 до 0,1, или от 0,1 до 0,4 МЕ/мл при введении субъекту, в течение более продолжительного периода времени, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, и вводят в аналогичной дозе субъекту, который нуждается в этом, (например, такой субъект, как человек, мышь или обезьяна с гемофилией A).

FVIII заявленных композиций, в частности раскрытых в табл. 1, вместе с их соответствующими нуклеотидными и аминокислотными последовательностями, доступны в общедоступных базах данных, таких как Chemical Abstracts Services Databases (например, CAS Registry), GenBank, The Universal Protein Resource (UniProt), в подписке, которая обеспечивает базы данных, такие как GenSeq (например, Derwent), а также в патентной и исходной литературе. Полинуклеотидные последовательности, применимые для экспрессирования последовательностей субъекта CFXTEN, могут быть полинуклеотидной последовательностью дикого типа, которая кодирует данный FVIII (например, либо полноразмерный, либо зрелый), или, в некоторых случаях, последовательность может быть вариантом полинуклеотидной последовательности дикого типа (например, полинуклеотидом, который кодирует биологически активный протеин дикого типа, при том, что последовательность DNA полинуклеотида оптимизирована, например, для экспрессии в конкретных видах, или полинуклеотид кодирует вариант протеина дикого типа, такой как сайт-специфический мутант или аллельный вариант. Это также в пределах компетенции специалиста в данной области, чтобы использовать последовательность cDNA консенсусного или дикого типа, или кодон-оптимизирующий вариант FVIII для создания конструкции CFXTEN, предусмотренные настоящим изобретением, используя способы, известные в данной области техники и/или в сочетании с руководством и способами, представленными в данном документе и описанными более подробно в примерах.

В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок CFXTEN содержит уникальную молекулу FVIII, которая демонстрирует по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или, альтернативно, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностью из табл. 1, связанной с уникальным XTEN (например, XTEN, как описано выше), который содержит, но без ограничения ими, последовательности семейства AE или AG с 42, 144, 288, 576 или 864 аминокислотами, как проиллюстрировано в табл. 4. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN содержит уникальный FVIII, связанный с двумя XTEN, при том, что XTEN может быть одинаковым или они могут быть различными. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок CFXTEN содержит уникальную молекулу FVIII, связанную с одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или более последовательностями XTEN, в которых FVIII представляет собой последовательность, которая имеет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или, альтернативно, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности, по сравнению с белковой последовательностью, выбранной из табл. 1, при оптимальном выравнивании, и каждый один или несколько XTEN имеют по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или, альтернативно, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности, по сравнению с одной или несколькими последовательностями, выбранными из любой из табл. 3, 4 и 13-17, при оптимальном выравнивании. В вышеприведенном варианте осуществления настоящего изобретения, где CFXTEN имеет два или более XTEN, XTEN может быть одинаковым или они могут быть различными последовательностями. В еще одном дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения, гибридный белок CFXTEN содержит уникальный FVIII, который демонстрирует по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или, альтернативно, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности, по сравнению с последовательностями сопоставимой длины, выбранными из табл. 1, при оптимальном выравнивании, при условии, что рассеяны и связаны тремя, четырьмя, пятью, шестью или более последовательностями XTEN, которые могут быть идентичными или могут быть различными и при том, что каждая имеет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или, альтернативно, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности, по сравнению с последовательностями, выбранными из любой из табл. 3, 4 и 13-17, или их фрагментами, при оптимальном выравнивании. В еще одном дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение обеспечивает гибридный белок CFXTEN, который содержит последовательность с по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или, альтернативно, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, или по меньшей мере около 99 или 100% идентичности последовательности с последовательностью из табл. 21, при оптимальном выравнивании.

1. Конформации гибридного белка CFXTEN.

Настоящее изобретение обеспечивает композиции гибридного белка CFXTEN с компонентами CF и XTEN, связанными в специфических конформациях от N- до C-конца.

В отдельном варианте осуществления композиции CFXTEN, настоящее изобретение обеспечивает гибридный белок формулы I:

$$(XTEN)_x\text{-}CF\text{-}(XTEN)_y \qquad I$$

где CF представляет собой фактор VIII, как определено в данном документе, который содержит последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по

меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностями из табл. 1; x представляет собой либо 0, либо 1, а y представляет собой либо 0, либо 1, где x+y≥1; и XTEN представляет собой расширенный рекомбинантный полипептид, как описано в данном документе, который содержит, но без ограничения ими, последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностями, приведенными в табл. 4. Соответственно, композиция слияния CFXTEN может иметь конформации XTEN-CF, XTEN-CF-XTEN или CF-XTEN.

В дополнительном варианте осуществления композиции CFXTEN, настоящее изобретение обеспечивает гибридный белок формулы II:

$$(XTEN)_x\text{-}(S)_x\text{-}(CF)\text{-}(XTEN)_y \qquad II$$

где CF представляет собой фактор VIII, как определено в данном документе, который содержит последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностями, приведенными в табл. 1; S представляет собой спейсерную область, которая имеет от 1 до около 50 аминокислотных остатков, которые могут, необязательно, содержать последовательность расщепления или аминокислоты, совместимые с сайтами рестрикции; x представляет собой либо 0, либо 1, а y представляет собой либо 0, либо 1, где x+y≥1; и XTEN представляет собой расширенный рекомбинантный полипептид, как описано в данном документе, который содержит, но без ограничения ими, последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностями, приведенными в табл. 4. В дополнительном варианте осуществления композиции CFXTEN, настоящее изобретение обеспечивает гибридный белок рекомбинантного фактора VIII, при том, что гибридный белок имеет формулу III

$$(XTEN)_x\text{-}(S)_x\text{-}(CF)\text{-}(S)_y\text{-}(XTEN)_y \qquad III$$

где CF представляет собой фактор VIII, как определено в данном документе, который содержит последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностью представленной в табл. 1; S представляет собой спейсерную область, которая имеет от 1 до около 50 аминокислотных остатков, которые могут, необязательно, содержать последовательность расщепления или аминокислоты, совместимые с сайтами рестрикции; x представляет собой либо 0, либо 1, а y представляет собой либо 0, либо 1, где x+y≥1; и XTEN представляет собой расширенный рекомбинантный полипептид, как описано в данном документе, который содержит, но без ограничения ими, последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностями, приведенными в табл. 4. В дополнительном варианте осуществления композиции CFXTEN, настоящее изобретение обеспечивает гибридный белок рекомбинантного фактора VIII формулы IV

$$(A1)\text{-}(XTEN)_u\text{-}(A2)\text{-}(XTEN)_v\text{-}(B)\text{-}(XTEN)_w\text{-}(A3)\text{-}(XTEN)_x\text{-}(C1)\text{-}(XTEN)_y\text{-}(C2)\text{-}(XTEN)_z \qquad IV$$

где A1 представляет собой домен A1 FVIII; A2 представляет собой домен A2 FVIII; A3 представляет собой домен A3 FVIII; B представляет собой домен B FVIII, который может быть фрагментом или сплайс-вариантом домена B; C1 представляет собой домен C1 FVIII; C2 представляет собой домен C2 FVIII; v представляет собой либо 0, либо 1; w представляет собой либо 0, либо 1; x представляет собой либо 0, либо 1; y представляет собой либо 0, либо 1; y представляет собой либо 0, либо 1 при условии, что u + v + x + y + z ≥1; и XTEN представляет собой расширенный рекомбинантный полипептид, как описано в данном документе, который содержит, но без ограничения ими, последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностями, приведенными в табл. 4. В дополнительном варианте осуществления композиции CFXTEN, настоящее изобретение обеспечивает гибридный белок рекомбинантного фактора VIII формулы V

$$(XTEN)_t\text{-}(S)_a\text{-}(A1)\text{-}(S)_b\text{-}(XTEN)_u\text{-}(S)_b\text{-}(A2)\text{-}(S)_c\text{-}(XTEN)_v\text{-}(S)_c\text{-}(B)\text{-}(S)_d\text{-}(XTEN)_w\text{-}(S)_d\text{-}(A3)\text{-}$$
$$(S)_e\text{-}(XTEN)_x\text{-}(S)_e\text{-}(C1)\text{-}(S)_f\text{-}(XTEN)_y\text{-}(S)_f\text{-}(C2)\text{-}(S)_g\text{-}(XTEN)_z \qquad V$$

где A1 представляет собой домен A1 FVIII; A2 представляет собой домен A2 FVIII; A3 представляет собой домен A3 FVIII; B представляет собой домен B FVIII, который может быть фрагментом или сплайс-вариантом домена B; C1 представляет собой домен C1 FVIII; C2 представляет собой домен C2

FVIII; S представляет собой спейсерную область, которая имеет от 1 до около 50 аминокислотных остатков, которые могут, необязательно, содержать последовательность расщепления или аминокислоты, совместимые с сайтами рестрикции; a представляет собой либо 0, либо 1; b представляет собой либо 0, либо 1; c представляет собой либо 0, либо 1; d представляет собой либо 0, либо 1; e представляет собой либо 0, либо 1; f представляет собой либо 0, либо 1; g представляет собой либо 0, либо 1; t представляет собой либо 0, либо 1; u представляет собой либо 0, либо 1; v представляет собой либо 0, либо 1; w представляет собой 0 или 1, x представляет собой либо 0, либо 1; y представляет собой либо 0, либо 1; z представляет собой либо 0, либо 1 при условии, что t + u + v + w+ x + y + z≥1; и XTEN представляет собой расширенный рекомбинантный полипептид, как описано в данном документе, который содержит, но без ограничения ими, последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностями, приведенными в табл. 4. В дополнительном варианте осуществления формулы V, спейсерная область представляет собой глицин или последовательность, выбранную из табл. 11 и 12.

В дополнительном варианте осуществления композиции CFXTEN, настоящее изобретение обеспечивает гибридный белок рекомбинантного фактора VIII формулы VI

$$(XTEN)_u\text{-}(S)_a\text{-}(A1)\text{-}(S)_b\text{-}(XTEN)_v\text{-}(S)_b\text{-}(A2)\text{-}(S)_c\text{-}(XTEN)_w\text{-}(S)_c\text{-}(A3)\text{-}(S)_d\text{-}(XTEN)_x\text{-}(S)_d\text{-}(C1)\text{-}(S)_e\text{-}(XTEN)_y\text{-}(S)_e\text{-}(C2)\text{-}(S)_f\text{-}(XTEN)_z \quad \text{VI}$$

где A1 представляет собой домен A1 FVIII; A2 представляет собой домен A2 FVIII; A3 представляет собой домен A3 FVIII; C1 представляет собой домен C1 FVIII; C2 представляет собой домен C2 FVIII; S представляет собой спейсерную область, которая имеет от 1 до около 50 аминокислотных остатков, которые могут, необязательно, содержать последовательность(и) расщепления или аминокислоты, совместимые с сайтами рестрикции; a представляет собой либо 0, либо 1; b представляет собой либо 0, либо 1; c представляет собой либо 0, либо 1; d представляет собой либо 0, либо 1; e представляет собой либо 0, либо 1; f представляет собой либо 0, либо 1; u представляет собой либо 0, либо 1; v представляет собой либо 0, либо 1; w представляет собой 0 или 1, x представляет собой либо 0, либо 1; y представляет собой либо 0, либо 1; z представляет собой либо 0, либо 1 при условии, что u + v + w + x + y + z≥1; и XTEN представляет собой расширенный рекомбинантный полипептид, как описано в данном документе, который содержит, но без ограничения ими, последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностями, приведенными в табл. 4. В дополнительном варианте осуществления формулы V, спейсерная область представляет собой глицин или последовательность, выбранную из табл. 11 и 12.

В дополнительном варианте осуществления композиции CFXTEN, настоящее изобретение обеспечивает гибридный белок рекомбинантного фактора VIII формулы VII

$$(SP)\text{-}(XTEN)_x\text{-}(CS)_x\text{-}(S)_x\text{-}(FVIII\_1\text{-}745)\text{-}(S)_y\text{-}(XTEN)_y\text{-}(S)_y\text{-}(FVIII\_1635\text{-}2332)\text{-}(S)_z\text{-}(CS)_z\text{-}(XTEN)_z \quad \text{VII}$$

где SP представляет собой сигнальную последовательность, предпочтительно, с последовательностью MQIELSTCFFLCLLRFCFS (SEQ ID NO: 1611), CS представляет собой последовательность расщепления, приведенную в табл. 12, S представляет собой спейсерную область, которая имеет от 1 до около 50 аминокислотных остатков, которые могут, необязательно, содержать аминокислоты, совместимые с сайтами рестрикции, "FVIII_1-745" представляет собой остатки 1-745 фактора FVIII и "FVIII_1635-2332" представляет собой остатки 1635-2332 FVIII, x представляет собой либо 0, либо 1, y представляет собой либо 0, либо 1, и z представляет собой либо 0, либо 1, где x+y+z>2; и XTEN представляет собой расширенный рекомбинантный полипептид, как описано в данном документе, который содержит, но без ограничения ими, последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности последовательности, приведенные в табл. 4. В отдельном варианте осуществления формулы VII спейсерная область представляет собой GPEGPS (SEQ ID NO: 1612). В дополнительном варианте осуществления формулы V спейсерная область представляет собой глицин или последовательность, выбранную из табл. 11 и 12.

В дополнительном варианте осуществления композиции CFXTEN настоящее изобретение обеспечивает гибридный белок рекомбинантного фактора VIII формулы VIII

$$(A1)\text{-}(S)_a\text{-}(XTEN)_v\text{-}(S)_a\text{-}(A2)\text{-}(B1)\text{-}(S)_b\text{-}(XTEN)_w\text{-}(S)_b\text{-}(B2)\text{-}(A3)\text{-}(S)_c\text{-}(XTEN)_x\text{-}(S)_c\text{-}(C1)\text{-}(S)_d\text{-}(XTEN)_y\text{-}(S)_d\text{-}(C2)\text{-}(S)_e\text{-}(XTEN)_z \quad \text{VIII}$$

где A1 представляет собой домен A1 FVIII; A2 представляет собой домен A2 FVIII; B1 представляет собой фрагмент домена B, который может иметь от остатка 741 до 743-750 FVIII или, альтернативно, от около остатка 741 до около остатка 745 FVIII; B2 представляет собой фрагмент домена B, который может иметь от остатков 1635-1686 до 1689 FVIII или, альтернативно, от около остатка 1640 до около

остатка 1689 FVIII; A3 представляет собой домен A3 FVIII; C1 представляет собой домен C1 FVIII; C2 представляет собой домен C2 FVIII; S представляет собой спейсерную область, которая имеет от 1 до около 50 аминокислотных остатков, которые могут, необязательно, содержать последовательность расщепления или аминокислоты, совместимые с сайтами рестрикции; a представляет собой либо 0, либо 1; b представляет собой либо 0, либо 1; c представляет собой либо 0, либо 1; d представляет собой либо 0, либо 1; e представляет собой либо 0, либо 1; f представляет собой либо 0, либо 1; u представляет собой либо 0, либо 1; v представляет собой либо 0, либо 1; w представляет собой 0 или 1, x представляет собой либо 0, либо 1; y представляет собой либо 0, либо 1; z представляет собой либо 0, либо 1 при условии, что u + v + w + x + y + z≥1; и XTEN представляет собой расширенный рекомбинантный полипептид, как описано в данном документе, который содержит, но без ограничения ими, последовательности, которые имеют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностями, приведенными в табл. 4. В отдельном варианте осуществления формулы VIII, спейсерная область представляет собой GPEGPS (SEQ ID NO: 1612). В дополнительном варианте осуществления формулы V, спейсерная область представляет собой глицин или последовательность, выбранную из табл. 11 и 12. В дополнительном варианте осуществления композиции CFXTEN, настоящее изобретение обеспечивает гибридный белок рекомбинантного фактора VIII формулы IX

$$(A1_N)\text{-}(S)_a\text{-}(XTEN)_t\text{-}(S)_b\text{-}(A1_C)\text{-}(A2_N)\text{-}(S)_c\text{-}(XTEN)_u\text{-}(S)_d\text{-}(A2_C)\text{-}(B_N)\text{-}(S)_e\text{-}(XTEN)_v\text{-}(S)_f\text{-}(B_C)\text{-}$$
$$(A3_N)\text{-}(S)_g\text{-}(XTEN)_w\text{-}(S)_h\text{-}(A3_C)\text{-}(C1_N)\text{-}(S)_i\text{-}(XTEN)_x\text{-}(S)_j\text{-}(C1_C)\text{-}(C2_N)\text{-}(S)_k\text{-}(XTEN)_y\text{-}(S)_l\text{-}$$
$$(C2_C)\text{-}(S)_m\text{-}(XTEN)_z \quad \text{IX}$$

где $A1_N$ представляет собой фрагмент домена A1 от остатка с номером по меньшей мере 1 (нумерация относительно нативного, зрелого FVIII) до остатка с номером не более чем 371, $A1_c$ представляет собой фрагмент домена A1 от остатка с номером по меньшей мере 2 до остатка с номером не более чем 372; $A2_N$ представляет собой фрагмент домена A2 от остатка с номером по меньшей мере 373 до остатка с номером не более чем 739, $A2_c$ представляет собой фрагмент домена A2 от остатка с номером по меньшей мере 374 до остатка с номером не более чем 740; B_N представляет собой фрагмент домена B от остатка с номером по меньшей мере 741 до остатка с номером не более чем 1647, B_c представляет собой фрагмент домена B от остатка с номером по меньшей мере 742 до остатка с номером не более чем 1648; $A3_N$ представляет собой фрагмент домена A3 от остатка с номером по меньшей мере 1649 до остатка с номером не более чем 2019, $A3_c$ представляет собой фрагмент домена A3 от остатка с номером по меньшей мере 1650 до остатка с номером не более чем 2019; $C1_N$ представляет собой фрагмент домена C1 от остатка с номером по меньшей мере 2020 до остатка с номером не более чем 2171, $C1_c$ представляет собой фрагмент домена C1 от остатка с номером по меньшей мере 2021 до остатка с номером не более чем 2172; $C2_N$ представляет собой фрагмент домена C2 от остатка с номером по меньшей мере 2173 до остатка с номером не более чем 2331, $C2_c$ представляет собой фрагмент домена C2 от остатка с номером по меньшей мере 2174 до остатка с номером не более чем 2332; S представляет собой спейсерную область, которая имеет от 1 до около 50 аминокислотных остатков, которые могут, необязательно, содержать последовательность расщепления или аминокислоты, совместимые с сайтами рестрикции; a представляет собой либо 0, либо 1; b представляет собой либо 0, либо 1; c представляет собой либо 0, либо 1; d представляет собой либо 0, либо 1; e представляет собой либо 0, либо 1; f представляет собой либо 0, либо 1; g представляет собой либо 0, либо 1; h представляет собой либо 0, либо 1; i представляет собой либо 0, либо 1; j представляет собой либо 0, либо 1; k представляет собой либо 0, либо 1; l представляет собой либо 0, либо 1; m представляет собой либо 0, либо 1; t представляет собой либо 0, либо 1; u представляет собой либо 0, либо 1; v представляет собой либо 0, либо 1; w представляет собой 0 или 1, x представляет собой либо 0, либо 1; y представляет собой либо 0, либо 1; z представляет собой либо 0, либо 1 при условии, что t + u + v + w + x + y + z≥1; и XTEN представляет собой расширенный рекомбинантный полипептид, как описано в данном документе, который содержит, но без ограничения ими, последовательности, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности с последовательностями, приведенными в табл. 4. В отдельном варианте осуществления формулы IX, спейсерная область представляет собой GPEGPS (SEQ ID NO: 1612). В дополнительном варианте осуществления формулы IX, спейсерная область представляет собой глицин или последовательность, выбранную из табл. 11 и 12.

Варианты осуществления формул IV-VIII охватывают конформации CFXTEN, при том, что один или несколько XTEN с длинами, которые изменяются в диапазоне от около 6 аминокислоты до >1000 аминокислот (например, последовательности, выбранные из любой из табл. 3, 4 и 13-17, или их фрагменты, или последовательности, которые к тому же демонстрируют по меньшей мере около 90-99%, или более, идентичности последовательности), вводят и связывают между смежными доменами фактора VIII или связывают с N- или C-концом FVIII. В дополнительных вариантах осуществления формул V-VIII настоящее изобретение дополнительно обеспечивает конформации, при том, что XTEN связывают с доменами FVIII посредством спейсерной последовательности, которая может, необязательно, составлять аминокислоты, совместимые с сайтами рестрикции или могут содержать расщепленные последователь-

ности (например, последовательности из табл. 11 и 12, описанные ниже более полно), так, что последовательность, кодирующая XTEN, может быть, в случае сайта рестрикции, интегрированной в конструкцию CFXTEN и, в случае последовательности расщепления, XTEN может быть освобожден от слитого белка под действием протеазы, в случае расщепления последовательности. Варианты осуществления формул VI -VIII отличаются от формулы V, в которой компонент FVIII формул VI-VIII представляют собой только формы фактора VIII без B-доменов ("FVIII BDD"), которые сохраняют короткие остаточные последовательности B-домена, неограничивающие примеры последовательностей которого обеспечивают в табл. 1, при том, что один или несколько XTEN, или фрагменты XTEN с длинами, которые изменяются в диапазоне от около 6 аминокислот до >1000 аминокислот (например, последовательности, выбранные из любой из табл. 3, 4 и 13-17), вводят и связывают между смежными доменами фактора VIII и/или между оставшимися остатками домена B, такими как из табл. 8. Вариант осуществления формулы IX как правило отличается от тех, из других формул, в том, что один или несколько XTEN являются вводимыми в пределы домены FVIII, а не между доменами, и/или имеет XTEN, связанный с C-концом FVIII (или связанный посредством спейсерной области с C-концом FVIII).

В отдельных вариантах осуществления CFXTEN, гибридный белок содержит форму FVIII без B-доменов, при том, что делеция B-домена начинается с первого положения около аминокислотного остатка с номером 745 и заканчивается на втором положении, на аминокислотном остатке с номером от 1635 до около 1690 по отношению к непроцессированной последовательности фактора VIII человека и XTEN связывает первое положение и второе положение делеции B-домена. В отдельном варианте осуществления вышеизложенного, первое положение и второе положение делеции B-домена выбирают из положений из табл. 8. В дополнительном варианте осуществления вышеизложенного по меньшей мере один XTEN связывает первое и второе положение, при том, что по меньшей мере один XTEN связывает в факторе VIII аминокислотный остаток 745 и аминокислотный остаток 1640, или аминокислотный остаток 741 и аминокислотный остаток 1640, или аминокислотный остаток 741 и аминокислотный остаток 1690, или аминокислотный остаток 745 и аминокислотный остаток 1667, или аминокислотный остаток 745 и аминокислотный остаток 1657, или аминокислотный остаток 745 и аминокислотный остаток 1657, или аминокислотный остаток 747 и аминокислотный остаток 1642, или аминокислотный остаток 751 и аминокислотный остаток 1667. В отдельном варианте осуществления CFXTEN, в котором фактор VIII содержит XTEN, связывая первое положение и второе положение делеции B-домена, описанные в вариантах осуществления настоящего изобретения по данному пункту, XTEN представляет собой последовательность, которая имеет по меньшей мере 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности, по сравнению с последовательностью сопоставимой длины, выбранной из любой из табл. 4, табл. 13, табл. 14, табл. 15, табл. 16 и табл. 17, при оптимальном выравнивании, при том, что CFXTEN сохраняет по меньшей мере около 30%, или по меньшей мере около 40%, или по меньшей мере около 50%, или по меньшей мере около 60%, или по меньшей мере около 70%, или по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90% прокоагулянтной активности природного FVIII.

Настоящее изобретение предусматривает все возможные пермутации вставок XTEN между, или в пределах, доменами FVIII или в, или близкий к, точках вставки из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9 или тех, которые проиллюстрированы на фиг. 8-9, с необязательным связыванием дополнительного XTEN с N- или C-концом FVIII, необязательно, связанным посредством дополнительной последовательности расщепления, выбранной из табл. 12, что приводит к композиции CFXTEN; неограничивающие примеры которой проиллюстрированы на фиг. 5 и 12. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN содержит последовательность FVIII BDD из табл. 1, в которой один или несколько XTEN, при том, что каждый имеет по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или более идентичность последовательности, по сравнению с последовательностью из любой из табл. 3, 4 и 13-17, или их фрагменты, вводят между любыми двумя остаточными аминокислотами домена B последовательности BDD FVIII, что приводит к одноцепочечному гибридному белку FVIII, при том, что CFXTEN сохраняет по меньшей мере около 30%, или по меньшей мере около 40%, или по меньшей мере около 50%, или по меньшей мере около 60%, или по меньшей мере около 70%, или по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90% прокоагулянтной активности природного FVIII. В вышеприведенном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN может иметь дополнительную последовательность XTEN из любой из табл. 4 и 13-17, связанную с N- или C-концом гибридного белка. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN содержит по меньшей мере первый XTEN, вводимый в пределах сайта, приведенного в табл. 8, при том, что CFXTEN сохраняет по меньшей мере около 30%, или по меньшей мере около 40%, или по меньшей мере около 50%, или по меньшей мере около 60%, или по меньшей мере около 70%, или по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90% прокоагулянтной активности природного FVIII. В отдельном варианте осуществления гибридного белка формулы VII, CFXTEN содержит последовательность FVIII BDD из табл. 1, в которой два или более XTEN, каж-

дый из которых имеет по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности, по сравнению с последовательностью из любой из табл. 3, 4 и 13-17, или их фрагменты, связывают с последовательностью FVIII-BDD, в которую вводят по меньшей мере один XTEN из от около 3 до около 20 аминокислотных остатков к С-концевой стороне аминокислоты R740 расщепленного сайта FVIII, и из от около 3 до около 20 аминокислотных остатков к N-концевой стороне аминокислоты R1689 расщепленного сайта остаточной аминокислоты домена B FVIII последовательности BDD FVIII, что приводит к одноцепочечному гибридному белку FVIII, и один или два XTEN связывают с помощью последовательности расщепления к N- и/или С-концу последовательности FVIII-BDD, при том, что CFXTEN проявляет по меньшей мере около 40%, или по меньшей мере около 50%, или по меньшей мере около 60%, или по меньшей мере около 70%, или по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90% прокоагулянтной активности природного FVIII после секретирования XTEN с помощью расщепления расщепленных последовательностей.

В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения домен A3 содержит кислую область a3 или ее часть. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один XTEN вводят в пределах кислой области a3 или ее части, N-конца кислой области a3 или ее части, С-конца кислой области a3 или ее части, или их комбинации. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один XTEN вводят в домен C2, N-конец домена C2, С-конец домена C2, или их комбинацию. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения фактор VIII содержит весь, или его часть, домен B. В других вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один XTEN вводят в пределах всего, или его части, домена B, N-конца домена B, С-конца домена B, или их комбинации.

2. Конформации гибридного белка CFXTEN с внутренним XTEN.

В дополнительных аспектах настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, сконфигурированный с одной или несколькими последовательностями XTEN, которые имеют внутреннее расположение относительно последовательности FVIII. В отдельном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, сконфигурированный с одной или несколькими последовательностями XTEN, которые имеют внутреннее расположение относительно последовательности FVIII, чтобы придать такие свойства как, но без ограничения ими, увеличенная стабильность, увеличенная устойчивость к протеазам, увеличенная устойчивость к механизмам выведения, которые содержат, но без ограничения ими, взаимодействие с выведением рецепторов или ингибиторов FVIII, и увеличенную гидрофильность, по сравнению с FVIII без встроенных XTEN.

Настоящее изобретение предполагает, что различные конформации или варианты последовательности FVIII могут использовать в качестве платформы, в которую вставляют один или несколько XTEN. Эти конформации содержат, но без ограничения ими, природный FVIII, FVIII BDD, одноцепочечный FVIII (scFVIII) и варианты их конформаций. В случае scFVIII, настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, который может быть построен с помощью замены одной или нескольких аминокислот сайта процессинга FVIII. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения scFVIII, используемый в CFXTEN, создают с помощью замены R1648 в последовательностях FVIII RHQREITR (SEQ ID NO: 1698) глицином или аланином, для предотвращения протеолитической переработки в гетеродимерную форму. Отдельно предусмотрено, что любые варианты осуществления CFXTEN, раскрытые в данном документе с остатком 1648 FVIII, могут иметь замену глицина или аланина на аргинин в положении 1648. В отдельных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, который содержит scFVIII, при том, что части последовательности, которые окружают сайт процессинга R1648, замещают на XTEN, как проиллюстрировано на фиг. 10A и 10B. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения по меньшей мере около 60%, или около 70%, или около 80%, или около 90%, или около 95%, или около 97% или более B-домена замещают на последовательность XTEN, раскрытую в данном документе, которая содержит один или несколько из сайтов расщепления R740, R1648 или R1689. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN имеет последовательность FVIII B-домена между сайтами расщепления FXIa R740 и R1689 (также сохраняют по меньшей мере 1-5 соседних аминокислот B-домена, между местом разреза и началом XTEN, чтобы позволить протеазе получить доступ к месту разреза) замещают на XTEN. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN имеет последовательность FVIII B-домена между расщепленным сайтом FXIa N745 и P1640, которую замещают на XTEN. В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает варианты последовательностей FVIII BDD CFXTEN, в которых участки B-домена удаляют, но в пределах конструкции оставляют только один из сайтов активации FXI, R740 или R1689 (и 1-5 смежных аминокислот B-домена), при том, что XTEN после расщепления FXIa остается связанным одним концом с либо легкой, либо тяжелой цепи, как проиллюстрировано на фиг. 5B и 5D. В отдельном варианте осуществления вышеизложенного, CFXTEN содержит последовательность BDD FVIII, в которой аминокислоты от N745 до P1640, или от S743 до Q1638, или от P747 до V1642, или между N745 и Q1656, или между N745 и S1657, или между N745 и T1667, или между N745 и Q1686, или

между R747 и V1642, или между T751 и T1667 удаляют, а последовательность XTEN связывают между этими аминокислотами, соединяющими тяжелую и легкую цепи, и могут дополнительно содержать дополнительный XTEN, вводимый либо в пределах наружных петель, между доменами FVIII, либо на N- или C-концах последовательности BDD FVIII, таких как один или несколько инсерционных сайтов из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9, либо тех, что проиллюстрированы на фиг. 8-9. В дополнительном варианте осуществления вышеизложенного, CFXTEN содержит последовательность BDD FVIII, в которой аминокислоты между K713 и Q1686, или между остатками 741 и 1648, удаляют, а XTEN связывают между двумя аминокислотами, и дополнительный XTEN вводят либо в наружные петли, между доменами FVIII, либо на N- или C-концах последовательности BDD FVIII, которая содержит, но без ограничения ими, один или несколько инсерционных сайтов из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9, или тех, которые проиллюстрированы на фиг. 8-9. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения такие последовательности CFXTEN могут иметь один или несколько XTEN, которые демонстрируют по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 96%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% или 100% идентичности последовательности с последовательностью XTEN из любой из табл. 4 и 13-17.

Настоящее изобретение предусматривает другие CFXTEN с внутренним XTEN в различных конформациях; схемы иллюстративных конформаций проиллюстрированы на фиг. 5 и 10. Области, подходящие для инсерционных сайтов XTEN, содержат известные границы домена FVIII, границы экзона, известные наружные (внешние) петли и доступные для растворителя сайты области поверхности, которые определяют с помощью рентгено-структурного анализа, и модели структуры, полученные из симуляций молекулярной динамики FVIII, области с низкой степенью порядка (оценивают с помощью программ, описанных на подписе к фиг. 7), области с низкой гомологией/отсутствием консервативности среди различных видов и гидрофильные области. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения инсерционные сайты XTEN выбирают, основываясь на связывающих сайтах предполагаемого рецептора выведения FVIII. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN содержит XTEN, вводимый в местах не в непосредственной близости к мутациям, вовлеченным в гемофилию A, приведенным в базе данных Haemophilia A Mutation, Search, Test and Resource Site (HAMSTeRS) устраняют (Kemball-Cook G, et al. The factor VIII Structure and Mutation Resource Site: HAMSTeRS version 4. Nucleic Acids Res. (1998) 26(1):216-219). В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения потенциальные сайты вставки XTEN содержат остатки в пределах эпитопов FVIII, которые являются способными связываться анти-FVIII антителами, наблюдаемыми у сенсибилизированных больных гемофилией, и что в противном случае не служат в качестве интерактивных сайтов протеина. Области и/или сайты, которые считаются, в качестве исключения, инсерционными сайтами XTEN, содержат остатки/области фактора VIII, которые являются важными при различных взаимодействиях, содержат другие протеины свертывания, остатки, которые окружают каждый сайт активизации аргинина/инактивации расщепления, действующий в соответствии с тромбином протеазы, фактором Xa, активированным протеином C, остатками, которые окружают сайт процессинга сигнальной последовательности (остаток 1), если конструкция содержит сигнальную последовательность, области известные взаимодействием с другими протеинами, такими как FIXa, FX/FXa, тромбин, активированный протеин C, кофактор протеина S к протеину C, фактор фон Виллебранда, сайты, известные взаимодействием с фосфолипидными кофакторами при свертывании, остатки, которые участвуют во взаимодействиях в домене, остатки, координирующие ионы Ca^{++} или Cu^{++}, остатки цистеина, которые участвуют в S-S внутримолекулярных связяз, зафиксированная аминокислотная вставка и сайты точки мутации в FVIII, полученной у субъектов с гемофилией A, влияющие на прокоагулянтную активность, и сайты мутации в FVIII, сделанные в исследовательской лаборатории, которые влияют на прокоагулянтную активность. Сайты, рассматриваемые в случае либо вставки (для продления время полужизни), либо исключения (необходимого для удаления использованного FVIIIa или FXa) содержат области, известные для взаимодействия с гепаринсульфатпротеогликаном (HSPG) или протеином, связанным с рецептором липопротеинов низкой плотности (LPR).

В результате анализа приведенных выше критериев, как описано в примере 34, по всей последовательности FVIII BDD определяют и/или подтверждают в качестве кандидатов на вставку XTEN различные инсерционные сайты или области сайтов вставки, неограничивающие примеры которых приведены в табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9 и показаны схематически на фиг. 8 и 9. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN содержит вставки XTEN между отдельными доменами FVIII, т.е. между A1 и A2, или между A2 и B, или между B и A3, или между A3 и C1, или между доменами C1 и C2. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN содержит XTEN, вводимый в домен B или между оставшимися остатками последовательности BDD. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN содержит XTEN, вводимый в известных границах экзона гена, кодирующего FVIII, в качестве экзонов представляет элементы эволюционно консервативной последовательности, которая имеет высокую вероятность функционирования в контексте других последовательностей протеина. В дополнительном варианте осуществления настояще-

го изобретения CFXTEN содержит XTEN, вводимый в пределах наружных петель, определенных рентгеновской структурой FVIII. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN содержит XTEN, вводимый в пределах области низкого порядка, определенной как та, которая имеет низкую электронную плотность или с помощью рентгеноструктурного анализа электронная плотность вообще не обнаружена. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN содержит XTEN, вводимый в пределах области низкого порядка, прогнозируют с помощью алгоритмов прогноза структуры, таких как, но без ограничения ими, алгоритмы FoldIndex, RONN, и Kyte & Doolitlle. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN содержит XTEN, вводимые в пределах областей последовательности с высокой частотой гидрофильных аминокислот. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN содержит XTEN, вводимый в пределах эпитопов, способных связываться встречающимися в природе анти-FVIII антителами у сенсибилизированных больных гемофилией. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN содержит XTEN, вводимый в пределах областей последовательности с низкой консервативностью последовательности и/или различиями в длине сегмента последовательности по всей последовательности FVIII различных видов. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN содержит XTEN, связанный с N-концом и/или С-концом. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает конформации CFXTEN с вводимым XTEN, выбранным по двум или более критериям из перечисленных выше вариантов осуществления. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает конформации CFXTEN с по меньшей мере одним, альтернативно, по меньшей мере двумя, альтернативно, по меньшей мере тремя, альтернативно, по меньшей мере четырьмя, альтернативно, по меньшей мере пятью, или более XTEN, вводимыми в последовательность фактора VIII, при том, что точки вставки находятся на, или близко к, N- или С-концевой стороне на по меньшей мере одну, два, три, четыре или пять, или шесть или более аминокислот, выбранных из аминокислот остатка вставки из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9 или тех, которые проиллюстрированы на фиг. 8-9, или, альтернативно, в пределах одной, или в пределах двух, или в пределах трех, или в пределах четырех, или в пределах пяти, или в пределах шести аминокислот из аминокислот остатка вставки из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9, или в пределах различных промежутков аминокислот остатка вставки, схематично изображенной в случае примерной последовательности FVIII BDD на фиг. 9.

Как описано выше, один или несколько расположенных внутри XTEN, или фрагмент XTEN, могут иметь длину последовательности от 6 до 1000 или более аминокислотных остатков. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения, при том, что CFXTEN имеет одну или две или три или четыре или пять или более последовательностей XTEN, внутренних по отношению к FVIII, последовательности XTEN могут быть идентичными или могут быть различными. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения каждый XTEN, расположенный внутри, имеет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или, альтернативно, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности последовательности, по сравнению с аналогичной длиной или фрагментами XTEN или мотивами, выбранными из любой из табл. 3, 4 и 13-17, при оптимальном выравнивании. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, сконфигурированный с одним или несколькими XTEN, вводимыми внутрь по отношению к последовательности BDD FVIII, с по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или, альтернативно, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности последовательности, по сравнению с последовательностью из табл. 1, при том, что вставки располагают на точках вставки или диапазоне точек вставки, указанном в табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9, фиг. 8 или в пределах диапазона вставок, как проиллюстрировано на фиг. 9. Это должно быть понятно специалистам в данной области техники, что XTEN, вводимые в пределах последовательности FVIII в точке вставки из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9, связан с помощью его N- и С-концов с фланкирующими аминокислотами FVIII (или посредством связывания спейсера или расщепленных последовательностей, как описано выше), если XTEN, связанный с N- или С-концом FVIII, может быть связан только с уникальной аминокислотой FVIII (или со связывающим спейсером или аминокислотой расщепленной последовательностью, как описано выше). Только в качестве примера, варианты CFXTEN с тремя внутренними XTEN могут иметь: XTEN (как описано в данном документе), встроенный между остатками 741 и 1640 BDD FVIII, остатками 18 и 19, и остатками 1656 и 1657; или XTEN, встроенный между остатками 741 и 1640 BDD FVIII, остатками 1900 и 1901, и на С-конце на остатке 2332; или XTEN, встроенный между остатками 26 и 27 BDD FVIII, остатками 1656 и 1657, и остатками 1900 и 1901; или XTEN, встроенный между остатками 741 и 1640 BDD FVIII, остатками 1900 и 1901, и на С-конце на остатке 2332.

При оценке гибридных белков CFXTEN с XTEN из табл. 5, вводимым в локализации, было обнаружено, что вставки в определенных областях последовательности FVIII приводят к CFXTEN с хорошей экспрессией и сохранением прокоагулянтной активности. Соответственно, в предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает гибридные белки CFXTEN, сконфигурированные с одним, или двумя, или тремя, или четырьмя, или пятью, или шестью или более XTEN, каждый из которых имеет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или, альтернативно, 81,

82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности последовательности, по сравнению с XTEN, выбранным из любой из табл. 4 и 13-17, вводимым вовнутрь, или связанным с, последовательности FVIII BDD с по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или, альтернативно, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности последовательности, по сравнению с последовательностью из табл. 1, при том, что вставки располагают на точке вставки в пределах одного, или двух, или трех, или четырех, или пяти, или шести или более диапазонов, приведенных в табл. 7. В предыдущих вариантах осуществления настоящего изобретения гибридные белки CFXTEN со вставками XTEN сохраняют по меньшей мере около 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% или более прокоагулянтной активности, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN.

При оценке гибридных белков CFXTEN с XTEN, вводимым в одну или несколько локализаций из табл. 5, было неожиданно обнаружено, что высокий процент гибридных белков со вставками XTEN сохраняет прокоагулянтную активность, как описано в примере 25. Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает гибридные белки CFXTEN, сконфигурированные с одним, двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью или более XTEN, при том, что получаемый гибридный белок проявляет по меньшей мере около 10%, или 20%, или 30%, или 40%, или 50%, или 60%, или 70%, или 80%, или 90% или более прокоагулянтной активности, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN, при условии, что анализируют с помощью анализа коагулирующей активности, описанного в данном документе. В предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает гибридные белки CFXTEN, которые содержат один, или два, или три, или четыре, или пять, или шесть или более XTEN, каждый из которых имеет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или, альтернативно, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности последовательности, по сравнению с XTEN, выбранным из любой из табл. 4 и 13-17, связанным с последовательностью FVIII BDD с по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или, альтернативно, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности последовательности, по сравнению с последовательностью из табл. 1, при том, что вставки располагают на одной или нескольких точках вставки, выбранных из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9, и при том, что получаемый гибридный белок проявляет по меньшей мере около 30%, или по меньшей мере около 40%, или по меньшей мере около 50%, или по меньшей мере около 60%, или по меньшей мере около 70% или более прокоагулянтной активности, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN, если анализируют in vitro с помощью анализа, описанного в данном документе (например, хромогенного анализа). В качестве субъекта CFXTEN гибридные белки, как правило, проявляют увеличенное конечное время полужизни, по сравнению с природным FVIII, специалисту в данной области техники будет понятно, что CFXTEN с более низкой прокоагулянтной активностью по отношению к эквимолярному количеству природного FVIII тем не менее является приемлемым при введении в качестве терапевтической композиции субъекту, нуждающемуся в этом. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения гибридные белки CFXTEN, которые содержат один, или два, или три, или четыре, или пять или более XTEN, каждый из которых имеет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или, альтернативно, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности последовательности, по сравнению с XTEN, выбранным из любой из табл. 4 и 13-17, связанным с последовательностью FVIII BDD с по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или, альтернативно, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичности последовательности, по сравнению с последовательностью из табл. 1, при том, что вставки располагают на одной или нескольких точках вставки или диапазоне точек вставок, выбранном из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9, при том, что получаемый гибридный белок проявляет активность FVIII по меньшей мере около 0,5 МЕ/мл, или по меньшей мере около 0,75 МЕ/мл, или по меньшей мере около 1,0 МЕ/мл, или по меньшей мере около 1,5 МЕ/мл, или по меньшей мере около 2,0 МЕ/мл, или по меньшей мере около 2,5 МЕ/мл, или по меньшей мере около 3 МЕ/мл, или по меньшей мере около 4 МЕ/мл, или по меньшей мере около 5 МЕ/мл, или по меньшей мере около 7 МЕ/мл, или по меньшей мере около 10 МЕ/мл, или по меньшей мере около 20 МЕ/мл, или по меньшей мере около 30 МЕ/мл при экспрессии в клеточной культуральной среде и анализируют с помощью хромогенного анализа, в котором культура и экспрессия являются соответствующими способам, описанными в данном документе; например, способами из примера 25.

Считается, что открытие сайтов вставок, при том, что FVIII сохраняет по меньшей мере часть его прокоагулянтной активности, также может позволить вставку других пептидов и полипептидов с либо неструктурированными или структурированными характеристиками, которые являются связанными с продлением времени полужизни, если слит с протеином FVIII в одном или нескольких тех же сайтах. Неограничивающие примеры, которые содержат альбумин, фрагменты альбумина, фрагменты Fc иммуноглобулинов, β субъединицу С-концевого пептида (CTP) гонадотропина хориона человека, последовательность HAP, трансферрин, полипептиды PAS по заявке на патент США № 20100292130, полиглициновые линкеры, полисериновые линкеры, пептиды и короткие полипептиды из 6-40 аминокислот двух типов аминокислот, выбранных из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и

пролина (P) с разной степенью вторичной структуры от менее 50% до более 50%, среди прочего, были бы подходящими для вставки в определенные активные сайты вставки FVIII.

В вариантах осуществления гибридного белка, описанных в данном документе, гибридный белок CFXTEN может дополнительно содержать одну или несколько последовательностей расщепления из табл. 12, или другие последовательности, известные в данной области техники, последовательность расщепления располагается между, или в пределах, 6 аминокислотными остатками, на пересечении FVIII и последовательностей XTEN, которые могут содержать две расщепленные последовательности в данной внутренней последовательности XTEN. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN, который содержит расщепленные последовательности, имеет две идентичные расщепленные последовательности, каждая из которых расположена на, или около, соответствующих концах одного или нескольких внутренних XTEN, так, что XTEN высвобождают из гибридного белка при расщеплении с помощью протеазы, которая связывается с и расщепляет эту последовательность. Последовательности, которые могут быть расщеплены, описаны ниже более полно, а иллюстративные последовательности приведены в табл. 12.

Таблица 5

Локализации вставки XTEN, связанные с последовательностью BDD FVIII

№	Точка вставки XTEN	Остаток вставки	Последовательность FVIII BDD в прямом направлении	Домен FVIII
1	0	(N-конец)	ATR	A1
2	3	R	RYY	A1
3	17	M	QSD	A1
4	18	Q	SDL	A1
5	22	G	ELP	A1
6	24	L	PVD	A1
7	26	V	DAR	A1
8	28	A	RFP	A1
9	32	P	RVP	A1
10	38	F	PFN	A1
11	40	F	NTS	A1
12	41	N	TSV	A1
13	60	N	IAK	A1
14	61	I	AKP	A1
15	65	R	PPW	A1
16	81	Y	DTV	A1
17	111	G	AEY	A1
18	116	D	QTS	A1
19	119	S	QRE	A1
20	120	Q	REK	A1

21	128	V	FPG	A1
22	129	F	PGG	A1
23	130	P	GGS	A1
24	182	G	SLA	A1
25	185	A	KEK	A1
26	188	K	TQT	A1
27	205	G	KSW	A1
28	210	S	ETK	A1
29	211	E	TKN	A1
30	216	L	MQD	A1
31	220	R	DAA	A1
32	222	A	ASA	A1
33	223	A	SAR	A1
34	224	S	ARA	A1
35	230	K	MHT	A1
36	243	P	GLI	A1
37	244	G	LIG	A1
38	250	R	KSV	A1
39	318	D	GME	A1
40	333	P	QLR	A1
42	334	Q	LRM	A1
43	336	R	MKN	a1
44	339	N	NEE	a1
45	345	D	YDD	a1
46	357	V	VRF	a1
47	367	S	FIQ	a1
48	370	S	RPY	a1
49	375	A	KKH	A2
50	376	K	KHP	A2
51	378	H	PKT	A2

52	399	V	LAP	A2
53	403	D	DRS	A2
54	405	R	SYK	A2
55	409	S	QYL	A2
56	416	P	QRI	A2
57	434	E	TFK	A2
58	438	T	REA	A2
59	441	A	IQH	A2
60	442	I	QHE	A2
61	463	I	IFK	A2
62	487	Y	SRR	A2
63	490	R	LPK	A2
64	492	P	KGV	A2
65	493	K	GVK	A2
66	494	G	VKH	A2
67	500	D	FPI	A2
68	506	G	EIF	A2
69	518	E	DGP	A2
70	556	K	ESV	A2
71	565	Q	IMS	A2
72	566	I	MSD	A2
73	598	P	AGV	A2
74	599	A	GVQ	A2
75	603	L	EDP	A2
76	616	S	ING	A2
77	686	G	LWI	A2
78	713	K	NTG	A2
79	719	Y	EDS	A2
80	730	L	LSK	A2
81	733	K	NNA	A2
82	745	N	PPV	B
83	1640	P	PVL	B
84	1652	R	TTL	B
85	1656	Q	SDQ	A3
86	1685	N	QSP	A3
87	1711	M	SSS	A3
88	1713	S	SPH	A3
89	1720	N	RAQ	A3
90	1724	S	GSV	A3
91	1725	G	SVP	A3
92	1726	S	VPQ	A3
93	1741	G	SFT	A3
94	1744	T	QPL	A3
95	1749	R	GEL	A3
96	1773	V	TFR	A3
97	1792	Y	EED	A3

98	1793	E	EDQ	A3
99	1796	Q	RQG	A3
100	1798	Q	GAE	A3
101	1799	G	AEP	A3
102	1802	P	RKN	A3
103	1803	R	KNF	A3
104	1807	V	KPN	A3
105	1808	K	PNE	A3
106	1827	K	DEF	A3
107	1844	E	KDV	A3
108	1861	N	TLN	A3
109	1863	L	NPA	A3
110	1896	E	RNC	A3
111	1900	R	APC	A3
112	1904	N	IQM	A3
113	1905	I	QME	A3
114	1910	P	TFK	A3
115	1920	A	ING	A3
116	1937	D	QRI	A3
117	1981	G	VFE	A3
118	2019	N	KCQ	A3
119	2020	K	CQT	C1
120	2044	G	QWA	C1
121	2068	F	SWI	C1
122	2073	V	DLL	C1
123	2090	R	QKF	C1
124	2092	K	FSS	C1
125	2093	F	SSL	C1
126	2111	K	WQT	C1
127	2115	Y	RGN	C1
128	2120	T	GTL	C1
129	2125	V	FFG	C1
130	2171	L	NSC	C1
131	2173	S	CSM	C2
132	2188	A	QIT	C2
133	2223	V	NNP	C2
134	2224	N	NPK	C2
135	2227	K	EWL	C2
136	2268	G	HQW	C2
137	2277	N	GKV	C2
138	2278	G	KVK	C2
139	2290	F	TPV	C2
140	2332	Y	С конец FVIII	CT

Обозначает точку вставки XTEN, основываясь на номере аминокислоты зрелого непроцессированного FVIII человека, при том, что вставка может быть либо с N-, либо с С-концевой стороны указанной аминокислоты. Последовательность в прямом направлении в FVIII BDD с делецией 746-1639.

Таблица 6

Иллюстративные локализации вставки XTEN, связанные с полипептидом FVIII

№	Точка вставки XTEN	Остаток вставки	Последовательность FVIII BDD в прямом направлении	Домен FVIII	Расстояние от остатка вставки
9	32	P	RVP	A1	-3, +6
31	220	R	DAA	A1	-
34	224	S	ARA	A1	+5
43	336	R	MKN	a1	-1, +6
44	339	N	NEE	a1	-4, +5
52	399	V	LAP	A2	-6, +3
56	416	P	QRI	A2	+6
75	603	L	EDP	A2	-6, +6
85	1656	Q	SDQ	B	-3, +6
87	1711	M	SSS	A3	-6, +1
91	1725	G	SVP	A3	+6
113	1905	I	QME	A3	+6
114	1910	P	TFK	A3	-5, +6

Расстояние от остатка вставки соответствует относительному числу аминокислот от N-конца (отри-

цательные числа) или С-конца (положительные числа), обозначенного как остаток вставки (остаток "0"), где может быть сделана вставка. Обозначение "-x" соответствует инсерционному сайту, который находится на x аминокислот дальше от N-концевой стороны обозначенного остатка вставки. Аналогичным образом, обозначение "+x" соответствует инсерционному сайту, который находится на x аминокислот дальше от С-концевой стороны обозначенного остатка вставки. Например, "-1, +2" обозначают, что вставку делают на N-конце или С-конце аминокислотных остатков, обозначенных -1,0, +1 или +2.

Таблица 7

Дополнительные иллюстративные локализации вставки XTEN, связанные с полипептидом FVIII

№	Диапазон точки вставки XTEN	Первый остаток вставки	Домен FVIII
3	18-32	Q	A1
8	40	F	A1
18	211-224	E	A1
27	336-403	R	A1, A2
43	599	A	A2
47	745-1640	N	B
50	1656-1728	Q	B, A3
57	1796-1804	R	A3
65	1900-1912	R	A3
81	2171-2332	L	C1, C2

обозначают диапазон нумерации инсерционных сайтов относительно номера аминокислоты зрелого FVIII человека.

Таблица 8

Иллюстративные локализации вставки XTEN в пределах вариантов полипептида FVIII без B-доменов

Диапазон точки вставки XTEN	Первый остаток вставки	Второй остаток вставки
740-1640	R	P
740-1690	R	S
741-1648	S	R
743-1638	S	Q
745-1638	N	Q
745-1640	N	P
745-1656	N	Q
745-1657	N	S
745-1667	N	T
745-1686	N	Q
747-1642	R	V
751-1667	T	T

обозначают аминокислоты, связанные в пределах варианта без B-доменов и соседнего домена A3, с аминокислотами, пронумерованными относительно номера аминокислоты зрелого FVIII человека;

обозначают аминокислоты, связанные XTEN, вводимым BDD-FVIII.

Таблица 9

Иллюстративные локализации вставки XTEN, связанные с полипептидом FVIII, которые приводят к прокоагулянтной активности

№	Точка вставки XTEN	Остаток вставки	Последовательность FVIII BDD в прямом направлении	Домен FVIII
2	3	R	RYY	A1
4	18	Q	SDL	A1
5	22	G	ELP	A1
7	26	V	DAR	A1
9	32	P	RVP	A1
11	40	F	NTS	A1
18	116	D	QTS	A1
19	119	S	QRE	A1
26	188	K	TQT	A1
29	211	E	TKN	A1
30	216	L	MQD	A1
31	220	R	DAA	A1
34	224	S	ARA	A1
35	230	K	MHT	A1
40	333	P	QLR	A1
43	336	R	MKN	a1
44	339	N	NEE	a1
52	399	V	LAP	A2
53	403	D	DRS	A2
55	409	S	QYL	A2
56	416	P	QRI	A2
60	442	I	QHE	A2
62	487	Y	SRR	A2
63	490	R	LPK	A2
66	494	G	VKH	A2
69	518	E	DGP	A2
74	599	A	GVQ	A2
75	603	L	EDP	A2
78	713	K	NTG	A2
82	745	N	PPV	B
85	1656	Q	SDQ	A3
87	1711	M	SSS	A3
89	1720	N	RAQ	A3
91	1725	G	SVP	A3
99	1796	Q	RQG	A3
102	1802	P	RKN	A3
110	1896	E	RNC	A3
111	1900	R	APC	A3
112	1904	N	IQM	A3
113	1905	I	QME	A3
114	1910	P	TFK	A3
121	2068	F	SWI	C1
130	2171	L	NSC	C1
135	2227	K	EWL	C2
137	2277	N	GKV	C2
140	2332	Y	С конец FVIII	C2

последовательность в прямом направлении в FVIII BDD с делецией 746-1639.

В дополнительных аспектах настоящее изобретение обеспечивает библиотеки компонентов и способы создания библиотек, полученных из нуклеиновых кислот, кодирующих сегменты FVIII, XTEN, и сегменты FVIII, связанные с XTEN, которые являются применимыми при получении генов, кодирующих субъект CFXTEN. В качестве первого шага, библиотеку генов, кодирующую FVIII и XTEN, вводимый в различные уникальный сайты в, или в пределах 1-6 аминокислот инсерционного сайта, определенного в табл. 5 или иллюстрированного на фиг. 8-9, создают, экспрессируют, и восстанавливают и оценивают активность CFXTEN и фармакокинетические свойства, как проиллюстрировано на фиг. 15. Те CFXTEN, которые демонстрируют улучшенные свойства, затем используют для создания генов, кодирующих сегмент FVIII и инсерционный сайт, плюс XTEN, с компонентами из каждой улучшенной вставки, представленной в библиотеке, как проиллюстрировано на фиг. 11. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения компоненты библиотека собирают с использованием стандартных рекомбинантных способов, комбинаторным образом, как проиллюстрировано на фиг. 11, что приводит к перестановкам CFXTEN с несколькими внутренними и N- и С-концевыми XTEN, которые могут содержать инсер-

ционные сайты из, или близкие к таковым, табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9, или, как проиллюстрировано на фиг. 8-9. Получаемые конструкции затем оценивают на активность и улучшенные фармакокинетические свойства, а те кандидаты, которые приводят к CFXTEN с улучшенными свойствами, например, сниженным активным клиренсом, устойчивостью к протеазам, сниженной иммуногенностью и повышенными фармакокинетическими свойствами, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, оценивают дополнительно.

3. Петля XTEN, доступная для встраивания.

Как подробно описано в данном документе в другом месте и, как проиллюстрировано на фиг. 33-36, исследователи признают, что каждый домен "A" FVIII содержит по меньшей мере две "петли XTEN, доступные для встраивания", в которые последовательности XTEN вводят без устранения прокоагулянтной активности рекомбинантного протеина или способности рекомбинантных протеинов экспрессироваться in vivo или in vitro в клетке-хозяине. Исследователи определяют петли XTEN, доступные для встраивания, как области с, среди других атрибутов, гладкой поверхностью или воздействием растворителя и высокой конформационной гибкостью. Домен A1 содержит область петли XTEN, доступной для встраивания-1 (A1-1), и область петли XTEN, доступной для встраивания-2 (A1-2), домен A2 содержит область петли XTEN, доступной для встраивания-1 (A2-1), и область петли XTEN, доступной для встраивания-2 (A2-2), домен A3 содержит область петли XTEN, доступной для встраивания-1 (A3-1), и область петли XTEN, доступной для встраивания-2 (A3-2).

В отдельных аспектах рекомбинантный протеин FVIII, как описано выше, содержит по меньшей мере одну последовательность XTEN, вводимую в по меньшей мере одну петлю XTEN, доступную для встраивания, A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 или A3-2, при том, что рекомбинантный протеин FVIII имеет прокоагулянтную активность и может экспрессироваться in vivo или in vitro в клетке-хозяине. В отдельных аспектах рекомбинантный протеин FVIII, как описано выше, содержит по меньшей мере две последовательности XTEN, вводимые в FVIII, например, в две различные петли XTEN, доступные для встраивания, A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 или A3-2, при том, что рекомбинантный протеин FVIII имеет прокоагулянтную активность и может экспрессироваться in vivo или in vitro в клетке-хозяине. Кроме того, рекомбинантный протеин FVIII, как описано выше, может содержать две или более последовательности XTEN, вводимые в уникальную петлю XTEN, доступную для встраивания либо с, либо без последовательностей XTEN, вводимых в другие петли XTEN, доступные для встраивания, при том, что рекомбинантный протеин FVIII имеет прокоагулянтную активность и может экспрессироваться in vivo или in vitro в клетке-хозяине. В отдельных аспектах рекомбинантный протеин FVIII, как описано выше, может содержать по меньшей мере одну последовательность XTEN, вводимую в по меньшей мере одну петлю XTEN, доступную для встраивания, как описано выше, и может дополнительно содержать одну или несколько последовательностей XTEN, вводимых в a3, при том, что рекомбинантный протеин FVIII имеет прокоагулянтную активность и может экспрессироваться in vivo или in vitro в клетке-хозяине. В определенных аспектах рекомбинантный протеин FVIII по настоящему изобретению может содержать три, четыре, пять, шесть или более последовательностей XTEN, вводимых в одну или несколько петель XTEN, доступных для встраивания, или в a3, при том, что рекомбинантный протеин FVIII имеет прокоагулянтную активность и может экспрессироваться in vivo или in vitro в клетке-хозяине.

В отдельных аспектах рекомбинантный протеин FVIII, как описано выше, содержит по меньшей мере одну последовательность XTEN, вводимую в a3, при том, что рекомбинантный протеин FVIII имеет прокоагулянтную активность и может экспрессироваться in vivo или in vitro в клетке-хозяине. В отдельных аспектах рекомбинантный протеин FVIII по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну последовательность XTEN, вводимую в a3, и дополнительно содержит одну или несколько последовательностей XTEN, вводимых в одну или несколько петель XTEN, доступную для встраивания, как описано выше, при том, что рекомбинантный протеин FVIII имеет прокоагулянтную активность и может экспрессироваться in vivo или in vitro в клетке-хозяине.

Исследователи признают, что рекомбинантный протеин FVIII по настоящему изобретению содержит по меньшей мере две петли XTEN, доступные для встраивания, в каждой из области домена A FVIII, который приводит к вставке последовательности XTEN, которая имеет прокоагулянтную активность и все еще остается способной экспрессироваться in vivo или in vitro в клетке-хозяине. Определяют различные кристаллические структуры FVIII, различных степеней разрешения. Эти структуры FVIII и FVIIIa, определенные с помощью рентгеноструктурной кристаллографии и симуляции молекулярной динамики, используют для генерирования модели площади доступной поверхности и конформационной гибкости FVIII. Например, кристаллическая структура FVIII человека определяют с помощью Shen et al. Blood 111: 1240-1247 (2008) и Ngo et al. Structure 16: 597-606 (2008). Данные для этих структур доступны в Protein Data Bank (pdb.org) под регистрационными номерами 2R7E и 3CDZ соответственно.

Кристаллическую структуру прогнозируемой вторичной структуры тяжелых и легких цепей FVIII человека, в соответствии с Shen et al., иллюстрируют на фиг. 37A и 37B. Кристаллическую структуру различных бета-тяжей, прогнозируемых Shen et al., нумеруют последовательно на фиг. 8A и 8B. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения петли XTEN, доступные для встраивания, A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 и A3-2, содержатся в пределах конформационно-лабильных петлеобразных

структур с открытой поверхностью в доменах FVIII. A1-1 расположен между бета-тяжем 1 и бета-тяжем 2, A1-2 расположен между бета-тяжем 11 и бета-тяжем 12, A2-1 расположен между бета-тяжем 22 и бета-тяжем 23, A2-2 расположен между бета-тяжем 32 и бета-тяжем 33, A3-1 расположен между бета-тяжем 38 и бета-тяжем 39, а A3-2 расположен между бета-тяжем 45 и бета-тяжем 46, в соответствии с вторичной структурой зрелого FVIII, которую сохраняют с учетным номером 2R7E в базе данных PDB (PDB:2R7E) и как показано на фиг. 8A и 8B. Вторичная структура учетного номера PDB 2R7E, проиллюстрированная на фиг. 8A и 8B, соответствует назначению стандартизированной вторичной структуры в соответствии с программой DSSP (Kabsch и Sander, Biopolymers, 22:2577-2637 (1983)). Вторичная структура DSSP зрелого FVIII, которую хранят в PDB с учетным номером 2R7E, может быть доступна в базе данных DSSP, доступной на сайте в интернете swift.cmbi.ru.nl/gv/dssp/ (последнее посещение 9 февраля 2012) (Joosten et al., 39 (Suppl. 1): D411-D419 (2010)).

В определенных аспектах конформационно-лабильная петлеобразная структура с открытой поверхностью, которая содержит A1-1, соответствует области природного зрелого FVIII человека от около аминокислоты 15 до около аминокислоты 45 на фиг. 30. В определенных аспектах A1-1 соответствует области природного зрелого FVIII человека от около аминокислоты 18 до около аминокислоты 41 на фиг. 30. В определенных аспектах конформационно-лабильная петлеобразная структура с открытой поверхностью, которая содержит A1-2, соответствует области природного зрелого FVIII человека от около аминокислоты 201 до около аминокислоты 232 на фиг. 30. В определенных аспектах A1-2 соответствует области природного зрелого FVIII человека от около аминокислоты 218 до около аминокислоты 229 на фиг. 30. В определенных аспектах конформационно-лабильная петлеобразная структура с открытой поверхностью, которая содержит A2-1, соответствует области природного зрелого FVIII человека от около аминокислоты 395 до около аминокислоты 421 на фиг. 30. В определенных аспектах A2-1 соответствует области природного зрелого FVIII человека от около аминокислоты 397 до около аминокислоты 418 на фиг. 30. В определенных аспектах конформационно-лабильная петлеобразная структура с открытой поверхностью, которая содержит A2-2, соответствует области природного зрелого FVIII человека от около аминокислоты 577 до около аминокислоты 635 на фиг. 30. В определенных аспектах A2-2 соответствует области природного зрелого FVIII человека от около аминокислоты 595 до около аминокислоты 607 на фиг. 30. В определенных аспектах конформационно-лабильная петлеобразная структура с открытой поверхностью, которая содержит A3-1, соответствует области природного зрелого FVIII человека от около аминокислоты 1705 до около аминокислоты 1732 на фиг. 30. В определенных аспектах A3-1 соответствует области природного зрелого FVIII человека от около аминокислоты 1711 до около аминокислоты 1725 на фиг. 30. В определенных аспектах конформационно-лабильная петлеобразная структура с открытой поверхностью, которая содержит A3-2, соответствует области природного зрелого FVIII человека от около аминокислоты 1884 до около аминокислоты 1917 на фиг. 3. В определенных аспектах A3-2 соответствует области природного зрелого FVIII человека от около аминокислоты 1899 до около аминокислоты 1911 на фиг. 30.

В отдельных аспектах рекомбинантный протеин FVIII по настоящему изобретению содержит одну или несколько последовательностей XTEN, вводимых в одну или несколько петель XTEN, доступных для встраивания, FVIII или в область a3, при том, что рекомбинантный протеин FVIII имеет прокоагулянтную активность и может экспрессироваться in vivo или in vitro в клетке-хозяине. Вводимые последовательности XTEN содержат те, которые повышают in vivo время полужизни или in vivo или in vitro стабильность FVIII.

В определенных аспектах рекомбинантный протеин FVIII по настоящему изобретению содержит последовательности XTEN, вводимые непосредственно в прямом направлении, из одной или нескольких аминокислот, соответствующих одной или нескольким аминокислотам в зрелом природном FVIII человека, который содержит, но без ограничения ими: аминокислоту 18 на фиг. 30, аминокислоту 26 на фиг. 30, аминокислоту 40 на фиг. 30, аминокислоту 220 на фиг. 30, аминокислоту 224 на фиг. 30, аминокислоту 399 на фиг. 30, аминокислоту 403 на фиг. 30, аминокислоту 599 на фиг. 30, аминокислоту 603 на фиг. 30, аминокислоту 1711 на фиг. 30, аминокислоту 1720 на фиг. 30, аминокислоту 1725 на фиг. 30, аминокислоту 1900 на фиг. 30, аминокислоту 1905 на фиг. 30, аминокислоту 1910 на фиг. 30 или любую их комбинацию, которая содержит соответствующие вставки в BDD-варианты FVIII, описанные в данном документе.

В определенных аспектах рекомбинантный протеин FVIII по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну последовательность XTEN, вводимую в область a3 FVIII, либо отдельно, либо в комбинации с одной или несколькими последовательностями XTEN, вводимыми в петли XTEN, доступные для встраивания, доменов A (например, A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 или A3-2 как описано выше), при том, что рекомбинантный протеин FVIII имеет прокоагулянтную активность и может экспрессироваться in vivo или in vitro в клетке-хозяине. В определенных аспектах по меньшей мере одну последовательность XTEN вводят в область a3 непосредственно в прямом направлении от аминокислот, которые соответствуют аминокислоте 1656 на фиг. 30. В определенных аспектах рекомбинантный протеин FVIII по настоящему изобретению содержит последовательность XTEN, вводимую в область a3, как описано, и дополнительно содержат одну или несколько последовательностей XTEN, вводимых непосредственно в

прямом направлении от одной или нескольких аминокислот, соответствующих одной или нескольким аминокислотам зрелого природного FVIII человека, которые содержат, но без ограничения ими: аминокислоту 18 на фиг. 30, аминокислоту 26 на фиг. 30, аминокислоту 40 на фиг. 30, аминокислоту 220 на фиг. 30, аминокислоту 224 на фиг. 30, аминокислоту 399 на фиг. 30, аминокислоту 403 на фиг. 30, аминокислоту 599 на фиг. 30, аминокислоту 603 на фиг. 30, аминокислоту 1711 на фиг. 30, аминокислоту 1720 на фиг. 30, аминокислоту 1725 на фиг. 30, аминокислоту 1900 на фиг. 30, аминокислоту 1905 на фиг. 30, аминокислоту 1910 на фиг. 30 или любую их комбинацию.

Любому специалисту в данной области техники будет понятно, что предыдущие аспекты петли FVIII, доступной для встраивания природного протеина, в которую вводят гетерологический протеин, также являются пригодными в случае вариантов FVIII без B-доменов, описанных в данном документе; например, последовательностей, приведенных в табл. 1. При практическом осуществлении настоящего изобретения следует понимать, что последовательность BDD-FVIII из табл. 1 может быть заменена на рекомбинантный протеин FVIII различных вариантов осуществления настоящего изобретения, описанных выше, и считается, что получаемые конструкции будут аналогичным образом сохранять прокоагулянтную активность.

4. Нарушение, связанное со средствами, связывающими FVIII.

Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение прокоагулирующие композиции гибридного белка CFXTEN для использования в случае пациентов-людей, страдающих от коагулопатии, такой как гемофилия A, которые имеют природные или приобретенные антитела, ингибиторы или другие протеины или молекулы, связывающиеся с FVIII, которые влияют активность или время полужизни гибридного белка CFXTEN, при том, что CFXTEN сохраняют более высокий объем прокоагулянтной активности, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN. Как используется в данном документе, "средство связывания FVIII" означает любую молекулу, способную связываться с природным FVIII или с гибридным белком рекомбинантного фактора VIII по настоящему изобретению, который содержит фактор VIII или его фрагмент, или нативный, полученный в качестве производного, или полученный рекомбинантно. Отдельно предусмотрено, что средство связывания FVIII содержит анти-FVIII антитела и ингибиторы FVIII, среди других протеинов, способных, в частности, связываться с FVIII. В отдельном аспекте, настоящее изобретение обеспечивает прокоагулирующие гибридные белки CFXTEN, которые проявляют сниженное связывание с анти-FVIII антителом или ингибитором FVIII, который препятствует прокоагулянтной активности FVIII. Как используется в данном документе, "анти-FVIII антитело" или "анти-фактор VIII антитело" означает антитело, способное связывать FVIII или компонент FVIII CFXTEN по настоящему изобретению, указанное антитело, которое содержит, но без ограничения ими, антитела из табл. 10 или поликлональное антитело от пациента с гемофилией A с ингибиторами FVIII. Термин антитело содержит моноклональные антитела, поликлональное антитела, фрагменты антител и клоны фрагментов антител. Как используется в данном документе, "ингибитор FVIII" или "анти-FVIII ингибиторное антитело" означает антитело, способное связывать FVIII или компонент FVIII CFXTEN по настоящему изобретению и которое снижает с помощью любых способов прокоагулянтную активность FVIII или компонента FVIII CFXTEN. В дополнительных аспектах настоящее изобретение обеспечивает гибридные белки CFXTEN, которые сохраняют прокоагулянтную активность в присутствии ингибитора FVIII. В дополнительных аспектах настоящее изобретение обеспечивает гибридные белки CFXTEN, которые содержат FVIII, который проявляет увеличенное конечное время полужизни в присутствии средства связывания FVIII, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN.

Большая часть ингибирующих антител к фактору VIII человека действует путем связывания с эпитопами, локализованными в домене A2 или домене C2 фактора VIII, нарушая специфические функции, связанные с этими доменами, (патент США № 6770744; Fulcher et al. Localization of human factor FVIII inhibitor epitopes to two polypeptide fragments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82:7728-7732; Scandella et al. Epitope mapping of human factor VIII inhibitor antibodies by deletion analysis of fVIII fragments expressed in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85:6152-6156). В то время как 68% процентов ингибирующих антител, как сообщается, направлены против домена A2 и/или C2, 3% действуют против домена A1 и 46% против кислой области a3 (Lavigne-Lissalde, G., et al. Characteristics, mechanisms of action, and epitope mapping of anti-factor VIII antibodies. Clin Rev Allergy Immunol (2009) 37:67-79). Например, определенные специфические к тяжелой цепи ингибиторы вступают в реакцию с аминоконцевым сегментом домена A2 с молекулярной массой 18,3 кДа (Scandella D, et al. 1988); Lollar P et al. Inhibition of human factor VIIIa by anti-A2 subunit antibodies. J Clin Invest 1994;93:2497). FVIII содержит связывающий фосфолипид сайт в домене C2 между аминокислотами 2302 и 2332, а также присутствует связывающий фактор фон Виллебранда сайт в домене C2, который оказывает действие в сочетании с аминокислотами 1649-1689 в домене A3. Домен C2 также имеет эпитопы которые, при связывании ингибиторами, блокируют активацию FVIII с помощью тромбина или фактора Xa. Ингибиторы, специфически связывающиеся с легкой цепью, распознают эпитопы в домене A3 или основную антигенную область в домене C2, и могут привести к сниженной прокоагулянтной активности путем предотвращения связывания FVIII к фосфолипиду или снижения скорости диссоциации FVIII и фактора фон Виллебранда (Gilles JG, et al. Anti-factor VIII antibodies of hemophiliac patients are frequently directed towards nonfunctional determinants and do

not exhibit isotypic restriction. Blood (1993) 82:2452; Shima M, et al. A factor VIII neutralizing monoclonal antibody and a human inhibitor alloantibody recognizing epitopes in the C2 domain inhibit factor VIII binding to von Willebrand factor and to phosphatidylserine. Thromb Haemost (1993) 69:240). Неограничивающие примеры моноклональных ингибиторов FVIII приведены в табл. 9. У пациентов с высоким титром ингибиторов, существует повышенный риск развития повторного кровотечения в отдельных суставы, что может, в конечном итоге, привести к уменьшению качества жизни, инвалидности или смерти от чрезмерной потери крови (заявка на патент США № 20120065077; Zhang et al., Clinic. Rev. Allerg. Immunol., 37:114-124 (2009); Gouw и van den Berg, Semin. Thromb. Hemost., 35:723-734 (2009)).

Не желая быть связанными никакой конкретной теорией, считается, что неструктурированная характеристика XTEN, встроенного в гибридные белки CFXTEN, позволяет XTEN принимать конформации, которые приводят к стерическому затруднению ингибиторов, которые при других условиях могли бы связываться с эпитопами FVIII, как проиллюстрировано на фиг. 6, так как встроенный XTEN принимает различные случайные конформации спирали, он пространственно охватывает области компонента FVIII гибридного белка и стерически препятствует способности ингибитора связываться с эпитопом FVIII.

В отдельном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, который демонстрирует прокоагулянтную активность и сниженное связывание в присутствии антитела, связывающегося с доменом C2 фактора VIII, по сравнению с соответствующим фактором VIII, не связанным с XTEN и/или с природным FVIII. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, который демонстрирует прокоагулянтную активность и сниженное связывание в присутствии антитела, связывающегося с доменом A2 фактора VIII, по сравнению с соответствующим фактором VIII, не связанным с XTEN или с природным FVIII. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, который демонстрирует прокоагулянтную активность и сниженное связывание в присутствии антител, связывающихся с доменами A2 и C2 фактора VIII, по сравнению с соответствующим фактором VIII, не связанным с XTEN или с природным FVIII. В отдельном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, который демонстрирует прокоагулянтную активность и сниженное связывание, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN, в присутствии антитела, выбранного из группы, которая состоит из антител из табл. 10. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок CFXTEN проявляет сниженное связывание с антителом GMA8021. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок CFXTEN проявляет сниженное связывание с антителом GMA8008. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок CFXTEN проявляет сниженное связывание с антителом ESH4. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок CFXTEN проявляет сниженное связывание с антителом ESH8. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок CFXTEN проявляет сниженное связывание с антителом B02C11. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок CFXTEN проявляет сниженное связывание и более высокую степень прокоагулянтной активности, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN, в присутствии плазмы субъекта с гемофилией A с ингибиторами поликлонального антитела FVIII, при том, что более высокую степень прокоагулянтной активности определяют с помощью in vitro анализа, такого как Бетезда-анализ или другого анализа, описанного в данном документе.

CFXTEN, который демонстрирует сниженное связывание ингибиторами FVIII может иметь один, или два, или три, или четыре, или пять, или шесть или более отдельных XTEN, варианты осуществления которых раскрыты в данном документе. В предыдущих вариантах осуществления настоящего изобретения по данному пункту CFXTEN проявляет по меньшей мере 5%, или 10%, или 15%, или 20%, или 30%, или 40%, или 50%, или 60%, или 70% или менее связывания с антителом, если оценивают in vitro в анализе, способном анализировать связывание антитела к FVIII, таком как анализы, описанные в данном документе ниже или известные в данной области техники. Кроме того, сниженное связывание CFXTEN субъекта с FVIII-связывающими антителами могут оценивать путем сохранения большей степени прокоагулянтной активности в присутствии антитела, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, как описано в примерах. Таким образом, в вариантах осуществления настоящего изобретения, которые относятся к сниженному связыванию ингибиторами FVIII, описанными в данном документе, CFXTEN при реакции с анти-FVIII антителом демонстрирует по меньшей мере 5%, или 10%, или 15%, или 20%, или 30%, или 40%, или 50%, или 60%, или 70%, или 80%, или 100%, или 200%, или 300%, или 400%, или 500% или более активности в анализе коагулирующей активности (таком, как описан в данном документе ниже), по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN, и при реакции с антителом. В изложенном выше, анти-FVIII антитело может представлять собой антитело из табл. 9 или циркулирующее анти-FVIII антитело от субъекта с гемофилией A. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, в котором присутствует исследованный гибридный белок, при анализе с использованием Бетезда-анализа, и анти-FVIII антитело, выбранное из табл. 10, или препарат поликлонального анти-FVIII антитела, такой как, но без ограничения ими, плазма субъекта с гемофилией A с ингибиторами FVIII, что приводят к титру Бетезда на по меньшей мере около 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 30, 40,

50, 60, 70, 80, 100 или 200 единиц Бетезда меньше, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, и анализируют при аналогичных условиях. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, в котором исследованный гибридный белок приводит к менее 50%, или менее 40%, или менее 30%, или менее 25%, или менее 20%, или менее 15%, или менее 14%, или менее 13%, или менее 12%, или менее 11%, или менее 10% единиц Бетезда, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, если анализируют при аналогичных условиях с использованием Бетезда-анализа и препарата поликлонального анти-FVIII антитела, такого как, но без ограничения ими, плазма субъекта с гемофилией А с ингибиторами FVIII.

Таблица 10

Анти-фактор VIII антитела

Обозначение антитела	**Эпитоп**	**Титр ингибитора БЕ/мг**	**Ссылка**
BO2C11	Домен C2 Met2199/Phe2200	20000	U.S. 6770744 Blood (2007) 110:4234–4242
NMC VIII-5	Домен C2 Glu2181-Val2243		U.S. 6770744
ESH2	Легкая цепь		ADI
ESH4	Легкая цепь 2303-2332	39	U.S. 6770744 Blood (2007) 110:4234–4242
ESH8	Домен C2 2248-2285	10000	U.S. 6770744 Blood (2007) 110:4234–4242
RHD5 (LMBP 6165CB)	Домен C1		WO 2005/016455 заявка на патент США 20090263380
LE2E9	Домен C1		Заявка на патент США 20090263380 Blood (2000) 95:156-163
I54	Домен C2	1300	Blood (2007) 110:4234–4242
F85	Домен C2	6	Blood (2007) 110:4234–4242
F100	Домен C2	5	Blood (2007) 110:4234–4242
F137	Домен C2	6	Blood (2007) 110:4234–4242
I89	Домен C2	1900	Blood (2007) 110:4234–4242
I117	Домен C2	1800	Blood (2007) 110:4234–4242
I109	Домен C2	1500	Blood (2007) 110:4234–4242

	Met2199/Phe2200		
1B5	Домен C2	930	Blood (2007) 110:4234–4242
3C6	Домен C2	71	Blood (2007) 110:4234–4242
3D12	Домен C2 Phe2196	2600	Blood (2007) 110:4234–4242
D102	Домен C2	3800	Blood (2007) 110:4234–4242
3G6	Домен C2	25000	Blood (2007) 110:4234–4242
2–77	Домен C2	25000	Blood (2007) 110:4234–4242
B45	Домен C2	21000	Blood (2007) 110:4234–4242
B9	Домен C2	31000	Blood (2007) 110:4234–4242
B11	Домен C2	3300	Blood (2007) 110:4234–4242
B75	Домен C2	Неизвестен	Blood (2007) 110:4234–4242
D105	Домен C2 Val2223/Lys2227	0,8	Blood (2007) 110:4234–4242
F77	Домен C2	26000	Blood (2007) 110:4234–4242
F178	Домен C2	18000	Blood (2007) 110:4234–4242
F67	Домен C2	21000	Blood (2007) 110:4234–4242
G99	Домен C2 Val2223/Lys2227	15000	Blood (2007) 110:4234–4242
G86	Домен C2	4300	Blood (2007) 110:4234–4242
I14	Домен C2	44000	Blood (2007) 110:4234–4242
I55	Домен C2	10000	Blood (2007) 110:4234–4242
2–117	Домен C2	>0,4	Blood (2007) 110:4234–4242
GMA012	Домен A2 497-510; 584-593		GMA
GMA8001	Домен A3	156	GMA
GMA8002	Домен A1	<1	GMA
GMA8003	Домен C2		GMA
GMA8004	Домен A1		GMA
GMA8005	Домен A1A3/A1		GMA
GMA8006	Домен C2		GMA
GMA8008	Домен C2	1047	GMA
GMA8009	Домен A2	7923	GMA
GMA8010	Домен LC		GMA
GMA8011	Домен C1	97	GMA
GMA8012	Домен A1A3	204	GMA
GMA8013	Домен A3C2	30	GMA
GMA8014	Домен C2	7799	GMA
GMA8015	Домен A2	17079	GMA
GMA8016	Домен A2	<1	GMA
GMA8017	Домен A2	334	GMA
GMA8018	Домен LC	242	GMA
GMA8019	Домен CR-LC		GMA
GMA8020	Домен A1A3	196	GMA
GMA8021	Домен A2	33928	GMA
4A4	Домен A2	40000	J Thromb Haemost (2009) 7:658-664
3E6	Домен C2	41	Blood (2007) 110:4234–4242

Интернет-сайт American Diagnostica Inc., URL, расположенный в интернете, americandiagnostica.com/html/Product_Detail.asp?idCategory=5&idSubCategory=104&idpro= ESH-8 по состоянию на 12 января 2012.

Интернет-сайт Green Mountain Antibodies, URL, расположенный в интернете, green-moab.com/product_details/16316/21582.html по состоянию на 12 января 2012.

Анализы связывания ингибитора и антитела.

Гибридные белки по настоящему изобретению могут быть проанализированы для подтверждения сниженного связывания ингибиторами FVIII с использованием способов, известных в данном уровне техники. Анализы, которые могут использовать, содержат, но без ограничения ими, конкурентные и неконкурентные системы анализа с использованием таких способов, как Вестерн-блоттинги, радиоиммуноанализы, ELISA, "сендвич" иммуноанализы, анализы иммунопреципитации, реакции преципитации, реакции диффузной преципитации в геле, анализы иммунодиффузии, реакции агглютинации, количественные радиоиммуноанализы, флуоресцентные иммуноанализы, анализы коагулирующей активности, анализы ингибитора фактора VIII, для того, чтобы назвать только некоторые. Такие анализы являются обычными и хорошо известны в данной области техники (смотри, например, Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York, который представлен в данном документе в виде ссылки во всей своей полноте). Иллюстративно описаны кратко ниже, но не предназначены для ограничения.

Бетезда-анализ и модификация Nijmegen Бетезда-анализа представляют собой анализы ингибитора

фактора VIII, широко известные в качестве способов определения ингибиторов FVIII (Kasper CK, et al. Proceedings: A more uniform measurement of factor VIII inhibitors. Thromb Diath Haemorrh. (1975) 34(2):612). Несмотря на это, анализы могут быть изменены для того, чтобы проанализировать связывания ингибиторов с композициями FVIII с использованием ингибиторов, таких как поликлональные или моноклональные анти-FVIII антитела, которые содержат антитела из табл. 10, и способы, такие как описаны в примере 52. Если коротко, измененный Бетезда-анализ содержит смешивание стандартизованных объемов образца для испытаний с эквивалентным объемом ингибитора в заданной концентрации. Смеси инкубируют в течение 2 ч при 37°C перед анализом концентрации фактора с помощью анализа коагулирующей активности, такого как хромогенный анализ. Аналогичным образом инкубируют соответствующую плазму с уровнем природного фактора VIII, которую затем анализируют в качестве положительного контроля. Ожидаемый результат представляет собой титр, который приводит к 50% активности FVIII положительного контроля, описываемый как единицы Бетезда. Модификации Nijimegen Бетезда-анализа, образцы для анализа стабилизируют имидазольным буфером и контрольный образец смешивают с дефицитной плазмой вместо буфера (Verbruggen B, et al. The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors: improved specificity and reliability. Thromb Haemost. (1995) 73(2):247-251).

Вестерн-блоттинг, как правило, содержит подготовленные образцы протеина, электрофорез образцов протеина в полиакриламидном геле (например, 8%-20% SDS-PAGE, в зависимости от молекулярной массой антигена), перенос образца протеина из полиакриламидного геля на мембрану, такую как нитроцеллюлоза, PVDF или нейлон, блокирование мембраны в блокирующем растворе (например, PBS с 3% BSA или обезжиренным молоком), промывание мембраны в промывочном буфере (например, PBS-Tween 20), блокирование мембраны с первым антителом (антитело, представляющее интерес), разбавление в блокирующем буфере, промывание мембраны в промывочном буфере, блокирование мембраны вторичным антителом (который распознает первое антитело, например, анти-человеческое антитело), конъюгированным с энзиматическим субстратом (например, пероксидаза из хрена или щелочная фосфатаза) или радиоактивная молекула (например, 32 P или 125 I), разбавленная в блокирующем буфере, промывание мембраны в промывочном буфере и детектирование присутствия антигена. Специалист в данной области техники осведомлен о параметрах, которые могут быть изменены, чтобы увеличить обнаруженный сигнал и уменьшить фоновый шум. Для дальнейшего обсуждения в отношении протоколов вестерн-блоттинга смотри, например, Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 10.8.1.

Анализы ELISA могут обнаружить антитела к FVIII независимо от их способности блокировать прокоагулянтную активность FVIII, и используются для детектирования развития анти-FVIII у пациентов с гемофилией A. В выборке из 131 пациентов с гемофилией A с ингибиторами, способ ELISA приводит к 97,7% чувствительности и 78,8% специфичности и имеет высокую прогностическую ценность отрицательного результата (98,6%) [Martin, P. G., et al. Evaluation of a novel ELISA screening test for detection of factor VIII inhibitory antibodies in haemophiliacs. Clin Lab Haematol (1999) 21:125-128]. Другие исследователи нашли высоко значимую корреляция между титром Бетезда и значениями поглощения в анализе ELISA при детектировании оптической плотности анти-FVIII (Towfighi, F., et al. Comparative measurement of anti-factor VIII antibody by Bethesda assay and ELISA reveals restricted isotype profile and epitope specificity. Acta Haematol (2005) 114:84-90), с дополнительным преимуществом способности обнаружить не-ингибирующие анти-FVIII антитела. Протоколы анализа содержат подготовку связанного лиганда, который может содержать образец, содержащий либо полипептид фактора VIII, либо гибридный белок CFXTEN, наносят в лунку 96-луночного титрационного микропланшета с антителом, добавляют образец лиганда для испытаний и инкубируют, затем добавляют идентифицирующее антитело и инкубируют перед промывание и добавляют вторичное антитело, конъюгированное с щелочной фосфатазой или пероксидазой, и инкубируют в течение дополнительного периода времени перед добавлением субстрата TMB и обрабатывают для чтения с помощью спектрофотометра на 450 нм. В анализах ELISA представляющие интерес антитело или ингибитор не должны быть конъюгированы с обнаруживаемым соединением; вместо этого, в лунку может быть добавлено "второе антитело" (которое распознает представляющие интерес антитело или ингибитор) конъюгированное с обнаруживаемым соединением. Дополнительно, вместо наносения в лунку антитела, в лунку может быть нанесен лиганд. Специалисту в данной области техники будет осведомлен о параметрах, которые могут быть изменены для того, чтобы повысить обнаруживаемый сигнал, а также другие варианты анализов ELISA, известных в данной области техники (Смотри, например, Ausubel et al., eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., New York at 11.2.1).

Стандартные или измененные анализы коагулирующей активности используют для измерения сниженного связывания средств связывания FVIII. В отдельном иллюстративном способе (дополнительно описанный в примере 28) оптимальная концентрация данного ингибитора FVIII для использования в анализе сначала определяют с помощью эксперимента титрования с использованием различных количеств ингибирующего антитела, инкубированного при 37°C в течение 2 ч с основным вектором, экспрессирующим FVIII дикого типа, который содержит двойную метку His/Myc. Активность FVIII измеряют с помощью методики количественного анализа Coatest, описанной в данном документе. В анализе актив-

ности FVIII используют самую низкую концентрацию, которая приводит к оптимальному ингибированию. В анализе антитело ингибитора FVIII при оптимальной концентрации смешивают с отдельными образцами для испытания и инкубируют при 37°C в течение 2 ч. Получаемые образцы для испытания затем собирают и используют в анализе активности Coatest, наряду с необработанными аликвотами CFXTEN и положительным контролем в целях оценки остаточной и базовой активности FVIII для каждого образца для испытаний. Настоящее изобретение обеспечивает способы получения CFXTEN, которые проявляют сниженное связывание со средствами связывания FVIII, которые содержат ингибиторы FVIII, и сохранение прокоагулянтной активности. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения способ создания CFXTEN со сниженным связыванием с ингибиторами FVIII включает этапы выбора последовательности FVIII с по меньшей мере 90% идентичности последовательности с последовательностью из табл. 1, выбирая один, два, три, четыре, пять или шесть или более XTEN, каждый с по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 95-99% идентичности последовательности, по сравнению с последовательностями XTEN сопоставимой длины из табл. 4, создавая экспрессирующие конструкции, разработанные для обнаружения указанного XTEN в, или близко к локализации, выбранной из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9, экспрессируя и извлекая получаемые CFXTEN и анализируя получаемые в анализе гибридные белки, описанные в данном документе для того, чтобы подтвердить сниженное связывание гибридного белка CFXTEN. С помощью патентоспособного способа CFXTEN проявляет сниженное на по меньшей мере 5%, или сниженное на по меньшей мере 10%, или сниженное на по меньшей мере 15%, или сниженное на по меньшей мере 20%, или сниженное на по меньшей мере 25%, или сниженное на по меньшей мере 40%, или сниженное на по меньшей мере 50%, или сниженное на по меньшей мере 60%, или сниженное на по меньшей мере 70%, или сниженное на по меньшей мере 80% связывание со средством связывания FVIII, которое содержит, но без ограничения ими, антитела из табл. 10 или анти-FVIII антитела от субъекта с гемофилией A, и сохраняет по меньшей мере около 10%, или по меньшей мере около 20%, или по меньшей мере около 30%, или по меньшей мере около 40%, или по меньшей мере около 50%, или по меньшей мере около 60%, или по меньшей мере около 70% прокоагулянтной активности, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN.

До 8-10% пациентов с гемофилией A имеют антитела, которые связывают FVIII без влияния на его прокоагулирующие свойства; они не являются, таким образом, классифицированными в качестве ингибиторов FVIII. Несмотря на это, связывание антитела к FVIII, как считается, приводит к иммунным комплексам, которые очищают с помощью врожденного иммунного ответа или являются более восприимчивыми к протеолитической деградации (Kazatchkine MD. Circulating immune complexes containing anti-VIII antibodies in multi-transfused patients with haemophilia A. Clin Exp Immunol. (1980) 39(2):315-320). Соответственно, целью настоящего изобретения является обеспечение гибридных белков CFXTEN, которые содержат один или несколько XTEN, который проявляет сниженное связывание антител с FVIII, которые не являются ингибиторами при том, что деградация или выведение CFXTEN снижены на по меньшей мере 5%, или 10%, или 15%, или 20%, или 30%, или 40%, или 50%, или 60%, или 70% или меньше, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN, или с природным FVIII, связанным подобными антителами. Сниженное связывание антитела к CFXTEN, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, или с природным FVIII, может быть проанализирован с помощью способов in vitro и in vivo. In vitro способы включают вышеупомянутый способы ELISA и Вестерн-блоттинга. Сниженная деградация или выведение CFXTEN могут оценивать in vivo с помощью использования животных моделей или в клинических испытаниях на людях. В отдельном типе испытания фактор VIII или CFXTEN вводят по отдельности, предпочтительно, с помощью внутривенной инфузии, в группах пациентов, имеющих дефицит фактора VIII, который имеет антитела, обеспечивающие деградацию или выведение терапевтического фактора VIII человека. Дозировка вводимого тестируемого изделия находится в диапазоне между 5 и 50 МЕ/кг массы тела, предпочтительно, 10-45 МЕ/кг, и, более предпочтительно, 40 МЕ/кг массы тела. Приблизительно через 1 час после каждого введения, восстановление фактора VIII или CFXTEN из образцов крови измеряют в ходе функционального одноэтапного или хромогенного анализа коагулирующей активности для оценки активности и с помощью ELISA, HPLC или схожего анализа для оценки количество интактного эквивалента фактора VIII. Образцы отбирают снова приблизительно через 5-10 ч после инфузии и измеряют восстановление. Полное восстановление и скорость исчезновения фактора VIII из образцов является прогнозируемым титром антител, а сравнение результатов фактора VIII и CFXTEN обозначает степень сниженного выведения и/или деградации CFXTEN. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок CFXTEN проявляет сниженное на по меньшей мере 5%, или сниженное на по меньшей мере 10%, или сниженное на по меньшей мере 15%, или сниженное на по меньшей мере 20%, или сниженное на по меньшей мере 25%, или сниженное на по меньшей мере 40%, или сниженное на по меньшей мере 50%, или сниженное на по меньшей мере 60%, или сниженное на по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80% сниженное связывание с анти-FVIII антителом, которое способствует выведению, но, с другой стороны, не ингибирует прокоагулянтную активность интактного природного FVIII. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок CFXTEN проявляет сниженное на по меньшей мере 5%, или сниженное на по

меньшей мере 10%, или сниженное на по меньшей мере 15%, или сниженное на по меньшей мере 20%, или сниженное на по меньшей мере 25%, или сниженное на по меньшей мере 40%, или сниженное на по меньшей мере 50%, или сниженное на по меньшей мере 60%, или сниженное на по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80% сниженное связывание с анти-FVIII антителом, которое способствует деградации FVIII. В предыдущих вариантах осуществления настоящего изобретения по данному пункту сниженное связывание анти-FVIII антитела, альтернативно, определяют с помощью увеличенного значения K_D антитела FVIII с гибридным белком, по сравнению с FVIII на по меньшей мере в два раза, или в три раза, или в четыре раза, или в пять раз, или в 10 раз, или 33 раза, или в 100 раз, или в 330 раз, или по меньшей мере в 1000 раз, по сравнению со связыванием с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения гибридные белки CFXTEN, которые содержат один или несколько XTEN, демонстрирующих сниженную реактивность по отношению к анти-FVIII антителу, проявляет увеличенное конечное время полужизни при введении субъекту с анти-FVIII антителами на по меньшей мере 48 ч, или по меньшей мере 72 ч, или по меньшей мере 96 ч, или по меньшей мере 120 ч, или по меньшей мере 144 ч, или по меньшей мере 14 дней, или по меньшей мере 21 день, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN. В вышеприведенном варианте осуществления настоящего изобретения субъект может быть субъектом-человеком с гемофилией А или он может быть субъектом-мышью с гемофилией А с циркулирующими анти-FVIII антителами.

Другой аспект настоящего изобретения представляет собой использование гибридного белка CFXTEN в случае специфической терапии коагулопатии у субъекта с ингибитором FVIII. Настоящее изобретение обеспечивает способ лечения субъекта с циркулирующим FVIII ингибитором(ами), который включает этап введения субъекту эффективного для свертывания количества гибридного белка CFXTEN, при том, что гибридный белок проявляет более высокую прокоагулянтную активность и/или эффективный для свертывания концентрации при более длительной продолжительности, по сравнению с либо соответствующим фактором VIII, не связанным с XTEN, либо, по сравнению с природным фактором VIII, вводят субъекту с использованием аналогичного количества и пути введения. В отдельном варианте осуществления способа ингибитор FVIII у субъекта представляет собой анти-FVIII антитело. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор FVIII представляет собой нейтрализующее анти-FVIII антитело. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор FVIII представляет собой анти-FVIII антитело, которое связано с доменом A1 FVIII. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор FVIII представляет собой анти-FVIII антитело, которое связано с доменом A2 FVIII. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор FVIII представляет собой анти-FVIII антитело, которое связано с доменом A3 FVIII. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор FVIII представляет собой анти-FVIII антитело, которое связано с доменом C1 FVIII. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор FVIII представляет собой анти-FVIII антитело, которое связано с доменом C2 FVIII. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор FVIII представляет собой анти-FVIII антитело, которое связано и с доменом C2, и с доменом A2 FVIII. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор FVIII связано с эпитопом FVIII, способным связываться одним или несколькими антителами из табл. 10. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения ингибитор FVIII представляет собой поликлональное антитело субъекта с гемофилией А с антителами ингибитора FVIII.

Задачей настоящего изобретения является создание CFXTEN с XTEN, вводимыми для того, чтобы максимилизировать стерическое вмешательство средств связывания FVIII, которые в противном случае связываются с FVIII и нейтрализуют прокоагулянтную активность или приводят к выведению или деградации FVIII. Соответственно, в отдельном подходе настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, который содержит один или несколько XTEN, при том, что XTEN вводят близко к связывающему сайту ингибитора FVIII или анти-FVIII антитела. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения XTEN связан с FVIII в локализации, выбранной из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9, которая находится в пределах около 50, или около 100, или около 150, или около 200, или около 250 или около 300 аминокислот эпитопа FVIII, который связан с антителом из табл. 10. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения XTEN связан с FVIII в пределах около 50, или около 100, или около 150, или около 200, или около 250, или около 300 аминокислот эпитопа FVIII в домене A2 или C2, который связан с антителом из табл. 10. Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает гибридные белки CFXTEN, которые содержат один или несколько XTEN, при том, что связывание ингибиторов FVIII с компонентом FVIII гибридного белка снижено, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN, или с природным FVIII и CFXTEN, сохраняющим прокоагулянтную активность. В предыдущих вариантах осуществления настоящего изобретения, описанных выше в этом абзаце, гибридные белки могут быть проанализированы с помощью анализов, описанных в данном документе ниже, анализов примеров, или других анализов, известных в данной области техники, а ингибиторы могут представлять собой антитело из табл. 10, могут быть поликлональными анти-FVIII, или могут представлять собой кровь или плазму субъекта с гемофилией А с ингибиторами FVIII.

В дополнительных аспектах CFXTEN создают для того, чтобы максимилизировать области, по ко-

торым XTEN может принимать случайные спиральные конформации, покрывающие гибридный белок, что, таким образом, приводит к стерическому затруднению в случае анти-FVIII антител, которые в противном случае связывают эпитопы в компонентах FVIII гибридного белка. Считается, что включение нескольких XTEN в CFXTEN обеспечивает больший общий гидродинамический радиус компонента XTEN, по сравнению с CFXTEN, с меньшим XTEN, который, к тому же, имеет приблизительно такое же общее количество аминокислот XTEN. Эмпирически, гидродинамический радиус в случае протеина рассчитывают, основываясь на гель-проникающей хроматографии, а результаты некоторых гибридных белков с использованием подобных способов описаны в примерах. Кроме того, радиус полипептидов XTEN, таких как входящие в варианты осуществления настоящего изобретения, раскрытые в данном документе, может быть аппроксимированы с помощью математических формул, поскольку ограниченные типы используемых аминокислот имеют известные характеристики, которые могут быть определены количественно. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения максимальный радиус отдельного полипептида XTEN рассчитывают (в дальнейшем "радиус XTEN") в соответствии с формулой, приведенной в уравнении II:

$$\text{Радиус XTEN} = (\sqrt{\text{длина XTEN}}\ 0{,}2037) + 3{,}4627 \qquad \text{II}$$

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения сумма максимума радиусов XTEN всех сегментов XTEN в CFXTEN рассчитывают (в дальнейшем "сумма радиусов XTEN") в соответствии с формулой, приведенной в уравнении III:

$$\text{Сумма радиусов XTEN} = \sum_{i=1}^{n} \text{Радиус}_i\ \text{XTEN} \qquad \text{III}$$

где n = количество сегментов XTEN и

i представляет собой итератор.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения отношение суммы радиусов XTEN CFXTEN, который содержит несколько XTEN, в которых радиус XTEN в случае уникальных XTEN имеет эквивалентную длину (в общем количестве аминокислотных остатков, что и в CFXTEN) рассчитывают (в дальнейшем "отношение радиусов XTEN") в соответствии с формулой, приведенной в уравнении IV:

$$\text{Отношение радиусов XTEN} = \frac{\sum_{i=1}^{n} \text{Радиус}_i\ \text{XTEN}}{\left(\sqrt{\sum_{i=1}^{n} \text{Длина}_i\ \text{XTEN}} * 0.2037\right) + 3.4627} \qquad \text{IV}$$

где n = количество сегментов XTEN и

i представляет собой итератор.

При применении уравнений к XTEN, любому специалисту в данной области техники будет понятно, что вычисленные значения представляют собой максимальные значения, которые могут изменяться или уменьшаться в зависимости от клетки-хозяина, используемой для экспрессии полипептида XTEN. Считается, что если экспрессия E. coli может привести к XTEN, который достигает расчетных значений, экспрессия в эукариотических клетках-хозяевах, в которых XTEN может быть гликозилирован, может привести к радиусу полипептида меньше максимальной рассчитанной величины. Такие различия могут быть определены количественно с помощью таких способов, как гель-проникающая хроматография, способы которого детально описаны в примерах.

Для того, чтобы построить CFTEN, который максимизирует площадь, в рамках которой XTEN может принимать случайные спиральные конформации, было обнаружено, что структуры CFXTEN с отношением радиусов XTEN выше 2 обеспечивают больший охват по гибридному белку, чем структуры со значениями <2. Соответственно, в отдельном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, в котором отношение радиусов XTEN составляет по меньшей мере 2,0, или 2,1, или 2,2, или 2,3, или 2,4, или 2,5, или 2,6, или 2,7, или 2,8, или 2,9, или 3,0, или 3,1, или 3,2, или 3,3, или 3,4, или 3,5 или больше. В отдельных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, в котором отношение радиусов XTEN составляет по меньшей мере 2,0-3,5 или выше, содержит по меньшей мере три XTEN, с каждым XTEN, который имеет по меньшей мере от 42 до около 288 аминокислот, при том, что по меньшей мере два XTEN связаны с гибридным белком с расстоянием между двумя XTEN не менее около 100, или около 200, или около 300, или около 400, или около 500 аминокислот. В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, в котором отношение радиусов XTEN составляет по меньшей мере 2,0-3,5 или выше, содержит по меньшей мере четыре XTEN, с каждым XTEN, который имеет по меньшей мере от 42 до около 288 аминокислот, при том, что по меньшей мере три XTEN связаны с гибридным белком с расстоянием между любыми двумя из трех XTEN не менее около 100, или около 200, или около 300, или около 400 аминокислот.

В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, в котором отношение радиусов XTEN составляет по меньшей мере 2,0-3,5 или больше, CFXTEN содержит по меньшей мере три XTEN, с каждым XTEN, который имеет по меньшей мере от 42 до около 288 аминокислот, при том, что по меньшей мере два из трех XTEN, связанных с гибридным белком, разделяют аминокислотной последовательностью из по меньшей мере 100, или около 200, или около 300 до около

400 аминокислот, и третьем XTEN, связанным в домене B (или его фрагменте) или в пределах домена C (или их концами). В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, в котором отношение радиусов XTEN составляет по меньшей мере 2,0-3,5 или больше, CFXTEN содержит по меньшей мере четыре XTEN, с каждый XTEN, который имеет по меньшей мере от 42 до около 288 аминокислот и, при том, что по меньшей мере три из четырех XTEN, связанных с гибридным белком, разделяют аминокислотной последовательностью из по меньшей мере от 300 до около 400 аминокислот, а четвертый XTEN связан в домене B (или его фрагменте) или в пределах домена C (или их концов).

В других вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, в котором отношение радиусов XTEN составляет по меньшей мере 2,0-3,5 или больше, CFXTEN содержит по меньшей мере пять XTEN, с четырьмя XTEN, которые имеют по меньшей мере от 42 до около 144 аминокислот, при том, что по меньшей мере четыре XTEN связаны с гибридным белком с расстоянием между любыми двумя из четырех XTEN не менее около 100, 200, или около 300, или около 400 аминокислот, а пятый XTEN связан в домене B (или его фрагменте) или в пределах домена C (или их концов). В отдельном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, в котором отношение радиусов XTEN составляет по меньшей мере 2,0-3,5 или больше, CFXTEN содержит по меньшей мере пять XTEN с четырьмя XTEN, которые имеют по меньшей мере от 42 до около 144 аминокислот, при том, что по меньшей мере три XTEN, связанные с гибридным белком, разделены аминокислотной последовательностью из по меньшей мере от 300 до около 400 аминокислот, четвертый XTEN связан в домене B (или его фрагменте), а пятый XTEN связан в пределах домена C (или их концов).

В отдельном аспекте, настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, в котором отношение радиусов XTEN составляет по меньшей мере 2,0, или 2,1, или 2,2, или 2,3, или 2,4, или 2,5, или 2,6, или 2,7, или 2,8, или 2,9, или 3,0, или 3,1, или 3,2, или 3,3, или 3,4, или 3,5 или больше, а композиция не содержит определенных последовательностей. В отдельном варианте осуществления вышеизложенного, настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, в котором отношение радиусов XTEN составляет по меньшей мере 2,0-3,5 или больше, при условии, что гибридный белок не содержит последовательность из любой из табл. 50 или табл. 51. В дополнительном варианте осуществления вышеизложенного настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, в котором отношение радиусов XTEN составляет по меньшей мере 2,0-3,5 или больше при условии, что гибридный белок не содержит последовательность, которая имеет семейство AG последовательностей XTEN. В дополнительном варианте осуществления вышеизложенного, настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, в котором отношение радиусов XTEN составляет по меньшей мере 2,0-3,5 или больше при условии, что гибридный белок не содержит последовательность, выбранную из GTPGSGTASSSP (SEQ ID NO: 31), GSSTPSGATGSP (SEQ ID NO: 32), GSSPSASTGTGP (SEQ ID NO: 33), GASPGTSSTGSP (SEQ ID NO: 34). В дополнительном варианте осуществления вышеизложенного, настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, в котором отношение радиусов XTEN составляет по меньшей мере 2,0-3,5 или больше при условии, что гибридный белок не содержит любую из последовательностей, выбранных из GTPGSGTASSSP (SEQ ID NO: 31), GSSTPSGATGSP (SEQ ID NO: 32), GSSPSASTGTGP (SEQ ID NO: 33), GASPGTSSTGSP (SEQ ID NO: 34) и

GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGS

EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP

ATSGSETPGTSTEPSEGSAP (SEQ ID NO: 59).

В дополнительном варианте осуществления вышеизложенного, настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, в котором отношение радиусов XTEN составляет по меньшей мере 2,0-3,5 или больше при условии, что гибридный белок не содержит последовательность, выбранную из

GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGS

EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP

ATSGSETPGTSTEPSEGSAP (SEQ ID NO: 59),

PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG

ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGAS

PGTSSTGSPGTPGSGTASSS (SEQ ID NO: 71), или

PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG

SSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSS

PSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS

ASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS

STGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS (SEQ ID NO: 80).

В дополнительном варианте осуществления вышеизложенного, настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, в котором отношение радиусов XTEN составляет по меньшей мере 2,0-3,5 или больше при условии, что гибридный белок не содержит последовательность XTEN, состоящей из

GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGS
EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP
ATSGSETPGTSTEPSEGSAP (SEQ ID NO: 59),
PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG
ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGAS
PGTSSTGSPGTPGSGTASSS (SEQ ID NO: 71), или
PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG
SSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSS
PSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS
ASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS
STGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS (SEQ ID NO: 80).

В отдельном аспекте, настоящее изобретение обеспечивает способы создания CFXTEN с XTEN, вводимым для того, чтобы максимилизировать стерическое нарушение средства связывания FVIII, которые в противном случае могут связываться с FVIII и нейтрализуют прокоагулянтную активность или приводят к выведению или деградации FVIII. Соответственно, в отдельном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ, который включает этапы выбора последовательности FVIII с по меньшей мере 90% идентичности последовательности с последовательностью из табл. 1, выбирают три или более XTEN из табл. 4, в которых отношение радиусов XTEN составляет по меньшей мере 2,0, или 2,1, или 2,2, или 2,3, или 2,4, или 2,5, или 2,6, или 2,7, или 2,8, или 2,9, или 3,0, или 3,1, или 3,2, или 3,3, или 3,4, или 3,5 или больше, создают экспрессирующие конструкции, разработанные для обнаружения указанного XTEN в, или близкий к, локализации, выбранной из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9, при том, что три или более XTEN имеют по меньшей мере от 300 до 400 аминокислот, экспрессируют и извлекают получаемые CFXTEN, и анализируют получаемые гибридные белки в анализе, описанном в данном документе для того, чтобы подтвердить сниженное связывание гибридного белка CFXTEN. С помощью патентоспособного способа CFXTEN проявляет сниженное на по меньшей мере 5%, или сниженное на по меньшей мере 10%, или сниженное на по меньшей мере 15%, или сниженное на по меньшей мере 20%, или сниженное на по меньшей мере 25%, или сниженное на по меньшей мере 40%, или сниженное на по меньшей мере 50%, или сниженное на по меньшей мере 60%, или сниженное на по меньшей мере 70%, или сниженное на по меньшей мере 80% связывание со средством связывания FVIII, которое содержит, но без ограничения ими, антитела из табл. 10 и проявляет прокоагулянтную активность.

5. Конформации гибридного белка CFXTEN со спейсером и расщепленными последовательностями.

В дополнительных аспектах настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, сконфигурированный с одной или несколькими спейсерными последовательностями, встроенными в, или соседние к, XTEN, который является разработанным для встраивания или повышения композициям функциональности или свойства, или в качестве вспомогательного средства при сборке или производстве композиций гибридного белка. Подобные свойства содержат, но без ограничения ими, включение последовательности(ей) расщепления для того, чтобы позволить секретирование компонентов, включение аминокислот, совместимых с нуклеотидом сайтов рестрикции для того, чтобы позволить связывание XTEN-кодирующих нуклеиновых кислот к FVIII-кодирующим нуклеиновым кислотам или чтобы облегчить построение экспрессирующих векторов и линкеров, созданных для снижения стерического затруднения в областях гибридного белка CFXTEN.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения спейсерная область может быть введена между последовательностью XTEN и компонентом FVIII для уменьшения стерическое затруднение так, что компонент FVIII может принимать его необходимую третичную структуру и/или взаимодействовать, соответственно, с его целевым субстратом или энзимом обработки. Для спейсеров и способов определения желательных спейсеров, смотри, например, George, et al. (2003) Protein Engineering 15:871-879, в частности, встроенный в данный документ в виде ссылок. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения спейсер содержит одну или несколько пептидных последовательностей, которые составляют от 1 до 50 аминокислотных остатков в длину, или от около 1 до 25 остатков, или от около 1 до 10 остатков в длину. Спейсерные последовательности, за исключением сайтов расщепления, могут содержать любую из 20 природных L аминокислот, и предпочтительно имеют XTEN-подобное свойства в том, что большая часть остатков будет гидрофильными аминокислотами, которые являются стерически незатрудненными, такими как, но без ограничения ими, глицин (G), аланин (A), серин (S), треонин (T), глутамат (E), пролин (P) и аспартат (D). Спейсер может быть уникальным остатком глицина, полиглицинов или полиаланинов, или преимущественно представляет собой смесь комбинаций глицина, серина и остатков аланина. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения спейсерная область, за исключением аминокислот расщепленного сайта, имеет от около 1 до 10 аминокислот, которые состоят

из аминокислот, выбранных из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), и, по существу, лишены вторичной структуры; например, менее около 10%, или менее около 5%, что определяют с помощью алгоритма Chou-Fasman и/или GOR. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения спейсерная область представляет собой GPEGPS (SEQ ID NO: 1612). В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения спейсерная область представляет собой GPEGPS (SEQ ID NO: 1612), связанный с последовательностью расщепления из табл. 12. Кроме того, спейсерные последовательности создают для того, чтобы избежать введения Т-клеточных эпитопов, которое могут достигать, в частности, с помощью предотвращения или ограничения количества гидрофобных аминокислот используемых в спейсере; определение эпитопов описано выше и в примерах.

В конкретном варианте осуществления гибридный белок CFXTEN содержит одну или несколько спейсерных последовательностей, связанных в области(ях) соединения между последовательностью FVIII с полезной нагрузкой и одним или несколькими XTEN, встроенными в гибридный белок, при том, что спейсерные последовательности составляют аминокислоты, которые являются совместимыми с нуклеиновыми кислотами, кодирующими сайты рестрикции. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок CFXTEN содержит одну или несколько спейсерных последовательностей, связанные в области(ях) соединения между последовательностью FVIII с полезной нагрузкой и еще один XTEN, встроенный в гибридный белок, при том, что спейсерные последовательности содержат аминокислоты, которые являются совместимыми с нуклеиновыми кислотами, кодирующими сайты рестрикции и аминокислоты, и еще одни аминокислоты спейсерной области выбирают из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P). В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок CFXTEN содержит одну или несколько спейсерных последовательностей, связанные в области(ях) соединения между последовательностью FVIII с полезной нагрузкой и еще одним XTEN, встроенным в гибридный белок, при том, что спейсерные последовательности содержат аминокислоты, которые являются совместимыми с нуклеиновыми кислотами, кодирующими сайты рестрикции, а еще одну спейсерную последовательность выбирают из последовательностей из табл. 11. Точную последовательность каждой спейсерной области выбирают так, чтобы была совместимой с сайтами клонирования в экспрессирующих векторах, которые используют для исключительной конструкции CFXTEN. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения спейсерная область имеет свойства, совместимые с XTEN. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения спейсерная область представляет собой GAGSPGAETA (SEQ ID NO: 178). В случае последовательностей XTEN, которые включены во внутрь по отношению к последовательности FVIII, каждый XTEN, как правило, будет в окружении двух спейсерных последовательностей, которые содержат аминокислоты, совместимые с сайтами рестрикции, в то время как XTEN, связанный с N- или C-концом, мог бы только требовать уникальной спейсерной области в области соединения двух, а другой на противоположном конце для включения в векторе. Как должно быть очевидно любому специалисту в данной области техники, спейсерные последовательности, которые содержат аминокислоты, совместимые с сайтами рестрикции, которые являются внутренними по отношению к FVIII, могут быть исключены из конструкции, если полный ген CFXTEN получают синтетически.

Таблица 11

Спейсерные последовательности, совместимые с сайтами рестрикции

Спейсерная область	Рестрикционный фермент
GSPG (SEQ ID NO: 174)	BsaI
ETET (SEQ ID NO: 175)	BsaI
PGSSS (SEQ ID NO: 176)	BbsI
GAP	AscI
GPA	FseI
GPSGP (SEQ ID NO: 177)	SfiI
AAA	SacII
TG	AgeI
GT	KpnI
GAGSPGAETA (SEQ ID NO: 178)	SfiI
ASS	XhoI

В дополнительных аспектах настоящее изобретение обеспечивает конформации CFXTEN с расщепленными последовательностями, встроенными в спейсерные последовательности. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения спейсерные последовательности в композиции гибридного белка CFXTEN содержат одну или несколько расщепленных последовательностей, которые являются идентичными или различными, при том, что последовательность расщепления может действовать в соответствии с протеазой, как показано в фиг. 12, для того, чтобы секретировать FVIII, компонент FVIII (например, домен B) или последовательность(и) XTEN из гибридного белка. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения включение последовательности расщепления в CFXTEN получают

для того, чтобы позволить секретироваться компоненту FVIII, который становится активным или более активным (по отношению к своей способности служить в качестве мембранного участка связывания для факторов IXa и X) после его секретирования из XTEN. В вышеприведенном варианте осуществления настоящего изобретения прокоагулянтная активность компонента FVIII CFXTEN увеличивается после расщепления на по меньшей мере 30%, или по меньшей мере 40%, или по меньшей мере 50%, или по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 90%, по сравнению с интактным CFXTEN. Расщепленные последовательности расположены достаточно близко по отношению к последовательностям FVIII, как правило, в пределах 18, или в пределах 12, или в пределах 6, или в пределах 2 аминокислотных последовательностей FVIII, так, что любые оставшиеся остатки, связанные с FVIII, после расщепления заметно не влияют на активность (например, такую, как связывание с протеином свертывания крови) FVIII, еще обеспечивают достаточный доступ к протеазе, чтобы иметь возможность осуществить расщепление последовательности расщепления. В отдельных случаях, CFXTEN, который содержит расщепленные последовательности, также будет иметь одну или несколько аминокислот спейсерной области между FVIII и последовательностью расщепления или XTEN и последовательностью расщепления для облегчения доступа протеазы; аминокислоты спейсера содержат любую природную аминокислоту, которая содержит глицин, серин и аланин в качестве предпочтительных аминокислот. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения расщепленный сайт представляет собой последовательность, которая может быть расщеплена с помощью протеазы, эндогенной для субъекта-млекопитающего, так что CFXTEN может быть расщеплен после введения субъекту. В подобном случае, CFXTEN может служить в качестве пролекарства или циркулирующего депо FVIII. В конкретной конструкции вышеуказанного, CFXTEN мог бы иметь один или два XTEN, связанных с N- и/или C-концом FVIII-BDD посредством последовательности расщепления, которые могут действовать с помощью активированного фактора свертывания, и будут иметь дополнительный XTEN, расположенный между обработанными аминокислотами в положениях R740 и R1689, так, что XTEN может быть высвобожденным, покидая форму FVIII, схожую с природным активированным FVIII. В отдельном варианте осуществления вышеизложенной конструкции, FVIII, который представляет собой высвобожденный из гибридного белка с помощью расщепления последовательности расщепления, проявляет повышение активности по меньшей мере в около два раза, или по меньшей мере в около три раза, или по меньшей мере в около четыре раза, или по меньшей мере в около пять раз, или по меньшей мере в около шесть раз, или по меньшей мере в около восемь раз, или по меньшей мере в около десять раз, или по меньшей мере в около 20 раз, по сравнению с интактным гибридным белком CFXTEN.

Примеры сайтов расщепления, рассматриваемых в настоящем изобретении, содержат, но без ограничения ими, полипептидную последовательность расщепляемую с помощью эндогенной протеазы млекопитающих, выбранной из FXIa, FXIIa, калликреина, FVIIIa, FVIIIa, FXa, FIIa (тромбина), эластазы-2, гранзима B, MMP-12, MMP-13, MMP-17 или MMP-20 или с помощью протеаз немлекопитающего, таких как TEV, энтерокиназа, протеаза PreScission™ (протеаза риновируса 3C) и сортаза A. Последовательности, как известно, расщепляются ранее описанными протеазами и другими, известными в данной области техники. Иллюстративные расщепленные последовательности, рассматриваемые в настоящем изобретении, и соответствующие вырезанные сайты в пределах последовательностей, представлены в табл. 12, также как и варианты их последовательностей. В случае CFXTEN, который содержит встроенную последовательность(и) расщепления, как правило, является предпочтительным то, что одна или несколько расщепленных последовательностей представляют собой субстраты активированных протеинов свертывания. Например, тромбин (активированный фактор свертывания II) оказывает действие на последовательность LTPRSLLV (SEQ ID NO: 1618) [Rawlings N.D., et al. (2008) Nucleic Acids Res., 36: D320], которую обрезают в последовательности после аргинина в положении 4. Активный FIIa получают с помощью расщепления FII с помощью FXa в присутствии фосфолипидов и кальция и далее в процессе пути свертывания от фактора VIII. После активации, ее природная роль в свертывании заключается в расщеплении фибриногена, который, затем, в свою очередь, начинает образование тромба. Активность FIIa жестко контролируется и происходит только если коагуляция является необходимой для правильного гемостаза. С помощью включения последовательности LTPRSLLV (SEQ ID NO: 1618) в CFXTEN между, и связывая, компоненты FVIII и XTEN, XTEN удаляют из смежного FVIII одновременно с активацией либо внешнего, либо внутреннего путей свертывания, если свертывание является необходимым физиологически, тем самым избирательно высвобождая FVIII. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN со встроенными расщепленными последовательности FXIa между компонентом(ами) FVIII и XTEN, которые действуют только с момента инициации внутренней системы свертывания, при том, что прокоагулирующую форму FVIII высвобождают из XTEN с помощью FXIa для участия в каскаде свертывания. Не желая быть связанными никакой конкретной теорией, считается, что CFXTEN вышеуказанного варианта осуществления может изолировать FVIII от других факторов свертывания, за исключением тех, что в пределах сайта активного свертывания, таким образом, позволяя большие дозы (и, таким образом, более продолжительные интервалы дозирования) с минимальными проблемами безопасности.

Таким образом, расщепленные последовательности, прежде всего восприимчивые к активирован-

ным прокоагулянтом протеинам свертывания, приведенные в табл. 12, предназначены для пролонгированного высвобождения FVIII, который, в отдельных вариантах осуществления CFXTEN, может обеспечить более высокую степень активности компонента FVIII, высвобожденного из интактной формы CFXTEN, а также дополнительный запас безопасности в случае высоких доз CFXTEN, вводимых субъекту. В отдельном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, который содержит одну или несколько расщепленных последовательностей, функционально расположенных для того, чтобы секретировать при расщеплении FVIII из гибридного белка, при том, что одна или несколько расщепленных последовательностей имеют по меньшей мере около 86%, или по меньшей мере около 92%, или 100% идентичности последовательности с последовательностью, выбранной из табл. 12. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения только две или три аминокислоты, располагающиеся по обе стороны от места разреза (в общем от четырех до шести аминокислот), включены в последовательность расщепления, которую, в свою очередь, встраивают в CFXTEN вариантов осуществления настоящего изобретения обеспечивая, например, сайты секретирования XTEN. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения встроенная последовательность расщепления из табл. 12 может иметь одну или несколько делеций или вставок, или одну, или две, или три аминокислотные замены в случае любой одной, или двух, или трех аминокислот в известной последовательности, при том, что делеции, вставки или замены приводят к сниженной или улучшенной чувствительности, но не без отсутствия чувствительности к протеазе, что приводит к способности адаптировать скорость секретирования FVIII из XTEN. Иллюстративные замены в пределах расщепленных последовательностей, которые используют в CFXTEN по настоящему изобретению, показаны в табл. 12.

Таблица 12

Последовательности, расщепленные протеазой

Протеазы, действующие на	Иллюстративная последовательность	SEQ ID	Минимальный вырезаный сайт	SEQ ID
последовательности	расщепления	NO:		NO:
FXIa	KLTR↓AET	179	KD/FL/T/R↓VA/VE/GT/GV	
FXIa	DFTR↓VVG	180	KD/FL/T/R↓VA/VE/GT/GV	
FXIIa	TMTR↓IVGG	181	НД	
Калликреин	SPFR↓STGG	182	-/-/FL/RY↓SR/RT/-/-	
FVIIa	LQVR↓IVGG	183	НД	
FIXa	PLGR↓IVGG	184	-/-/G/R↓-/-/-/-	
FXa	IEGR↓TVGG	185	IA/E/GFP/R↓STI/VFS/-/G	
FIIa (тромбин)	LTPR↓SLLV	186	-/-/PLA/R↓SAG/-/-/-	
Эластаза-2	LGPV↓SGVP	187	-/-/-/VIAT↓-/-/-/-	
Гранзим-B	VAGD↓SLEE	188	V/-/-/D↓-/-/-/-	
MMP-12	GPAG↓LGGA	189	G/PA/-/G↓L/-/G/-	190
MMP-13	GPAG↓LRGA	191	G/P/-/G↓L/-/GA/-	192
MMP-17	APLG↓LRLR	193	-/PS/-/-↓LQ/-/LT/-	
MMP-20	PALP↓LVAQ	194	НД	
TEV	ENLYFQ↓G	195	ENLYFQ↓G/S	196
Энтерокиназа	DDDK↓IVGG	197	DDDK↓IVGG	198
Протеаза 3C (PreScission™)	LEVLFQ↓GP	199	LEVLFQ↓GP	200
Сортаза A	LPKT↓GSES	201	L/P/KEAD/T↓G/-/EKS/S	202

↓обозначает сайт расщепления.

НД: нет данных.

перечень нескольких аминокислоты до, между или после косой черты указывают на альтернативные аминокислоты, которые могут быть замещены в положении;

"-" обозначают, что любая аминокислота может быть заменена соответствующей аминокислотой, указанной в средней колонке.

6. Иллюстративные последовательности гибридного белка CFXTEN.

Неограничивающие примеры последовательностей гибридных белков, которые содержат уникальный FVIII, связанный с одним или несколькими XTEN, представлены в табл. 21. Иллюстративные аминокислотные последовательности из табл. 21 (и последовательности DNA, которые кодируют их) содержит его метки с целью очистки, которые, что должно быть очевидно специалистам в данной области техники, могут быть удалены из последовательности, которая имеет влияние на прокоагулянтную активность гибридного белка CFXTEN. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN из табл. 21 дополнительно содержит аминокислоты на N-конце соответствующего им природного FVIII человека (а именно, последовательность MQIELSTCFFLCLLRFCFS (SEQ ID NO: 1611)), чтобы

помочь в экспрессии и секретировании гибридного белка CFXTEN. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения композиция CFXTEN содержит гибридный белок, который имеет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, по сравнению с CFXTEN из табл. 21, альтернативно, по меньшей мере около 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или около 100% идентичности последовательности, по сравнению с CFXTEN из табл. 21, при оптимальном выравнивании. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения композиция CFXTEN содержит гибридный белок из табл. 21, в котором удалена С-концевая последовательность his-his-his-his-his-his (SEQ ID NO: 1700). Несмотря на это, настоящее изобретение также предусматривает замену любой последовательности FVIII из табл. 1 на компонент FVIII CFXTEN из табл. 21, и/или замену любой последовательности любой из табл. 3, 4 и 13-17 на компонент XTEN CFXTEN из табл. 21. Как правило, получаемый CFXTEN вышеуказанных примеров сохраняет по меньшей мере часть прокоагулянтной активности соответствующего FVIII, не связанного с XTEN. В изложенных выше гибридных белках, описанных выше в этом абзаце, гибридный белок CFXTEN может дополнительно составлять одну или несколько расщепленных последовательностей; например, последовательность из табл. 12, последовательность расщепления располагается между FVIII и последовательностями XTEN, или между соседними доменами FVIII, связанными XTEN. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения который содержит последовательность(и) расщепления, интактная композиция CFXTEN имеет меньшую активность, но более продолжительное время полужизни в ее интактной форме, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN, но выполнен таким образом, что при введении в организм субъекта, компонент FVIII постепенно высвобождается из слитого белка путем расщепления в последовательности(ях) расщепления с помощью эндогенных протеаз, после чего компонент FVIII проявляет прокоагулянтную активность.

Композиции CFXTEN вариантов осуществления настоящего изобретения могут оценивать на активность с использованием анализов или in vivo параметров, как описано в данном документе (например, in vitro анализы коагулирующей активности, анализы из табл. 49 или фармакодинамическое влияние на преклиническую модель гемофилии в клинических испытаниях на людях с использованием таких способов, как описано в примерах или других способов, известных в данной области техники для оценки активности FVIII), чтобы определить пригодность конфигурации или варианта последовательности фактора FVIII, и тех композиций CFXTEN (которые содержатся после расщепления любых встроенных XTEN-высвобождающих сайтов расщепления), которые сохраняют по меньшей мере около 30%, или около 40%, или около 50%, или около 55%, или около 60%, или около 70%, или около 80%, или около 90%, или около 95% или более активности, по сравнению с природной последовательностью FVIII, считаются подходящими для использования при лечении FVIII, связанных с условиями.

Свойства композиций CFXTEN по настоящему изобретению

(a) Фармакокинетические свойства CFXTEN.

Еще одной целью настоящего изобретения является обеспечение гибридных белков CFXTEN и фармацевтических композиций, которые содержат CFXTEN с улучшенными фармакокинетическими свойствами, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN. Фармакокинетические свойства FVIII, улучшенные с помощью связывания данного XTEN с FVIII, содержат, но без ограничения ими, конечное время полужизни, площадь под кривой (AUC), C_{max}, объем распределения, поддержание биологически активного CFXTEN выше минимальной эффективной концентрации в единице объема крови в течение более продолжительного периода времени, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN. Улучшенные свойства позволяют менее частое дозирование и/или более продолжительный прокоагулирующий эффект, по сравнению с аналогичной дозой FVIII, не связанного с XTEN. Повышение одного или нескольких из этих свойств может привести к преимуществам при лечении заболеваний, связанных с фактором VIII.

Экзогенно вводимый фактор VIII, как сообщается, имеет конечное время полужизни у людей приблизительно 12-14 ч, если образует комплекс с нормальным протеином фактора фон Виллебранда, в то время как при отсутствии фактора фон Виллебранда, время полужизни фактора VIII снижено до 2 ч (Tuddenham EG, et al., Br J Haematol. (1982) 52(2):259-267; Bjorkman, S., et al. Clin Pharmacokinet. (2001) 40:815). В результате улучшенных свойств, обеспеченных XTEN, CFXTEN, если используют в дозе и режиме дозирования, определенных в качестве соответствующих для субъекта и его патологического состояния, может достигать циркулирующей концентрации, что приводит к нужному прокоагулянту или клиническому влиянию в течение длительного периода времени, по сравнению с аналогичной дозой соответствующего FVIII, не связанного с XTEN. Как используется в данном документе, "аналогичная доза" означает дозу с моль-эквиваленты/кг или международные единицы/кг (МЕ/кг) в случае композиции, которую вводят субъекту. Следует иметь в виду в данной области техники, что "аналогичная доза" FVIII, не связанного с XTEN, будет представлять меньшую массу препарата, но будет иметь по существу, одни и те же МЕ или моль-эквиваленты CFXTEN в дозе.

Международная единица ("IU") фактора VIII определена в данной области техники в качестве коагулирующей активности, присутствующей в 1 мл нормальной человеческой плазмы. Нормальный, отдельный человек без гемофилии, как ожидается, имеет активность фактора VIII около 100 МЕ/дл. При

гемофилии А, необходимые для лечения дозы зависят от состояния. В случае незначительного кровотечения, дозы природного или рекомбинантного фактора VIII от 20 до 40 МЕ/кг, как правило, вводят, по мере необходимости. В случае умеренного кровотечения, дозы от 30 до 60 МЕ/кг вводят по мере необходимости, и в случае большого кровотечения, могут быть необходимы дозы от 80 до 100 МЕ/кг, с повторными дозами от 20 до 25 МЕ/кг, вводимыми каждые 8-12 ч, пока кровотечение не будет остановлено. Для профилактики кровотечений у пациентов с тяжелой формой гемофилии А, обычные дозы природных или рекомбинантных составов FVIII составляют от 20 до 40 МЕ/кг массы тела в интервалах от около 2 до 3 дней. Стандартным уравнением для оценки соответствующей дозы композиции, содержащей фактор FVIII, является:

Необходимые единицы = масса тела (кг) × желаемое повышение фактора VIII (МЕ/дл или % нормы) × 0,5 (МЕ/кг на МЕ/дл).

Во многих случаях, терапевтические уровни FVIII у субъектов различных возрастов или степени заболевания были разработаны и доступны в опубликованной литературе или указаны на этикетке лекарственного средства в случае одобренных продуктов, которые содержат FVIII. Например, Subcommittee on Factor VIII and Factor IX of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis опубликовал, на интернет-сайте ISTH 29 ноября 2000, что наиболее широко используемый показатель гемофилии А устанавливается путем определения циркулирующих концентраций уровней прокоагулянта FVIII в плазме крове, у людей с <1% (< 0,01 МЕ/мл) фактора VIII определяют как тяжелую; 1-5% (0,01 - 0,05 МЕ/мл) как умеренной тяжести; и >5-40% (0,05 - <0,40 МЕ/мл) как легкую, при условии, что норма составляет 1 МЕ/мл фактора VIIIC (100%). Терапевтические уровни могут быть установлены для новых композиций, в том числе тех CFXTEN и фармацевтических композиций, которые содержат CFXTEN раскрытия, с использованием стандартных способов. При практическом осуществлении настоящего изобретения следует понимать, что любая дозировка CFXTEN, которая является эффективной, может быть использована для лечения случаев кровотечения или поддержания гемостаза. Способы установления терапевтических уровней и схем дозирования в случае данной композиция известны специалистам в данной области техники (Смотри, например, Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 11th Edition, McGraw-Hill (2005)). Например, с помощью использования исследований с эскалацией дозы у субъектов с целевым заболеванием для определения эффективности или желательного фармакологического влияния, появление побочных эффектов и определение циркулирующих уровней крови, для данного лекарственного средства или биопрепарата могут определять терапевтические уровни в крови для данного субъекта или популяцию субъектов. Исследования с увеличением дозы могут оценивать активность CFXTEN посредством исследований у субъекта или группы субъектов с гемофилией А. Исследования могут контролировать уровни прокоагулянта в крови, а также физиологические или клинические параметры, известные в данной области техники, или, как описано в данном документе, в случае одного или нескольких параметров, связанных с заболеванием, связанным с фактором VIII, или клиническими параметрами, связанными с применимыми результатами, вместе с наблюдениями и/или измеренными параметрами для определения недействующей дозы, неблагоприятных событий, минимально действующей дозы и подобного, вместе с измерением фармакокинетических параметров, которые устанавливает определенные или полученные циркулирующие уровни в крови. Результаты затем могут коррелировать с вводимой дозой и терапевтическими концентрациями в крови, которые совпадают с ранее определенными параметрами или эффективными уровнями. С помощью этих способов, диапазон доз и концентраций в крови может коррелировать с минимально действующей дозой, а также максимальной дозой и концентрацией в крови, при которой наблюдают и поддерживают нужный эффект или период, в течение которого он может быть обеспечен, тем самым создавая терапевтические уровни в крови и режим дозирования для композиции. Таким образом, с помощью вышеуказанных способов, устанавливают в крови уровень C_{min}, ниже которого гибридный белок CFXTEN не будет иметь нужный фармакологический эффект, и уровень C_{max} в крови, выше которого могут происходить побочные эффекты, такие как тромбоз (Brobrow, RS, JABFP (2005) 18(2):147-149), устанавливают терапевтическое окно для композиции.

Специалист в данной области техники может, с помощью способов, описанных в данном документе, или других способов, известных в данной области, подтвердить, что вводимый CFXTEN остается на терапевтических уровнях в крови для поддержания гемостаза для требуемого интервала или требует корректировки в дозах, или длинах, или последовательностях XTEN. Дополнительно, определение соответствующей дозы и частоты приема для поддержания CFXTEN в пределах терапевтического окна устанавливает терапевтически эффективный режим дозирования; график введения нескольких последовательных доз с использованием терапевтически эффективной дозы гибридного белка субъекту, который нуждается в этом, что приводит к последовательным пикам C_{max} и/или самым низким точкам C_{min}, которые остаются выше терапевтически-эффективных концентраций и приводят к улучшению по меньшей мере одного измеренного параметра, по сравнению с целевым состоянием. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN или фармацевтические композиции, которые содержат CFXTEN, вводимые в соответствующей дозе субъекту, приводят к концентрациям гибридного белка

CFXTEN в крови, которые остаются выше минимальной эффективной концентрации для поддержания гемостаза в течение по меньшей мере в около два раза более продолжительного периода, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN, и вводят в сопоставимой дозе; альтернативно, по меньшей мере в около три раза дольше; альтернативно, по меньшей мере в около четыре раза дольше; альтернативно, по меньшей мере в около пять раз дольше; альтернативно, по меньшей мере в около шесть раз дольше; альтернативно, по меньшей мере в около семь раз дольше; альтернативно, по меньшей мере в около восемь раз дольше; альтернативно, по меньшей мере в около девять раз дольше, альтернативно, по меньшей мере в около десять раз дольше, или по меньшей мере около двадцать или более раз более продолжительно, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN, и вводят в сопоставимой дозе. Как используется в данном документе, "соответствующая доза" означает дозу лекарственного средства или биопрепарата, который, при введении субъекту, может привести к желательному терапевтическому или фармакологическому влиянию (например, гемостазу) и/или концентрации в крови в пределах терапевтического окна.

При практической реализации изобретения CFXTEN с более продолжительным конечным временем полужизни являются, как правило, предпочтительными, с тем, чтобы повысить удобство для пациента, для того, чтобы повысить интервал между дозами и снизить количество лекарственного средства, необходимое для того, чтобы достигнуть продолжительного эффекта. Улучшенный параметры PK допускает сниженное дозирование заявленных композиций, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, прежде всего в случае субъектов с гемофилией A, получающих стандартную профилактику.

Как описано более подробно в примерах, которые относятся к фармакокинетическим характеристикам гибридных белков, содержащих XTEN, было отмечено, что возрастание общей длины XTEN, отдельно или в комбинации, придает непропорциональное повышение конечного времени полужизни гибридного белка, который содержит XTEN. Соответственно, настоящее изобретение обеспечивает гибридные белки CFXTEN и фармацевтические композиции, которые содержат CFXTEN, при том, что CFXTEN при введении субъекту проявляет улучшенное время полужизни. В отдельных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает мономерные гибридные белки CFXTEN, которые содержат один или несколько XTEN, при том, что количество и расположение XTEN выбирают так, чтобы придать повышенное конечного времени полужизни CFXTEN, введенному субъекту, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN, и вводят в сопоставимой дозе, при том, что повышение конечного времени полужизни, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, составляет по меньшей мере в около два раза дольше, или по меньшей мере в около три раза, или по меньшей мере в около четыре раза, или по меньшей мере в около пять раз, или по меньшей мере в около шесть раз, или по меньшей мере в около семь раз, или по меньшей мере в около восемь раз, или по меньшей мере в около девять раз, или по меньшей мере в около десять раз, или по меньшей мере в около 15 раз, или по меньшей мере в 20 раз, или по меньшей мере в 40 раз или более. В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает композиции CXTEN и фармацевтические композиции, которые содержат CFXTEN, при том, что введение композиции субъекту, который нуждается в этом, приводит к конечному времени полужизни, которое представляет собой по меньшей мере на 12 ч больше, или по меньшей мере на около 24 ч больше, или по меньшей мере на около 48 ч больше, или по меньшей мере на около 96 ч больше, или по меньшей мере на около 144 ч больше, или по меньшей мере на около 7 дней больше, или по меньшей мере на около 14 дней больше, или по меньшей мере на около 21 день больше, по сравнению с аналогичной дозой FVIII, не связанного с XTEN. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения введение эффективной для свертывания дозы гибридного белка CFXTEN субъекту, который нуждается в этом, может привести к экономии времени между последовательными дозами, необходимыми для поддержания уровней в крови около 0,1 МЕ/мл в течение по меньшей мере 48 ч, или по меньшей мере 72 ч, или по меньшей мере около 96 ч, или по меньшей мере около 120 ч, или по меньшей мере около 7 дней, или по меньшей мере около 14 дней, или по меньшей мере около 21 день между последовательными дозами, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, и вводят в сопоставимой дозе.

В отдельном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает гибридные белки CFXTEN и фармацевтические композиции, которые содержат CFXTEN, который проявляет, при введении субъекту, нуждающемуся в этом, повышение AUC на по меньшей мере около 50%, или по меньшей мере около 60%, или по меньшей мере около 70%, или по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 100%, или по меньшей мере около 150%, или по меньшей мере около 200%, или по меньшей мере около 300%, или по меньшей мере около 500%, или по меньшей мере около 1000%, или по меньшей мере около 2000%, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN, и вводят субъекту в сопоставимой дозе. Фармакокинетические параметры CFXTEN могут определять с помощью стандартных способов, которые содержат дозирование, взятия проб крови на определенных промежутках времени, и анализирование белка с использованием ELISA, HPLC, радиоизотопный анализ, анализы коагулирующей активности, анализы из табл. 49, или другие способы, известные в данной области техники или, как описано в данном документе, с последующим стандартным расчетом данных для получения времени полужизни и другими параметрами PK.

В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения более малое количество МЕ гибрид-

ного белка в около два раза меньше, или в около три раза меньше, или в около четыре раза меньше, или в около пять раз меньше, или в около шесть раз меньше, или в около восемь раз меньше, или в около 10 или более раз меньше вводят, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN, при режиме дозирования, необходимом для поддержания гемостаза, а гибридный белок достигает аналогичной площади под кривой, как в случае соответствующего количества ME FVIII, не связанного с XTEN, необходимого для поддержания гемостаза. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения гибридный белок CFXTEN или фармацевтические композиции, которые содержат CFXTEN, требуют менее частое введение в случае стандартной профилактики субъекта с гемофилией A, при том, что дозу гибридного белка вводят примерно каждые четыре дней, примерно каждые семь дней, примерно каждые 10 дней, примерно каждые 14 дней, примерно каждые 21 день, или примерно ежемесячно субъекту, а гибридный белок достигает аналогичной площади под кривой, как и соответствующий FVIII, не связанный с XTEN, и вводят субъекту. В других вариантах осуществления настоящего изобретения накапливающееся более малое количество ME гибридного белка, вводимого субъекту, на около 5%, или около 10%, или около 20%, или около 40%, или около 50%, или около 60%, или около 70%, или около 80%, или около 90% меньше, по сравнению с соответствующим количеством ME FVIII, не связанного с XTEN, при режиме дозирования, необходимом для поддержания концентрации в крови 0,1 ME/мл, пока гибридный белок достигает по меньшей мере аналогичной площади под кривой, как и соответствующий FVIII, не связанный с XTEN. Накапливающееся более малое количество ME измеряют в течение периода по меньшей мере около одной недели, или около 14 дней, или около 21 день, или около одного месяца.

В отдельном аспекте настоящее изобретение обеспечивает композиции CFXTEN, созданные для снижения связывания с помощью средств связывания FVIII, тем самым возрастает конечное время полужизни CFXTEN, вводимого субъекту, все еще сохраняя прокоагулянтную активность. Считается, что CFXTEN по настоящему изобретению имеет сравнительно более высокую и/или замедленную активность, достигаемую с помощью сниженного активного выведения молекул с помощью добавления неструктурированного XTEN к фактору свертывания FVIII. Механизмы выведения для удаления FVIII из кровотока до сих пор не выяснены. Поглощение, элиминация и инактивация протеинов свертывания могут происходить в кровеносной системе, а также во внесосудистом пространстве. Факторы свертывания являются сложными протеинами, которые взаимодействуют с большим количеством других протеинов, липидов и рецепторов, а многие из этих взаимодействий могут способствовать элиминации CF из кровотока. Протеиновый фактор фон Виллебранда является примером средства связывания FVIII, которое связано с FVIII. Фактор VIII и фактор фон Виллебранда (VWF) циркулируют в крови как плотные, нековалентно связанные комплексы, в которых VWF служит в качестве носителя, что, скорее всего, способствует защите фактора FVIII от активных механизмов расщепления, при этом все равно приводя к ограничению конечного времени полужизни FVIII. Например: (i) VWF стабилизирует гетеродимерную структуру FVIII; (ii) VWF предохраняет FVIII от протеолитической деградации с помощью фосфолипид-связывающего протеазоподобного активированного протеина C и активированного FX (FXa); (iii) VWF препятствует связыванию FVIII с отрицательно заряженными поверхностями фосфолипида, располагающимися в пределах активированных тромбоциты; (iv) VWF ингибирует связывание FVIII с активированным FIX (FIXa), тем самым не допуская доступ FVIII к FX-активизирующему комплексу; и (v) VWF предотвращает клеточное поглощение FVIII (Lenting, P.J., et al., J Thrombosis and Haemostasis (2007) 5(7):1353-1360). Кроме того, рецептор LDL, связанный с протеином (LRP1, также известный как α2-макроглобулиновый рецептор или CD91) был определен в качестве возможного рецептора выведения в случае FVIII, со связывающими сайтами LRP1, определенными на обоих цепях гетеродимерной формы FVIII (Lenting PJ, et al., J Biol Chem (1999) 274: 23734-23739; Saenko EL, et al., J Biol Chem (1999) 274:37685-37692). LRP участвуют в выведение разнообразных лигандов, которые содержат протеазы, ингибиторы типа Куниц, комплексы протеазы и серпина, липазы и липопротеины (Narita, et al., Blood (1998) 2:555-560). Было показано, что легкая цепь, а не тяжелая цепь, фактора VIII связывается с открытой поверхностью протеина рецептора LRP1 (Lentig et al. (J Biol Chem (1999) 274(34):23734-23739; и патент США № 6919311), что предполагает, что LRP1 может играть существенную роль в активном выведеним протеинов, таких как FVIII. В то время как взаимодействие VWF-FVIII имеет высокую аффинность (<1 нМ), комплекс тем не менее находится в динамическом равновесии, так, что малая, но значительная часть молекулы FVIII (5-8%) циркулирует в виде свободного протеина (Leyte A, et al., Biochem J (1989) 257: 679-683; Noe DA. Haemostasis (1996) 26: 289-303). Таким образом, часть природного FVIII, не защищенная с помощью VWF, позволяет активным механизмам выведения удалять незащищенный FVIII из кровотока.

В отдельном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, который ассоциирован с VWF, но имеет повышенную защиту от активных рецепторов выведения, обеспечиваемых с помощью включения более двух XTEN в одной или нескольких локализациях в пределах молекулы FVIII (например, локализациях, выбранных из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9 или фиг. 8-9), при том, что XTEN препятствует взаимодействию получаемых CFXTEN с данными рецепторы выведения с тем результатом, что фармакокинетические свойства CFXTEN улучшаются, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобрете-

ние обеспечивает CFXTEN, который имеет сниженную аффинность связывания с VWF на по меньшей мере 5% меньше, или около 10%, или около 20%, или около 40%, или около 50%, или около 60%, или около 70% меньше, но, тем не менее, сконфигурирован для того, чтобы иметь повышенную защиту от активных рецепторов выведения, обеспеченных с помощью включения XTEN в одной или нескольких локализациях в пределах молекулы FVIII, при том, что XTEN препятствует взаимодействию фактора VIII с такими рецепторами. В предыдущих вариантах осуществления настоящего изобретения CFXTEN имеет увеличенное конечное время полужизни на по меньшей мере около 12 ч, или 24 ч, или 48 ч, или 72 ч, или 96 ч, или 120 ч, или 144 ч, или 7 дней, или 10 дней, или 14 дней или 21 день, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN. Настоящее изобретение обеспечивает способ для создания CFXTEN со сниженным выведением, при том, что гибридные белки CFXTEN, созданные с несколькими вставками, оценивают на ингибирование связывания рецепторами выведения, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, с использованием in vitro анализов связывания или in vivo фармакокинетических моделей, описанных в данном документе, или других анализов, известных в данной области техники, и выбарают те, которые демонстрирует сниженное связывание, при этом сохраняя прокоагулянтную активность FVIII. Кроме того, ранее описанные гибридные белки могут быть оптимизированы, чтобы иметь отношение радиусов XTEN увеличенное на по меньшей мере 2,0-3,5 для того, чтобы достигнуть фармакокинетические свойства, которые являются дополнительно улучшенными. Табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9 и фиг. 8-9 обеспечивают неограничивающие примеры точек вставки XTEN в пределах последовательности фактора VIII. С использованием подобных точек вставки, настоящее изобретение предусматривает композиции CFXTEN, которые имеют конформации с несколькими XTEN, вводимыми с около 100, или около 200, или около 300, или около 400, или около 500 аминокислотами, разделяющими по меньшей мере три XTEN для дополнительного повышения защиты против активных механизмов выведения и, следовательно, повышения конечного времени полужизни CFXTEN. Без привязки к какой-либо теории, XTEN композиций CFXTEN с высоким суммарным зарядом (например, CFXTEN, который содержит семейство AE XTEN) предполагают, как описано выше, для того, чтобы иметь менее неспецифические взаимодействия с различными отрицательно-заряженными поверхностями, такие как кровяные сосуды, ткани или различные рецепторы, которые могут дополнительно способствовать снижению активного клиренса. С другой стороны, ожидают XTEN композиций CFXTEN с низким (или без) суммарным зарядом (например, CFXTEN, который содержит семейство AG XTEN), для того, чтобы иметь более высокую степень взаимодействия с поверхностями, которые, если участвуют в активном клиренсе, могут потенцировать активность связанного фактора свертывания, с учетом известного вклада клеток (например, тромбоцитов) и сосудистых поверхностей в способ свертывания и интенсивности активации факторов свертывания (Zhou, R., et al., Biomaterials (2005) 26(16):2965-2973; London, F., et al. Biochemistry (2000) 39(32):9850-9858). Настоящее изобретение, в частности, имеет преимущество в том, что некоторые лиганды, которые имеют сниженное связывание с рецептором выведения, либо в качестве результата уменьшенной скорости ассоциации или увеличенной скорости диссоциации, могут подвергаться влиянию блокады сайтов рецептора с помощью вводимых XTEN, образующих случайную спираль, что приводит к сниженному связыванию. Выбор конкретной конформации гибридного белка CFXTEN может быть проверен с помощью способов, раскрытых в данном документе, для подтверждения тех конформаций, которые снижают степень связывания с рецептором выведения так, что достигают сниженную скорость активного выведения. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN содержит последовательность FVIII-XTEN, которая имеет один или несколько XTEN, вводимых в локализациях, выбранных из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9 или фиг. 8-9, при том, что конечное время полужизни CFXTEN увеличивается по меньшей мере в около два раза, или по меньшей мере в около три раза, или по меньшей мере в около четыре раза, или по меньшей мере в около пять раз, или по меньшей мере в около шесть раз, или по меньшей мере в около восемь раз, или по меньшей мере в около десять раз, или по меньшей мере в около двадцать раз, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN содержит последовательность FVIII-XTEN, которая имеет первый и по меньшей мере второй XTEN, вводимые в первой и второй локализации, выбранной из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9 или фиг. 8-9, при том, что конечное время полужизни CFXTEN увеличивается по меньшей мере в около два раза, или по меньшей мере в около три раза, или по меньшей мере в около четыре раза, или по меньшей мере в около пять раз, или по меньшей мере в около шесть раз, или по меньшей мере в около восемь раз, или по меньшей мере в около десять раз, или по меньшей мере в около двадцать раз, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN. В еще одном дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения, CFXTEN содержит последовательность FVIII-XTEN, которая содержит несколько последовательностей XTEN с использованием трех из нескольких локализаций вставки XTEN, выбранных из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9 или фиг. 8-9, отделенных с помощью около 100, или около 200, или около 300, или около 400, или около 500 аминокислот, при том, что конечное время полужизни CFXTEN увеличивается по меньшей мере в около два раза, или по меньшей мере в около три раза, или по меньшей мере в около четыре раза, или по меньшей мере в около пять раз, или по меньшей мере в около шесть раз, или по меньшей мере в около восемь раз, или по меньшей мере в около десять раз, или по меньшей мере в около двадцать раз, по сравнению с

FVIII, не связанным с XTEN. В предыдущих вариантах осуществления настоящего изобретения, описанных выше в этом абзаце, XTEN, встроенные в конформации CFXTEN, могут быть идентичными или могут быть разными, и могут иметь по меньшей мере около 80%, или 90%, или 91%, или 92%, или 93%, или 94%, или 95%, или 96%, или 97%, или 98%, или 99%, идентичности последовательности с последовательностью из любой из табл. 3, 4 и 13-17, и могут, необязательно, содержать одну или несколько расщепленных последовательностей из табл. 12, облегчающих секретирование одного или нескольких XTEN из гибридного белка CFXTEN.

В отдельном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, который повышает фармакокинетические свойства гибридного белка с помощью связывания одного или нескольких XTEN с компонентом FVIII гибридного белка, при том, что гибридный белок имеет повышение коэффициента средней молекулярной массы на по меньшей мере в около два раза, или по меньшей мере в около три раза, или по меньшей мере в около четыре раза, или по меньшей мере в около пять раз, или по меньшей мере в около шесть раз, или по меньшей мере в около семь раз, или по меньшей мере в около восемь раз, или по меньшей мере в около десять раз, или по меньшей мере в около двадцать раз, или по меньшей мере в около пятьдесят раз, и при том, что конечное время полужизни CFXTEN, при введении субъекту, увеличивается по меньшей мере в около два раза, или по меньшей мере в около четыре раза, или по меньшей мере в около восемь раз, или по меньшей мере в около 10 раз или более, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN. В вышеприведенном варианте осуществления настоящего изобретения, при том, что по меньшей мере две молекулы XTEN включены в CFXTEN, XTEN могут быть идентичными или они могут иметь различную композицию последовательностей, суммарный заряд или длину. XTEN может иметь по меньшей мере около 80%, или 90%, или 91%, или 92%, или 93%, или 94%, или 95%, или 96%, или 97%, или 98% или 99% идентичности последовательности с последовательностью из любой из табл. 3, 4 и 13-17, и могут, необязательно, содержать одну или несколько расщепленных последовательностей из табл. 12, облегчающих секретирование одного или нескольких XTEN из гибридного белка CFXTEN.

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает композиции CFXTEN, в которых степень активности, биодоступность, время полужизни или физико-химическая характеристика гибридного белка может быть сшита с помощью выбора и размещения типа и длины XTEN в композициях CFXTEN. Соответственно, настоящее изобретение предусматривает композиции, в которых получают FVIII из табл. 1 и XTEN или фрагмент XTEN из любой из табл. 3, 4 или 13-17, например, в конформации, выбранной из любой из формул I-VIII, или XTEN, введенный в локализации, выбранные из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9 или фиг. 8-9, так, что конструкция имеет нужное свойство.

Настоящее изобретение обеспечивает способы получения композиций CFXTEN, которые могут поддерживать компонент FVIII на терапевтических уровнях у субъекта, который нуждается в этом, на по меньшей мере в два раза, или по меньшей мере в три раза, или по меньшей мере в четыре раза, или по меньшей мере в пять раз выше периода времени, по сравнению с аналогичными дозировками соответствующего FVIII, не связанного с XTEN. В отдельном варианте осуществления способа, субъект получает стандартную профилактику для предотвращения случаев кровотечения. В дополнительном варианте осуществления способа, субъект получает лечение в случае кровотечения. В дополнительном варианте осуществления способа, субъект получает лечение для повышения циркулирующей концентрации в крови прокоагулянта FVIII выше 1%, или выше 1-5%, или выше 5-40%, по сравнению с концентрациями FVIII в нормальной плазме. "Прокоагулянт", как используется в данном документе, имеет его общее значение в данной области техники и, как правило, соответствует активности, которая способствует образованию тромба, либо в in vitro анализе, либо in vivo. Способ получения композиции, который может поддерживать компонент FVIII на терапевтических уровнях, включает этапы выбора одного или нескольких XTEN, соответствующих по конъюгации FVIII для обеспечения нужных фармакокинетических свойств с учетом данной дозы и режима дозирования, создания конструкции гена, который кодирует CFXTEN в одной из конформаций, раскрытых в данном документе, трансформацию соответствующей клетки-хозяина с экспрессирующим вектором, который содержит кодирующий ген, экспрессирование гибридного белка в подходящих условиях культивирования, извлечение CFXTEN, введение CFXTEN млекопитающему с последующими анализами для проверки фармакокинетических свойств, активности гибридного белка CFXTEN (например, способности поддержания гемостаза или служить в качестве прокоагулянта) и безопасности вводимой композиции. Эти композиции, которые демонстрируют нужные свойства, выбирают для дополнительного использования. CFXTEN, созданный с помощью способов, которые обеспечивают в данном документе, может привести к увеличенной эффективности вводимой композиции с помощью, среди других свойств, поддержания циркулирующих концентраций компонента прокоагулянта FVIII на терапевтических уровнях в течение увеличенного периода времени.

Настоящее изобретение обеспечивает способы анализа гибридных белков CFXTEN разной композиции или конформаций для того, чтобы обеспечить CFXTEN с нужной степенью прокоагулянта и терапевтической активностью и фармакокинетическими свойствами, а также достаточные результаты исследования безопасности препарата. Специфические in vitro и in vivo анализы или животные модели используют для оценки активности и функциональных характеристик каждого сконфигурированного CFXTEN

и/или компонента FVIII, встроенных в CFXTEN, которые содержат, но без ограничения ими, анализы в примерах, анализы из табл. 49, а также следующие анализы или другие подобные анализы, известные в данном уровне техники для анализирования свойств и влияний FVIII. Могут быть проведены функциональные анализы, которые позволяют определить активность свертывания, такие как одноэтапный анализ коагулирующей активности и двухэтапный анализ коагулирующей активности (Barrowcliffe TW, Semin Thromb Hemost. (2002) 28(3):247-256), анализы времени частичной тромбопластиновой активизации (aPTT) (Belaaouaj AA et al., J. Biol. Chem. (2000) 275:27123-8; Diaz-Collier JA. Haemost (1994) 71:339-46), анализы хромогенного FVIII (Lethagen, S., et al., Scandinavian J Haematology (1986) 37:448-453), или фармакодинамические анализы на животной модели, которые содержат время кровотечения или тромбоэластографию (TEG или ROTEM), среди прочих. Другие анализы содержат определение аффинности связывания CFXTEN с целевым субстратом с использованием связывания или конкурентных анализов связывания, таких как анализы Biacore со связанными с чипом рецепторами, или связывания протеинов, или анализы ELISA, как описано в патенте США 5534617, анализы, описанные в примерах в данном документе, радиорецепторные анализы, или другие анализы, известные в данной области техники. Другие анализы для определения связывания ингибиторов FVIII с CFXTEN содержат Бетезда-анализ или модификацию Nijmegen Бетезда-анализа. Предыдущие анализы также могут использовать для оценки вариантов последовательности FVIII (анализируют в качестве уникальных компонентов или в качестве гибридного белка CFXTEN) и могут сравнивать с природным FVIII, для определения, имеют ли они такую же степень прокоагулянтной активности, как природный CF или его отдельная фракция, так, что они подходят для включения в CFXTEN; например, по меньшей мере около 10%, или по меньшей мере около 20$, или около 30%, или по меньшей мере около 40%, или по меньшей мере около 50%, или по меньшей мере около 60%, или по меньшей мере около 70%, или по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90% активности, по сравнению с природным FVIII.

Оптимизация дозы является важной для всех лекарственных средств. Терапевтически эффективная доза или количество CFXTEN изменяется в соответствии с такими факторами заболевания, как заболевание, возраст, пол и вес индивидуума, и способностью вводимого гибридного белка вызывать нужный ответ у индивидуума. Например, стандартизированная уникальная доза FVIII для всех пациентов, представленных с различными состояниями кровотечений или аномальными клиническими параметрами (например, нейтрализующими антителами) могут не всегда быть эффективными. Пациенты с гемофилией А с травмой, которые подверглись операции или которые имеют высокие титры ингибирующих FVIII антител, как правило, требуют более высокого и более частого дозирования. Как правило, уровень дозировки корректируют по частоте, продолжительности и единицам в соответствии с тяжестью и длительностью кровотечения каждого пациента. Соответственно, CFXTEN входит в фармацевтически приемлемый носитель, средство доставки или стабилизатор, в количестве, достаточном для доставки пациенту терапевтически эффективного количества гибридного белка для остановки кровотечения, что измеряют с помощью стандартных анализов коагулирующей активности. Рассмотрение этих факторов находится в пределах компетенции обычного клинициста с целью определения терапевтически или фармакологически эффективного количества CFXTEN и соответствующего режима дозирования, по сравнению с тем количеством, которое может привести к недостаточной специфической активности так, что не достигают клинического улучшения или остановки кровотечения.

Настоящее изобретение обеспечивает способы установления режима дозирования для фармацевтических композиций CFXTEN по настоящему изобретению. Способы включают введение последовательных доз терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции CFXTEN с использованием различных периодов времени между дозами, для определения того, что интервал дозирования достаточный для того, чтобы достигнуть и/или поддерживать нужный параметр, уровень в крови или клинический эффект; подобные последовательные дозы терапевтически эффективного количества в эффективном интервале устанавливают терапевтически эффективный режим дозирования CFXTEN в случае связанного с фактором VIII болезненного состояния или заболевания. Профилактически эффективное количество соответствует количеству CFXTEN, необходимому в течение периода времени, требуемого для предотвращения физиологического или клинического результата или события; например, отложенного начала случая кровотечения или поддержания концентрации в крови прокоагулянта FVIII или эквивалентно более высокого порогового уровня (например, от 1-5% до 5-40% нормы). В способах лечения, величина дозы CFXTEN, которую вводят субъекту, изменяется в диапазоне от около 5 до 300 МЕ/кг/доза, или от около 10 до 100 МЕ/кг/доза, или от около 20 до около 65 МЕ/кг/доза, или от около 20 до около 40 МЕ/кг/доза субъекта. Подходящая доза также может зависеть от других факторов, которые могут влиять на реакцию на лекарство; например, эпизоды кровотечения обычно требуют более высокие дозы в более короткие промежутки времени, по сравнению с профилактикой.

В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения способ включает введение терапевтически-эффективного количества фармацевтической композиции, которая содержит композицию гибридного белка CFXTEN и по меньшей мере один фармацевтически приемлемые носитель, субъекту, нуждающемуся в этом, при том, что введение приводит к более значительному улучшению по меньшей мере одного параметра или физиологического состояния, связанного с дефицитом FVIII или коагулопа-

тией, или приводят к более благоприятному клиническому результату, который выполняют с помощью компонента FVIII CFXTEN, по сравнению с влиянием на параметр, заболеванием или клиническим результатом, который выполняют с помощью введения фармацевтической композиции, которая содержит FVIII, не связанный с XTEN, и вводят в сопоставимой дозе. Неограничивающие примеры параметров, которые являются улучшенными, содержат концентрацию в крови прокоагулянта FVIII, снижение времени анализа частичной тромбопластиновой активизации (aPTT), снижение времени одноэтапного или двухэтапного анализа коагулирующей активности, отложенное начало случая кровотечения, снижение времени хромогенного анализа FVIII, снижение времени кровотечения, разрешение эпизода кровотечения или снижение титра Бетезды к CFXTEN, по отношению к природному FVIII. В отдельном варианте осуществления вышеизложенного, улучшение выполняют с помощью введения фармацевтической композиции CFXTEN в дозе, которая достигает циркулирующей концентрации прокоагулянта FVIII (или эквивалента) выше порогового уровня (например, от 1-5 до 5-40% нормы уровней FVIII), тем самым устанавливая терапевтически эффективную дозу. В дополнительном варианте осуществления вышеизложенного, улучшение выполняют с помощью введения нескольких последовательных доз фармацевтической композиции CFXTEN с использованием терапевтически эффективного режима дозирования, который поддерживает циркулирующую концентрацию прокоагулянта FVIII (или эквивалента) выше порогового уровня (например, от 1-5 до 5-40% нормы уровней FVIII) на всей протяженности периода дозирования. В дополнительном варианте осуществления способа, введение по меньшей мере двух последовательных доз фармацевтической композиции CFXTEN с использованием терапевтически эффективного режима дозирования поддерживает циркулирующую концентрацию прокоагулянта FVIII (или эквивалента) выше около 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30 или 40% нормы уровней FVIII в течение периода, который является по меньшей мере в около три раза дольше; альтернативно, по меньшей мере в около четыре раза дольше; альтернативно, по меньшей мере в около пять раз дольше; альтернативно, по меньшей мере в около шесть раз дольше; альтернативно, по меньшей мере в около семь раз дольше; альтернативно, по меньшей мере в около восемь раз дольше; альтернативно, по меньшей мере в около девять раз более продолжительное или по меньшей мере в около десять раз более продолжительным, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, и вводят с использованием терапевтически эффективного режима дозирования.

В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN или фармацевтические композиции, которые содержат CFXTEN, которые вводят при терапевтически эффективном режиме дозирования, приводят к выигрышу во времени по меньшей мере в около три раза дольше; альтернативно, по меньшей мере в около четыре раза дольше; альтернативно, по меньшей мере в около пять раз дольше; альтернативно, по меньшей мере в около шесть раз дольше; альтернативно, по меньшей мере в около семь раз дольше; альтернативно, по меньшей мере в около восемь раз дольше; альтернативно, по меньшей мере в около девять раз более продолжительному или по меньшей мере в около десять раз более продолжительному между по меньшей мере двумя последовательными пиками C_{max} и/или самыми низкими точками C_{min} в случае уровней гибридного белка в крови, по сравнению с соответствующим биологически активным протеином гибридного белка, не связанным с XTEN, и введенным субъекту в аналогичном режиме дозирования. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN, вводимый при терапевтически эффективном режиме дозирования, приводит к аналогичному улучшению одного, или двух, или трех или более измеренных параметров с использованием менее частого дозирования или более низкой общей дозировки в МЕ гибридного белка фармацевтической композиции, по сравнению с соответствующим биологически активным компонентом(ами) протеина, не связанным с XTEN и вводят субъекту с использованием терапевтически эффективного режима дозирования FVIII. Измеренные параметры содержат любой из клинических, биохимических или физиологических параметров, описанных в данном документе, или другие известные в данной области для оценки состояний субъектов, связанных с фактором VIII.

(b) Фармакология и фармацевтические свойства CFXTEN.

Настоящее изобретение обеспечивает композиции CFXTEN, содержащие ковалентно связанный с XTEN FVIII, которые имеют повышенные фармацевтические и фармакологические свойства, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, а также способы для повышения терапевтического и/или прокоагулирующего эффекта компонентов FVIII композиций. Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает композиции CFXTEN с улучшенными свойствами, по сравнению с известными в данной области техники гибридными белками фактора VIII, которые содержат альбумин, партнеры полипептида иммуноглобулина, полипептиды более короткой длины и/или партнеры полипептида с повторяющимися последовательности. Кроме того, гибридные белки CFXTEN обеспечивают значительные преимущества, по сравнению с химическими конъюгатами, такими как пегилированные конструкции FVIII, в частности, тот факт, что рекомбинантные гибридные белки CFXTEN могут быть сделаны в экспрессирующих системах клетки-хозяина, которые могут снижать время и стоимость этапов как исследования, так и разработки и производства продукта, а также привести к более гомогенному, определенному продукту с меньшей токсичностью и продукта, и метаболитов CFXTEN, по сравнению с пегилированными конъюгатами.

В качестве терапевтических средств, CFXTEN обладает рядом преимуществ, по сравнению с тера-

пиями, которые не содержат XTEN, который содержит одно или несколько из следующих неограничивающих свойств: увеличенная растворимость, повышенная термостабильность, сниженная иммуногенность, увеличенная средняя молекулярная масса, сниженный почечный клиренс, сниженный протеолиз, сниженный метаболизм, улучшенная терапевтическая эффективность, режим менее частого дозирования с увеличенным времени между дозами, способный поддерживать гемостаз у субъекта с гемофилией A, способность вводить композицию CFXTEN подкожно или внутримышечно, "индивидуализированная" скорость абсорбции при введении подкожно или внутримышечно, улучшенная стабильность к лиофилизации, улучшенная стабильность сыворотки/плазмы, увеличенное конечное время полужизни, увеличенная растворимость в кровотоке, уменьшенное связывание нейтрализующими антителами, уменьшенный активный клиренс, аффинность связывания индивидуализированного субстрата, устойчивость к деградации, устойчивость к замораживанию-оттаиванию, устойчивость к протеазам, устойчивость к убиквитинированию, простота введения, совместимость с другими фармацевтическими наполнителями или носителями, персистенция у субъекта, увеличенная стабильность при хранении (например, увеличенный срок хранения) и подобное. Совокупный эффект улучшенных свойств заключается в том, что использование композиции CFXTEN может привести к, в целом, улучшенному терапевтическому эффекту, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, привести к экономическим выгодам, связанным с менее частой дозировкой, и/или привести к лучшему соблюдению пациентом режима и схемы лечения при введении субъекту со связанным с фактором VIII заболеванием.

Настоящее изобретение обеспечивает композиции CFXTEN и фармацевтические композиции, которые содержат CFXTEN, при том, что введение композиции приводит к улучшению по меньшей мере одного из клинических или биохимических параметров, раскрытых в данном документе как применимые для оценивания болезней субъекта, заболеваний или расстройств. Неограничивающие примеры параметров, которые являются улучшенными, содержат концентрации прокоагулянта FVIII в крови, сниженное время анализа частичной тромбопластиновой активизации (aPTT), сниженное время одноэтапного или двухэтапного анализа коагулирующей активности, отложенное начало случая кровотечения, сниженное время хромогенного анализа FVIII, сниженное время кровотечения, разрешение эпизода кровотечения или снижение титра Бетезда CFXTEN по отношению к природному FVIII. Улучшенные фармакокинетические свойства субъекта CFXTEN позволяют использование совокупно более низкой дозы МЕ гибридного белка для поддержания параметра, по сравнению с соответствующим компонентом FVIII, не связанным с XTEN. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения общая доза CFXTEN в МЕ вариантов осуществления настоящего изобретения, необходимая для того, чтобы достигнуть и поддерживать улучшение по меньшей мере одного параметр в течение около 2-7 дней, составляет по меньшей мере в около три раза меньше, или по меньшей мере в около четыре раза, или по меньшей мере в около пять раз, или по меньшей мере в около шесть раз, или по меньшей мере в около восемь раз, или по меньшей мере в около 10 раз меньше, по сравнению с соответствующим компонентом FVIII, не связанным с XTEN. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения общая доза субъекта в МЕ CFXTEN, необходимом для того, чтобы достигнуть и поддерживать улучшение по меньшей мере одного параметр за две, три или четыре последовательные дозы составляет по меньшей мере в около три раза меньше, или по меньшей мере в около четыре раза, или по меньшей мере в около пять раз, или по меньшей мере в около шесть раз, или по меньшей мере в около восемь раз, или по меньшей мере в около 10 раз меньше, по сравнению с соответствующим компонентом FVIII, не связанным с XTEN. Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает некоторые варианты осуществления CFXTEN, при том, что период между последовательными введениями, которые приводят к достижению и поддержанию улучшения по меньшей мере одного параметра, является по меньшей мере в около три раза, или по меньшей мере в около четыре раза, или по меньшей мере в около пять раз, или по меньшей мере в около шесть раз, или по меньшей мере в около восемь раз, или по меньшей мере в около 10 раз более продолжительным, по сравнению с соответствующим компонентом FVIII, не связанным с XTEN, и вводят в дозе с аналогичными МЕ. Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает некоторые варианты осуществления CFXTEN, при том, что введение 25 МЕ/кг приводят к 30% улучшению в анализе времени aPTT (или схожем анализе коагулирующей активности) у субъекта с гемофилией A, по сравнению с 25 МЕ/кг соответствующего FVIII, не связанного с XTEN, если анализируют около 2-7 дней после введения. В еще одном дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения, настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN, при том, что введение 25 МЕ/кг приводит к 30% улучшению времени анализа время кровотечения у субъекта с гемофилией A, по сравнению с 25 МЕ/кг соответствующего FVIII, не связанного с XTEN, если анализируют около 2-7 дней после введения.

В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения XTEN в качестве партнера слияния увеличивает растворимость FVIII полезной нагрузки. Соответственно, если является желательным повышение таких фармацевтических или физико-химических свойств FVIII, как степени растворимости или стабильности в воде, длина и/или композиция семейства мотивов последовательностей XTEN, встроенной в гибридный белок, может быть выбран каждый, чтобы придать различную степень растворимости и/или стабильности у соответствующих гибридных белков так, что, в целом, фармацевтические свойства композиции CFXTEN являются улучшенными. Гибридные белки CFXTEN могут быть построе-

ны и проанализированы, с использованием способов, описанных в данном документе, для подтверждения физико-химических свойств и выбора длины последовательности XTEN или регулируют расположение, по мере необходимости, для того, чтобы привести к нужным свойствам. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN имеет растворимость в воде, которая составляет по меньшей мере около 25% выше, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, или по меньшей мере около 30%, или по меньшей мере около 40%, или по меньшей мере около 50%, или по меньшей мере около 75%, или по меньшей мере около 100%, или по меньшей мере около 200%, или по меньшей мере около 300%, или по меньшей мере около 400%, или по меньшей мере около 500%, или по меньшей мере около 1000% выше соответствующего FVIII, не связанного с XTEN. Настоящее изобретение обеспечивает способы для получения и восстановления экспрессированного CFXTEN из клетки-хозяина с улучшенной растворимостью и легкостью восстановления, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения способ включает этапы трансформации эукариотической клетки-хозяина с полинуклеотидом, кодирующим CFXTEN, с одним или несколькими компонентами XTEN с совокупной длиной последовательности выше около 100, или выше около 200, или выше около 400, или выше около 600, или выше около 800, или выше около 1000, или выше около 2000, или выше около 3000 аминокислотных остатков, экспрессирования гибридного белка CFXTEN в клетке-хозяине в подходящих культуральных и индукционных условиях и извлечения экспрессированного гибридного белка в растворимой форме. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения один или несколько XTEN гибридных белков CFXTEN каждый имеет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или 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%, до около 100% идентичности последовательности, по сравнению с одним или несколькими XTEN, выбранными из любой из табл. 4 и 13-17, или их фрагментов, и FVIII имеет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или 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 100% идентичности последовательности, по сравнению с FVIII, выбранным из табл. 1, и компоненты CFXTEN находятся в конформации от N- до C-конца, выбранной из любого из вариантов осуществления конформации, раскрытых в данном документе.

VI) Использования композиций CFXTEN.

Настоящее изобретение обеспечивает способы и схемы достижения положительного эффекта на заболевание, связанное с фактором VIII с помощью введения композиций, которые содержат CFXTEN. Как используется в данном документе, "заболевание, связанное с фактором VIII" предназначен для того, чтобы содержать, но без ограничения ими, недостаточности фактора VIII, нарушения свертываемости связаные с дефицитом фактора VIII, гемофилию A, нейтрализация фактора VIII с помощью анти-FVIII антител или других ингибиторов фактора VIII, и случаи кровотечения, получаемые при травме или операции или сосудистое повреждение и другие подобные заболевания, которые могут быть улучшены или исправлены путем введения фактора VIII субъекту. Патентоспособные способы достигают положительного эффекта, если рассматриваемые недостатки и/или ограничения других способов лечения с использованием препаратов фактора VIII, которые имеют относительно короткое конечное время полужизни, требующее частые введения, нейтрализуют ингибиторами или имеют неблагоприятную фармакоэкономику.

Гемостаз регулируют с помощью нескольких протеиновых факторов, и подобные протеины, а также их аналоги, нашли применение при лечении заболеваний, связанных с фактором VIII. Несмотря на это, использование коммерчески доступного FVIII встречено с менее замечательным успехом в лечении субъектов, страдающих от подобных заболеваний. В частности, оптимизирование дозы и частота дозирования являются важными для FVIII, используемого в поддержании циркулирующих концентраций FVIII выше пороговых уровней, необходимых для гемостаза, а также лечения или предотвращения случаев кровотечения у субъектов с гемофилией A. Тот факт, что коммерчески доступные продукты FVIII имеют короткое время полужизни, делают необходимым частое дозирование, для того, чтобы достигнуть клинического эффекта, который приводят к трудностям в лечении подобных пациентов.

Как было установлено Subcommittee on Factor VIII and Factor IX of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis (опубликовано на интернет-сайте ISTH 29 ноября 2000), более широко используемое измерение тяжести гемофилии A устанавливают с помощью определения циркулирующих концентраций уровней прокоагулянта FVIII в плазме, у людей с <1% (< 0,01 МЕ/мл) фактора VIII, определяется как тяжелая; 1-5% (0,01-0,05 МЕ/мл) как умеренная тяжесть; и >5-40% (0,05 - <0,40 МЕ/мл) как легкая, где норма составляет 1 МЕ/мл фактора VIIIC (100%).

Настоящее изобретение обеспечивает способы лечения субъектов, страдающих от, или с риском развития заболевания, связанного с фактором VIII. Более конкретно, настоящее изобретение обеспечивает способы лечения или профилактики контролирования кровотечения у субъекта. Субъект может быть любым животным, но, предпочтительно, представляет собой человека. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения способ включает введение эффективного для свертывания количества композиции CFXTEN субъекту, нуждающемуся в этом. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения способ включает этап введения субъекту с кровотечением эффективного для свер-

тывания количества фармацевтической композиции, которая содержит CFXTEN, при том, что введение приводит к остановке или ослаблению кровотечения. Как используется в данном документе, "эффективное для свертывания количество" представляет собой количество композиции FVIII, которое, при введении субъекту, является достаточным для осуществления гемостаза или другого применимого или желаемого терапевтического (в том числе профилактического) результата. При практическом осуществлении настоящего изобретения, следует понимать, что эффективное для свертывания количество могут вводить одним или несколькими введениями. Точные эффективные для свертывания количества фармацевтической композиции для введения будет регулироваться согласно мнению врача, несмотря на это, однократная доза будет, как правило, зависеть от тяжести или причины кровотечения и количества предсуществующего FVIII у субъекта. В конкретном варианте осуществления способа лечения кровотечения, эффективное для свертывания количество фармацевтических композиций, которые содержат CFXTEN, вводят субъекту, страдающему от случайных кровотечений, при том, что введение приводит к регрессии кровотечения в течение времени по меньшей мере в два раза, или по меньшей мере в три раза, или по меньшей мере в четыре раза более продолжительного, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, и вводят аналогичному субъекту с аналогичным кровотечением в сопоставимой дозе.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения введение эффективного для свертывания количества композиции CFXTEN субъекту с заболеванием, связанным с фактором VIII, приводит к 10%, или 20%, или 30%, или 40%, или 50%, или 60%, или 70% или большему улучшению одного или нескольких биохимических, физиологических или клинических параметров заболевания, связанного с FVIII, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, при измерении между 2 и 7 днем после введения. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения введение эффективного для свертывания количества композиции CFXTEN субъекту, который нуждается в этом, приводит к улучшению одного или нескольких биохимических, физиологических или клинических параметров заболевания, связанного с FVIII, в течение периода, который по меньшей мере в два раза дольше, или по меньшей мере в четыре раза дольше, или по меньшей мере в пять раз дольше, или по меньшей мере в шесть раз более продолжительный, по сравнению с периодом, который достигают с помощью FVIII, не связанным с XTEN, и вводят в сопоставимой дозе. Неограничивающие примеры параметров, которые являются улучшенными на более продолжительных сроках, содержат концентрации в крови прокоагулянта FVIII, сниженное время анализа частичной тромбопластиновой активизации (aPTT), сниженное время одноэтапного или двухэтапного анализа коагулирующей активности, отложенное начало случая кровотечения, сниженное время хромогенного анализа FVIII, сниженное время кровотечения, среди других параметров, связанных с FVIII, известных в данной области техники. В предыдущих вариантах осуществления абзаца вводят CFXTEN, который содержит FVIII с по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с фактором VIII из табл. 1 и одну или несколько последовательностей XTEN с по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с XTEN из табл. 4, вводимых в FVIII в одной или нескольких локализациях, выбранных из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9, или, как проиллюстрировано на фиг. 8-9. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения по меньшей мере один инсерционный сайт XTEN CFXTEN выбирают из аминокислот 32, 220, 224, 336, 339, 390, 399, 416, 603, 1656, 1711, 1725, 1905 и 1910 (нумерация относительно зрелого природного FVIII человека).

В конкретном варианте осуществления способа лечения, эффективное для свертывания количество гибридного белка CFXTEN, которое вводят субъекту, страдающему от гемофилии A, является достаточным для того, чтобы повысить циркулирующую концентрацию прокоагулянта FVIII до более 0,05 МЕ/мл и для поддержания гемостаза в течение по меньшей мере около 24 ч, или по меньшей мере около 48 ч, или по меньшей мере около 72 ч, или по меньшей мере около 96 ч, или по меньшей мере около 120 ч, или по меньшей мере около 144 ч, или по меньшей мере около 168 ч, или более. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения введение эффективного для свертывания количества фармацевтической композиции, которая содержит CFXTEN, субъекту, который нуждается в этом, приводит к более значительному уменьшению времени одноэтапного анализа коагулирующей активности на по меньшей мере около 5%, или около 10%, или около 20%, или около 30%, или около 40%, или около 50%, или около 60%, или около 70%, или более в образце крови субъекта через 2-7 дней после введения, по сравнению с временем анализа у субъекта после введения аналогичного количества соответствующего FVIII, не связанного с XTEN. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения введение терапевтически эффективного количества CFXTEN или фармацевтических композиций, которые содержат CFXTEN, субъекту, который нуждается в этом, приводят к более значительному уменьшению время образования и активности протромбина на по меньшей мере около 5%, или около 10%, или около 20%, или около 30%, или около 40%, или около 50%, или около 60%, или около 70%, или более в образце крови субъекта спустя 2-7 дней после введения, по сравнению с временем образования и активности протромбина у субъекта после введения аналогичного количества соответствующего FVIII, не связанного с XTEN. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения введение CFXTEN или

фармацевтических композиций, которые содержат CFXTEN субъекту, который нуждается в этом, с использованием терапевтически эффективного количества, приводит к обеспечению времени образования и активности протромбина в пределах 30% нормы в образце крови субъекта в течение периода времени, которое является по меньшей мере в два раза, или по меньшей мере в около три раза, или по меньшей мере в около четыре раза более продолжительным, по сравнению с FVIII, который не связанный с XTEN, и вводят субъекту с использованием аналогичной дозы.

В отдельном варианте осуществления способа лечения, гибридный белок CFXTEN составляют и вводят в качестве фармацевтической композиции, которая содержит CFXTEN в примеси с фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом. Способы получения фармацевтических композиций хорошо известны в данной области техники. Способы и композиции, как правило, могут быть найдены в Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 1990 (Смотри, кроме того, Wang and Hanson, Parenteral Formulations of Proteins and Peptides: Stability and Stabilizers, Journal of Parenteral Science and Technology, Technical Report No. 10, Supp. 42-2S (1988)).

В дополнительных аспектах настоящее изобретение обеспечивает режим лечения пациента с гемофилией A, указанный режим которой содержит композицию, которая содержит гибридный белок CFXTEN. В отдельном варианте осуществления режима лечения пациент с гемофилией A, режим дополнительно включает этап определения количества фармацевтической композиции, которая содержит CFXTEN, необходимый для того, чтобы достигнуть состояния гемостаза у пациента. В отдельных вариантах осуществления режима, (i) меньшее количество ME фармацевтической композиции, которая содержит CFXTEN, в около два раза меньше, или в около три раза меньше, или в около четыре раза меньше, или в около пять раз меньше, или в около шесть раз меньше, или в около восемь раз меньше, или в около 10 раз меньше, вводят субъекту, который нуждается в этом, по сравнению с соответствующим фактором свертывания, не связанным с XTEN при другом подобном режиме дозирования, и гибридный белок достигает аналогичной площади под кривой (основываясь на ME/мл) и/или аналогичного терапевтического эффекта, как и соответствующий FVIII, не связанный с XTEN; (ii) фармацевтическую композицию вводят менее часто (например, каждые три дня, примерно каждые семь дней, примерно каждые 10 дней, примерно каждые 14 дней, примерно каждые 21 день, или почти ежемесячно), по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN, при другой подобной величине дозы, а гибридный белок достигает аналогичной площади под кривой и/или аналогичного терапевтического эффекта, как и соответствующий фактор свертывания, не связанный с XTEN; или (iii) вводят накапливающееся маньшее количество ME фармацевтической композиции на по меньшей мере около 20%, или около 30%, или около 40%, или около 50%, или около 60%, или около 70%, или около 80%, или около 90% меньше, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN, при другом подобном режим дозирования и гибридный белок CFXTEN достигает аналогичного терапевтического эффекта, как и соответствующий FVIII, не связанный с XTEN. Накапливающееся меньшее количество ME измеряют в течение периода по меньшей мере около одной недели, или около 14 дней, или около 21 день, или около одного месяца. В предыдущих вариантах осуществления настоящего изобретения терапевтический эффект могут определять с помощью любого из измеренных параметров, описанных в данном документе, которые содержат, но без ограничения ими, концентрацию в крови прокоагулянта FVIII, сниженное время анализа частичной тромбопластиновой активизации (aPTT), сниженное время одноэтапного или двухэтапного анализа коагулирующей активности, отложенное начало случая кровотечения, сниженное время хромогенного анализа FVIII, сниженное время кровотечения, разрешение эпизода кровотечения или снижение титра Бетезда CFXTEN по отношению к природному FVIII, уровни фибриногена или другие анализы, известные в данной области техники для оценивания коагулопатии FVIII. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает CFXTEN для использования в режиме лечения гемофилии у субъекта, который содержит введение композиция CFXTEN двумя или более последовательными дозами субъекту в эффективном количестве, при том, что введение приводит к по меньшей мере 10%, или 20%, или 30%, или 40%, или 50%, или 60%, или 70%, или 80%, или 90% выше улучшение по меньшей мере одного, двух или трех параметров, связанных с заболеванием, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, и вводят с использованием аналогичной дозы.

В отдельном аспекте, настоящее изобретение относится к способу профилактики или лечения кровотечения у пациента, необязательно, пациента с гемофилией A, которая имеет предсуществующий ингибитор(ы) против FVIII. Ингибирующие антитела против FVIII обычно развиваются у больных гемофилией, где средняя заболеваемость развития ингибитора составляет 15-30%, прежде всего у больных гемофилией, которые в значительной степени подвержены концентратам FVIII (Algiman et al. Natural antibodies to factor VIII (anti-hemophilic factor) in healthy individuals. PNAS USA (1992) 89: 3795-3799). Несмотря на это, ингибирующие антитела также наблюдаются у пациентов с аутоиммунными расстройствами, злокачественные новообразования (такие как лимфопролиферативные заболевания, лимфомы и солидные опухоли), во время беременности и в послеродовом состоянии. Ингибирование также может происходить, если антитела препятствуют связыванию FVIII с FIX и FX. В то же самое время или кроме того, анти-FVIII антитела могут препятствовать связыванию фактора фон Виллебранда и/или фосфолипидов с FVIII, влияющим на свертывание и/или время полужизни FVIII. Присутствие ингибирующих

антител часто впервые обнаруживают с симптомами, такими как легкий ушиб и неконтролируемое кровотечение, и обычно соответствуют приобретенной гемофилии. Анти-FVIII антитела могут определять с помощью различных способов, которые содержат количественное определение анти-FVIII активности в анализе коагулирующих активностей, ELISA в случае ингибиторов FVIII и очистке с использованием хроматографии и иммуноадсорбции (Algiman et al., 1992). Соответственно, при лечении или предотвращении любого заболевания, связанного с, или определенного с помощью присутствия ингибирующих антител к FVIII используют патентоспособные способы. В отдельном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения пациента, который имеет предсуществующий ингибитор против FVIII, способ которого включает этап введения пациенту эффективного для свертывания количества гибридного белка CFXTEN, который должны быть введен для того, чтобы достигнуть гемостаза, при том, что эффективное для свертывания количество вводимого гибридного белка уменьшают, по сравнению с количеством FVIII, не связанного с XTEN, (или природный FVIII), который должны быть введен для того, чтобы достигнуть гемостаза. В способе, сниженное количество CFXTEN составляет в около два раза, или в три раза, или в четыре раза, или в пять раз меньше в МЕ/кг, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN. В дополнительном варианте осуществления способа, количество CFXTEN, которое вводят в качестве дозы, для того, чтобы достигнуть гемостаза, составляет по меньшей мере на от 20 до 40 МЕ/кг меньше, или от 30 до 60 МЕ/кг меньше, или от 40 до 80 МЕ/кг меньше, или от 60 до 100 МЕ/кг меньше, или от 100 до 140 МЕ/кг меньше, или от 120 до 180 МЕ/кг меньше, или от 140 до 200 МЕ/кг меньше, по сравнению с соответствующим FVIII, не связанным с XTEN, или с природным FVIII, необходимым для того, чтобы достигнуть гемостаза. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения случая кровотечения у субъекта с гемофилией А, который имеет титр по меньшей мере 10, или 20, или 30, или 40, или 50, или 75, или 100, или 150, или 200 или более единиц Бетезда против FVIII, не связанного с XTEN, при том, что доза гибридного белка CFXTEN, необходимая для остановки эпизода кровотечения, является по меньшей мере в два раза, или в три раза, или в четыре раза, или в пять раз, или в шесть раз, или в семь раз, или в восемь раз, или в девять раз, или в 10 раз меньше, по сравнению с количеством FVIII, не связанным с XTEN, (или природным FVIII), который должны были вводить для того, чтобы достигнуть состояния гемостаза у аналогичного субъекта. Любому специалисту в данной области техники будет понятно, что количество прокоагулянта, вводимого для поддержания гемостаза, будет зависеть от тяжести дефицита FVIII и/или частоты или продолжительности кровотечения.

Отчасти цель настоящего изобретения относится к использованию CFXTEN со сниженным связыванием ингибиторами FVIII, которые связывают домены A2 и/или C2 фактора VIII, в качестве лекарственного средства. Подобное лекарственное средство преимущественно используют для поддержания гемостаза у пациента, страдающего от гемофилии, при том, что подобный пациент имеет циркулирующие ингибиторы FVIII, направленные против домена A2 и/или домена C2 фактора VIII. В отдельном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения, способ которого включает этап введения пациенту с домен A2-связывающим ингибитором эффективного для свертывания количества гибридного белка CFXTEN, при том, что CFXTEN проявляет по меньшей мере 10%, или 20%, или 30%, или 40%, или 50%, или 60%, или 70%, или 80% или меньше связывания с ингибитором, который связывает домен A2 FVIII, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, или с природным FVIII, и при том, что введение приводит к гемостазу. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения, способ которого включает этап введения пациенту с домен C2-связывающим ингибитором эффективного для свертывания количества гибридного белка CFXTEN, при том, что CFXTEN проявляет по меньшей мере 10%, или 20%, или 30%, или 40%, или 50%, или 60%, или 70%, или 80% или меньше связывания с ингибитором, который связывает домен C2 FVIII, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN, или с природным FVIII, и при том, что введение приводит к гемостазу. Сниженное связывание субъекта CFXTEN могут анализировать непосредственно с помощью ELISA, который детектирует ингибиторы FVIII, или измеряет косвенно с помощью демонстрации сниженной активности ингибирования FVIII CFXTEN, по сравнению с природным FVIII в присутствии ингибитора, как измерено с помощью хромогенного теста на фактор VIII или одноэтапного анализа, как описано в данном документе, или других подходящих способов свертывания, известных в данной области техники. Кроме того, субъект CFXTEN может быть измерен на сниженное (или его отсутствие) ингибирование в присутствии известных ингибиторов с помощью использования измененного Бетезда-анализа. В соответствии с конкретным аспектом настоящего изобретения, CFXTEN, используемый в способах, имеет сниженную реактивность по отношению к одному или нескольким антителам из табл. 10, а также встречающимся в природе антителам, которые присутствуют у пациентов с гемофилией. Для целей тестирования, подобные и отличные ингибирующие антитела могут быть получены от людей (напр. из сыворотки пациентов, которые имеют ингибирующие антитела) или могут быть получены от мышей, морских свинок, лошадей, коз, приматов и других млекопитающих путем иммунизации FVIII, или его фрагментов, в частности, с фрагментом, содержащим все или часть домена A2 или C2, будь то в поликлональной или моноклональной форме.

Настоящее изобретение дополнительно предполагает, что CFXTEN, которые используют в соответ-

ствии со способами, которые обеспечивают в данном документе, могут вводить в сочетании с другими способами лечения и композициями (например, другими протеинами свертывания), используемыми для лечения заболеваний, связанных с фактором VIII, или заболевания, в случае которого фактор свертывания является вспомогательной терапией; например, случаи кровотечения в связи с травмой или хирургическим вмешательством.

В дополнительных аспектах настоящее изобретение обеспечивает способы получения лекарственного средства в случае заболевания, связанного с фактором VIII, который содержит комбинирование последовательности фактора VIII, выбранной из табл. 1, с одним или несколькими XTEN, выбранными из табл. 4, вводимые в один или несколько инсерционных сайтов, выбранных из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9 для того, что приводит к лекарственному средству, которое сохраняет по меньшей мере часть активности природного FVIII. Настоящее изобретение обеспечивает способ получения фармацевтической композиции, который включает этап комбинирования лекарственного средства вышеуказанного варианта осуществления с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым носителем. В отдельном варианте осуществления способа получения лекарственного средства в случае заболевания, связанного с фактором VIII, фактор VIII имеет последовательность с по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности, по сравнению с последовательностью, выбранной из табл. 1 и один или несколько XTEN имеют последовательность с по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности, по сравнению с последовательностью, выбранной из любой из табл. 3, 4 и 13-17, или ее фрагментом, при том, что один или несколько XTEN вводят в одну или несколько локализаций, выбранных из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9. В конкретном варианте осуществления вышеуказанного, по меньшей мере один инсерционный сайт XTEN выбирают из аминокислот 32, 220, 224, 336, 339, 390, 399, 416, 603, 1656, 1711, 1725, 1905 и 1910 (нумерация относительно зрелого природного FVIII человека). В дополнительном варианте осуществления способа CFXTEN содержит последовательность с по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности, по сравнению с последовательностью, выбранной из любой из табл. 21.

В дополнительных аспектах настоящее изобретение обеспечивает способ получения композиции CFXTEN для того, чтобы достигнуть нужные фармакокинетические, фармакологические или фармацевтические свойства. В общем, этапы строения и получение патентоспособных композиций гибридного белка, как проиллюстрировано на фиг. 11-13, содержат: (1) выбор FVIII (например, природные протеины, последовательности из табл. 1, аналоги или производные с активностью) для лечения конкретного заболевания; (2) выбор одного или нескольких XTEN (например, последовательностей с по меньшей мере 80% идентичности с последовательностями, приведенными в табл. 4) что будет придавать нужные фармакокинетические и физико-химические характеристики получаемым CFXTEN (например, введение композиции CFXTEN субъекту приводит к тому, что гибридный белок поддерживают выше 0,05-0,4 МЕ/мл в течение более продолжительного периода, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN); (3) установление нужной конформации от N- до С-конца CFXTEN для того, чтобы достигнуть нужной эффективности или параметров PK (например, выбор одного или нескольких инсерционных сайтов из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9); (4) установление строения экспрессирующего вектора, который кодирует сконфигурированный CFXTEN; (5) трансформирование подходящего хозяина с экспрессирующим вектором; и (6) экспрессирование и извлечение полученного изолированного гибридного белка CFXTEN. В отдельном варианте осуществления способа получения CFXTEN, XTEN для вставки оценивают с применением Уравнения IV, для того, чтобы максимилизировать отношение радиусов XTEN в случае конструкции гибридного белка, с XTEN, в результате чего значения, превышающие 2,0, или 2,1, или 2,2, или 2,3, или 2,4, или 2,5, или 2,6, или 2,7, или 2,8, или 2,9. или 3,0 являются предпочтительными. Для тех CFXTEN, в случае которых повышение времени полужизни или увеличение периода времени, проведенного выше минимальной эффективной для свертывания концентрации, является желательными, XTEN, выбранный для включения, как правило имеет по меньшей мере около 144, или около 288, или около 432, или около 576, или около 864, или около 875, или около 912, или около 923 аминокислотных остатков, при условии, что уникальный XTEN является встроенным в CFXTEN. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN содержит первый XTEN вышеуказанной длины, и по меньшей мере второй XTEN из около 36, или около 42, или около 72, или около 144, или около 288, или около 576, или около 864, или около 875, или около 912, или около 923, или около 1000 или более аминокислотных остатков. Расположение XTEN в пределах гибридного белка может содержать одну, две, три, четыре, пять или более локализаций, выбранных из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9 или фиг. 8-9. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения способ строения включает вставку XTEN в FVIII в по меньшей мере одном сайте, выбранном из аминокислот 32, 220, 224, 336, 339, 390, 399, 416, 603, 1656, 1711, 1725, 1905 и 1910 (нумерация относительно зрелого природного FVIII человека).

В дополнительных аспектах настоящее изобретение обеспечивает способы получения композиции CFXTEN для улучшения легкости изготовления, которые приводят к увеличенной стабильности, увеличенной растворимости в воде и/или удобству композиции, по сравнению с природным FVIII. В отдельном варианте осуществления настоящее изобретение содержит способ увеличения растворимости в воде FVIII, который включает этап связывания FVIII с по меньшей мере около 80%, или около 90%, или около 95% идентичности с последовательностью из табл. 1 к одному или нескольким XTEN в одной, двух, трех, четырех, пяти или более локализациях, выбранных из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9 или фиг. 8-9, при том, что XTEN представляет собой последовательность с по меньшей мере около 80%, или около 90%, или около 95% идентичности последовательности, по сравнению с последовательностью из любой из табл. 3, 4 и 13-17, так что могут достигать более высокой концентрации в растворимой форме получаемых CFXTEN, при физиологических условиях, по сравнению с FVIII в неслитом состоянии. В конкретном варианте осуществления CFXTEN содержит FVIII, связанный с двумя, тремя, четырьмя или пятью XTEN, которые имеют по меньшей мере около 24, или около 36, или около 48, или около 60, или около 72, или около 84, или около 96, или около 144, или около 288 аминокислотных остатков, вводимых в пределах сайтов, выбранных из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9 или фиг. 8-9, в которых растворимость гибридного белка при физиологических условиях составляет по меньшей мере в три раза выше соответствующего FVIII, не связанного с XTEN, или, кроме того, по меньшей мере в четыре раза, или в пять раз, или в шесть раз, или в семь раз, или в восемь раз, или в девять раз, или по меньшей мере в 10 раз, или по меньшей мере в 20 раз, или по меньшей мере в 30 раз, или по меньшей мере в 50 раз, или по меньшей мере в 60 или более раз больше FVIII, не связанного с XTEN. Факторы, способствующие свойству XTEN придавать увеличенную растворимость CF в воде, при включении в гибридный белок, содержат высокую растворимость слитого партнера XTEN и низкую степень самоагрегатирования между молекулами XTEN в растворе, а также расширение гидрофильности внешних петель FVIII, в которые вносят XTEN. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения способ приводит к гибридному белку CFXTEN, при том, что растворимость в воде составляет по меньшей мере на около 20%, или по меньшей мере на около 30% больше, или по меньшей мере на около 50% больше, или по меньшей мере на около 75% больше, или по меньшей мере на около 90% больше, или по меньшей мере на около 100% больше, или по меньшей мере на около 150% больше, или по меньшей мере на около 200% больше, или по меньшей мере на около 400% больше, или по меньшей мере на около 600% больше, или по меньшей мере на около 800% больше, или по меньшей мере на около 1000% больше, или по меньшей мере на около 2000% выше при физиологических условиях, по сравнению с не-слитым FVIII. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения XTEN гибридного белка CFXTEN представляет собой последовательность с по меньшей мере около 80%, или около 90%, или около 95% идентичности последовательности, по сравнению с последовательностью из любой из табл. 3, 4 и 13-17. В дополнительном варианте осуществления настоящее изобретение содержит способ увеличения срока хранения FVIII, который включает этап связывания FVIII с одним или несколькими XTEN в одном или нескольких сайтах, выбранных из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9, при том, что срок хранения получаемых CFXTEN расширяют, по сравнению с FVIII в неслитом состоянии. Как используется в данном документе, срок хранения соответствует периоду времени, за который прокоагулянтная активность FVIII или CFXTEN, который находится в растворе, в лиофилизированной или в какой-либо другой композиции для хранения остается стабильным без чрезмерных потерь активности или активность остается в пределах спецификаций для выпуска, установленных для выпуска фармацевтической композиции. FVIII, который деградирует или агрегируется, как правило, имеет сниженную функциональную активность или сниженную биодоступность, по сравнению с тем, который остается в растворе. Факторы, которые стимулируют возможность способа увеличивать срок годности FVIII, при включении в гибридный белок, содержат увеличенную растворимость в воде, сниженное самоагрегатирование в растворе и увеличенную термостойкость слитого партнера XTEN. В частности, низкая склонность XTEN агрегировать облегчает способы составления фармацевтических составов, которые содержат более высокие концентрации лекарственного средства CF, и термостойкость XTEN способствует свойству гибридных белков CFXTEN оставаться растворимыми и функционально активными в течение длительного периода времени. Способ приводит к гибридным белкам CFXTEN с пролонгированным или расширенным сроком хранения, которые проявляют более высокую активность по отношению к стандарту FVIII, который подвергается тем же условиям хранения и обращения. Стандарт может быть не-слитым непроцессированным FVIII или коммерчески доступной фармацевтической композицией FVIII. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения способ включает этап составления изолированного CFXTEN с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, которые повышают способность XTEN сохранять его неструктурированную конформацию и CFXTEN оставаться растворимым в композиции в течение времени, которое больше, чем в случае соответствующего не-слитого FVIII. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения способ включает связывание FVIII, выбранного из табл. 1 с одним или несколькими XTEN, выбранными из любой из табл. 3, 4 и 13-17, вводимыми в одном или нескольких сайтах, выбранных из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9 и примешивание с по меньшей мере одним фармацевтически приемлемым вспомогательным веществом для создания фармацевтической

композиции, которая сохраняет более около 100% прокоагулянтной активности, или более около 105, 110, 120, 130, 150 или 200% прокоагулянтной активности стандарта FVIII, который подвергается такому же условию хранения и обращения, при сравнении в момент времени по меньшей мере 90 дней, или по меньшей мере 6 месяцев, или по меньшей мере 12 месяцев. Срок хранения может также оцениваться в терминах функциональной активности, оставшейся после хранения, нормализованной к функциональной активности в начале хранения. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения фармацевтические композиции CFXTEN настоящего изобретения сохраняют более около 50% прокоагулянтной активности, или около 60, 70, 80 или более 90% прокоагулянтной активности стандарта FVIII при воздействии на тех же условиях на тот же период до 2 недель, или 4 недель, или 6 недель или более продолжительный при различных температурных условиях. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция CFXTEN сохраняет по меньшей мере около 50%, или около 60%, или по меньшей мере около 70%, или по меньшей мере около 80%, и, более предпочтительно, по меньшей мере около 90% или более его исходной активности в растворе при нагревании до 80°C в течение 10 мин. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция CFXTEN сохраняет по меньшей мере около 50%, предпочтительно, по меньшей мере около 60%, или по меньшей мере около 70%, или по меньшей мере около 80%, или, альтернативно, по меньшей мере около 90% или более его исходной активности в растворе при нагревании или поддерживании при 37°C в течение около 7 дней. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция CFXTEN сохраняет по меньшей мере около 80% или более его функциональной активности после воздействия температуры от около 30°C до около 70°C за период времени от около 1 до около 18 ч. В предыдущих вариантах осуществления настоящего изобретения, описанных выше в этом абзаце, сохраненная активность фармацевтических композиций CFXTEN в данный момент времени является по меньшей мере в около два раза, или по меньшей мере в около три раза, или по меньшей мере в около четыре раза, или по меньшей мере в около пять раз, или по меньшей мере в около шесть раз выше, чем соответствующая фармацевтическая композиция, которая содержит FVIII, не связанный с XTEN.

Нуклеотидные последовательности по настоящему изобретению

Настоящее изобретение обеспечивает изолированные полинуклеотиды, которые кодируют слитые гибридные белки CFXTEN и последовательности, комплементарные полинуклеотидным молекулам, кодирующим слитые гибридные белки CFXTEN, которые содержат их гомологичные варианты. В дополнительных аспектах настоящее изобретение охватывает способы получения полинуклеотидов, кодирующих слитые гибридные белки CFXTEN и последовательности, комплементарные полинуклеотидным молекулам, кодирующим слитый гибридный белок CFXTEN, который содержит их гомологичные варианты. В общем, и, как проиллюстрировано на фиг. 11-13, способы получения полинуклеотидной последовательности, кодирующей гибридный белок CFXTEN и экспрессирующий получаемый продукт гена, включают формирование нуклеиновых кислот, кодирующих FVIII и XTEN, лигирование компонентов в рамке, инкорпорирование кодирующего гена в экспрессирующий вектор, соответствующий клетке-хозяину, трансформацию соответствующей клетки-хозяина с экспрессирующим вектором и культивирование клетки-хозяина в условиях, вызывающих или позволяющих гибридному белку экспрессироваться в трансформированной клетке-хозяине, тем самым получая биологически-активный полипептид CFXTEN, который восстанавливают в качестве изолированного гибридного белка с помощью стандартных способов очистки протеина, известных в данной области техники. Стандартные рекомбинантные способы молекулярной биологии используют для создания полинуклеотидов и экспрессирующих векторов по настоящему изобретению.

В соответствии с настоящим изобретением, нуклеотидные последовательности, которые кодируют CFXTEN (или его комплемент), используют для генерирования рекомбинантных молекул DNA, которые направляют экспрессию гибридных белков CFXTEN в соответствующих клетках-хозяевах. Для целей настоящего изобретения нуклеотид кодирует сигнальную последовательность, соответствующую природному FVIII человека (кодирует MQIELSTCFFLCLLRFCFS (SEQ ID NO: 1611)), добавляют к любой из кодирующих конструкций, описанных в данном документе, чтобы помочь в экспрессии и секретировании гибридного белка CFXTEN. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения дополнительный нуклеотид представляет собой ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGT (SEQ ID NO: 1613) или комплементарную ей последовательность.

Некоторые стратегии клонирования являются подходящими для выполнения настоящего изобретения, многие из которых используют для генерирования конструкции, которая содержит ген, кодирующий гибридный белок композиции CFXTEN по настоящему изобретению, или его комплемент. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения стратегию клонирования используют для создания гена, который кодирует мономерный CFXTEN, содержащий по меньшей мере первый FVIII и по меньшей мере первый XTEN полипептид, или их комплемент. В отдельном варианте осуществления вышеизложенного, ген содержит последовательность, кодирующую FVIII, или вариант последовательности. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения стратегию клонирования использу-

ют для создания гена, который кодирует мономерный CFXTEN, содержащий нуклеиновые кислоты, который кодирует по меньшей мере первую молекулу FVIII или ее комплемент, и первый и по меньшей мере второй XTEN, или их комплемент, который используют для трансформирования клетки-хозяина для экспрессии гибридного белка композиций CFXTEN. В предыдущих вариантах осуществления настоящего изобретения, описанных выше в этом абзаце, гены могут дополнительно содержать нуклеиновые кислоты, кодирующие спейсерные последовательности, которые также кодируют последовательность(и) расщепления.

При создании нужных последовательностей XTEN было обнаружено, что неповторяющуюся природу XTEN патентоспособных композиций достигают не смотря на использование при создании XTEN-кодирующих последовательностей молекулярного подход к "компоновке из унифицированных блоков". Это было достигнуто за счет использования библиотеки полинуклеотидов, кодирующих последовательности пептидных мотивов, описанных выше, которые затем лигируют и/или мультимеризируют для создания генов, кодирующих последовательности XTEN (см. фиг. 11 и 12 и Примеры). Таким образом, если XTEN экспрессируемого гибридного белка может состоять из нескольких единиц лишь четырех различных мотивов последовательности, потому что сами мотивы состоят из неповторяющихся аминокислотных последовательностей, в целом, последовательность XTEN оказывается неповторяющейся. Соответственно, в отдельном варианте осуществления настоящего изобретения XTEN-кодирующие полинуклеотиды составляют несколько полинуклеотидов, которые кодируют неповторяющиеся последовательности, или мотивы, функционально связанные во фрейм, в которых получаемые экспрессируемые аминокислотные последовательности XTEN не являются повторяющимися.

В отдельном подходе, первой получают конструкцию, которая содержит последовательность DNA, соответствующую гибридному белку CFXTEN. DNA, кодирующая FVIII композиций, полученная синтетически, из коммерческого источника, или из библиотеки cDNA, полученная с использованием стандартных способов из ткани или изолированных клеток, как полагают, для сохранения mRNA FVIII и для экспрессирования ее на обнаруживаемом уровне. При необходимости, кодирующая последовательность может быть получена с использованием обычных процедур удлинения праймера, как описано в Sambrook, et al., supra, для обнаружения предшественников и обработки промежуточных соединений mRNA, которые могут не быть обратнотранскрибируемыми в cDNA. В этом случае можно использовать методику полимеразной цепной реакции (PCR) для амплификации целевой DNA или RNA, кодирующей последовательности для получения достаточного материала для получения конструкций CFXTEN, которые содержат ген FVIII. Анализы могут быть проведены для того, чтобы подтвердить, что гибридизированные непроцессированные гены являются нужным геном(ами) FVIII. С помощью этих стандартных способов DNA может быть легко получена из библиотеки cDNA, полученной из подобных источников. FVIII кодирующий ген(ы) также могут быть созданы с помощью стандартных синтетических способов, известных в данной области техники (например, автоматического синтеза нуклеиновой кислоты с использованием, например, одного из методов, описанных у Engels et al. (Agnew. Chem. Int. Ed. Engl., 28:716-734 1989)), с использованием последовательностей DNA, полученных из общедоступных баз данных, патентов или литературных источников. Такие процедуры хорошо известны в данной области техники и хорошо описаны в научной и патентной литературе. Например, последовательности могут быть получены из Chemical Abstracts Services (CAS) Registry Numbers (опубликованные American Chemical Society) и/или идентификаторы Model Protein GenBank Accession Numbers (например, Locus ID, NP_XXXXX и XP_XXXXX), доступные на интернет-сайте National Center for Biotechnology Information (NCBI), доступные в интернете на ncbi.nlm.nih.gov, что соответствует записям в реестре CAS Registry или базе данных GenBank, которые содержат аминокислотную последовательность белка, представляющего интерес, или фрагмента, или варианта белка. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения FVIII кодирует ген, кодирующий белковую последовательность из табл. 1, или его фрагмент или вариант.

Ген или полинуклеотид, кодирующий часть протеина FVIIIa CFXTEN субъекта, в случае экспрессированного гибридного белка, который содержит уникальный FVIII, затем клонируют в конструкцию, которая представляет собой плазмиду или другой вектор под контролем соответствующих последовательностей транскрипции и трансляции в случае высокого уровня экспрессии белка в биологической системе. В более поздней стадии, второй ген или полинуклеотид, кодирующий XTEN, генетически слит с нуклеотидами, кодирующими N- и/или C-конец гена FVIII путем клонирования его в конструкции по соседству и во фрейм с геном(ами), кодирующим FVIII. Этот второй этап происходит через этап лигирования или мультимеризации. В предыдущих вариантах осуществления настоящего изобретения, описанных выше в этом абзаце, следует понимать, что создаваемые генные конструкции могут быть альтернативно дополнены соответствующими генами, которые кодируют соответствующие белки слияния.

Ген, кодирующий XTEN, может быть создан в один или несколько этапов, либо полностью синтетически, либо путем синтеза в сочетании с ферментативными процессами, такими как рестрикционное ферментоопосредованное клонирование, PCR и PCR с перекрывающимися праймерами, которые содержат способы, более полно описанные в примерах. Способы, раскрытые в данном документе, могут быть использованы, например, для лигирования коротких последовательностей полинуклеотидов, кодирую-

щих XTEN в более длинные гены XTEN необходимой длины и последовательности. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения способ лигирует два или более олигонуклеотида с оптимизированным кодоном, кодирующим мотив XTEN или сегмент последовательности из около от 9 до 14 аминокислот, или около от 12 до 20 аминокислот, или около от 18 до 42 аминокислот, или около от 42 до около 144 аминокислот, или около 144 до около 288 аминокислот, или от 288 до около 864 аминокислоты или больше, или любую комбинацию вышеуказанных диапазонов мотива или длин сегмента.

Кроме того, раскрытый способ используют для мультимеризации XTEN-кодирующих последовательностей в более длинные последовательности необходимой длины; например, ген, кодирующий 36 аминокислот XTEN может быть димеризован в ген, кодирующий 72 аминокислот, затем 144, затем 288, и т.д. Даже с мультимеризацией, полипептиды XTEN могут быть построены так, что XTEN-кодирующий ген имеет редко повторяющееся или практически не повторяющееся строение кодонов, выбранных для используемой мотивов самой короткой единицы, которая может снизить рекомбинацию и повысить стабильность кодируемого гена в трансформированном хозяине.

Гены, кодирующие XTEN, с неповторяющимися последовательностями, собирают из олигонуклеотидов с использованием стандартных способов синтеза гена. Строение гена могут выполнять с использованием алгоритмов, которые оптимизируют с использованием кодона и аминокислотной композиции. В отдельном способе по настоящему изобретению создают библиотеку относительно коротких XTEN-кодирующих полинуклеотидных конструкций, а затем собирают, как описано выше. Получаемые гены затем собирают с генами, кодирующими FVIII или области FVIII, как проиллюстрировано на фиг. 11 и 12, а получаемые гены используют для трансформирования клетки-хозяина и получения и восстановления CFXTEN для оценки его свойств, как описано в данном документе.

В дополнительных аспектах настоящее изобретение обеспечивает изолированные нуклеотиды, которые содержат полинуклеотидную последовательность, кодирующую варианты осуществления гибридного белка CFXTEN, описанного в данном документе. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения изолированный нуклеотид содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из (a) последовательности, которая имеет по меньшей мере около 80% идентичности последовательности, или 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%, до около 100% идентичности последовательности, по сравнению с последовательностью сопоставимой длины, выбранной из табл. 21, при оптимальном выравнивании, или (b) комплемента полинуклеотида (a). В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения изолированный нуклеотид содержит последовательность ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGT (SEQ ID NO: 1613), связанную с 5' концом нуклеотида (a) или комплемент последовательности, связанный с 3' концом (b).

Полинуклеотидные библиотеки.

В дополнительных аспектах настоящее изобретение обеспечивает библиотеки полинуклеотидов, которые кодируют последовательности XTEN, используемые для сборки генов, которые кодируют XTEN необходимой длины и последовательности. В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения конструкции XTEN-кодирующих библиотек содержат полинуклеотиды, которые кодируют полипептидные сегменты определенной длины. В качестве первого шага, могут собирать библиотеку олигонуклеотидов, которая кодируют мотивы из 9-14 аминокислотных остатков. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения собирают библиотеки олигонуклеотидов, которые кодируют мотивы из 12 аминокислот.

Сегменты XTEN-кодирующей последовательности могут быть димеризованы или мультимеризированы в более длинных кодирующих последовательностях, как схематически проиллюстрировано на фиг. 13. Димеризацию или мультимеризацию могут осуществлять с помощью лигирования, PCR с перекрывающимися праймерами, PCR-сборки или схожими способами клонирования, известными в данной области техники. Этот процесс может быть повторен несколько раз, пока получаемые XTEN-кодирующие последовательности достигнут организации последовательности и нужной длины, обеспечивая XTEN-кодирующие гены. Как будет понятно, библиотека полинуклеотидов, которые кодируют, например, 12 аминокислотные мотивы, может быть димеризована и/или лигирована в библиотеку полинуклеотидов, которые кодируют 36 аминокислот. Библиотеки кодируют мотивы различных длин; например, 9-14 аминокислотные мотивы ведут к библиотекам, кодирующим от 27 до 42 аминокислот, как предполагается настоящим изобретением. В свою очередь, библиотека полинуклеотидов, которые кодируют от 27 до 42 аминокислот, и предпочтительно 36 аминокислот (как описано в примерах) может быть последовательно димеризована в библиотеку, которая содержит последовательно большие длины полинуклеотидов, которые кодируют последовательности XTEN необходимой длины, для включения в ген, кодирующий гибридный белок CFXTEN, как раскрыто в данном документе.

Более эффективный способ оптимизации последовательности DNA, кодирующей XTEN основывают на комбинаторных библиотеках. Ген, кодирующий XTEN может быть построен и синтезирован в сегменте так, что получают несколько вариантов кодона для каждого сегмента. Эти сегменты могут быть произвольно объединены в библиотеки генов, таких, что каждый член библиотеки кодирует одни и те же аминокислотные последовательности, но члены библиотеки содержат в себе большое количество вари-

антов кодонов. Такие библиотеки могут быть подвергнуты скринингу на гены, которые приводят к высокоуровневой экспрессия и/или низкой численности продуктов процессинга. Способ сборки гибридного гена проиллюстрирован на фиг. 18. Гены на фиг. 18 собирают из 6 основных фрагментов и каждый фрагмент доступен в 4 различных вариантах кодона. Это приводит к теоретическому разнообразию 4096.

В отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения библиотеки собраны из полинуклеотидов, которые кодируют аминокислоты, ограниченные в специфической последовательности семейства XTEN; например, последовательности AD, AE, AF, AG, AM или AQ из табл. 4. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения библиотеки содержат последовательности, которые кодируют два или более мотива семейства последовательностей из табл. 3. названия и последовательности репрезентативных, неограничивающих полинуклеотидных последовательностей из библиотек, которые кодируют 36-меры, представлены в табл. 13-17, а способы, используемые для их создания, более подробно описаны в соответствующих примерах. В дополнительных вариантах осуществления настоящего изобретения библиотеки, которые кодируют XTEN, строят из сегментов полинуклеотидных кодонов, связанных в рандомизированной последовательностью, которая кодируют аминокислоты, при том, что по меньшей мере около 80%, или по меньшей мере около 90%, или по меньшей мере около 91%, или по меньшей мере около 92%, или по меньшей мере около 93%, или по меньшей мере около 94%, или по меньшей мере около 95%, или по меньшей мере около 97%, или по меньшей мере около 98%, или по меньшей мере около 99% кодонов выбирают из группы, которая состоит из кодонов в случае аминокислот глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P). Библиотеки могут быть использованы, в свою очередь, для серийной димеризации или лигирования, для того, чтобы достигнуть библиотеки полинуклеотидных последовательностей, которые кодируют последовательности XTEN, например, из 42, 48, 72, 144, 288, 576, 864, 875, 912, 923, 1318 аминокислот, или до общей длины около 3000 аминокислот, а также промежуточных длин, в которых кодируемый XTEN может иметь одно или несколько свойств, раскрытых в данном документе, если экспрессируют в качестве компонента гибридного белка CFXTEN. В отдельных случаях, полинуклеотидные последовательности библиотеки могут также содержать дополнительные основания, используемые в качестве "островков секвенирования", описанных ниже более полно.

Фиг. 14 представляет собой принципиальную блок-схему репрезентативных, неограничивающих этапов сборки конструкции полинуклеотида XTEN и конструкции полинуклеотида CFXTEN в вариантах осуществления настоящего изобретения. Отдельные олигонуклеотиды 501 ренатурируют в мотивы последовательности 502, такие как 12 аминокислотный мотив ("12-мер"), который лигируют до дополнительных мотивов последовательности из библиотеки для создания пула, который охватывает нужную длину XTEN 504, а также лигируют в меньшей концентрации олигосодержащего BbsI и сайтов рестрикции KpnI 503. Получаемый пул продуктов лигирования очищают на геле и обрезают бэнд с нужной длиной XTEN, что приводит к изолированному гену XTEN с последовательностью-стоппером 505. Ген XTEN клонируют в спейсерный вектор. В данном случае, вектор кодирует дополнительную последовательность CBD 506 и ген GFP 508. Расщепление затем осуществляют с BbsI/HindIII, для удаления 507 и 508 и размещения стоп-кодон. Получаемый продукт затем клонируют в расщепляемый вектор BsaI/HindIII, который содержит ген, кодирующий FVIII, что приводит к гену 500, кодирующему гибридный белок FVIII-XTEN.

Можно клонировать библиотеку XTEN-кодирующих генов в один или несколько экспрессирующих векторов, известных в данной области техники. Для облегчения идентификации хорошо-экспрессирующихся членов библиотеки, можно построить библиотеку в виде слияния с репортерным протеином. Неограничивающие примеры подходящих репортерных генов представляют собой зеленый флуоресцентный белок, люциферазу, щелочную фосфатазу и бета-галактозидазу. С помощью скрининга, можно идентифицировать короткие последовательности XTEN, которые могут быть экспрессированы в высокой концентрации в предпочтительном организме-хозяине. Впоследствии, можно генерировать библиотеку случайных димеров XTEN и повторить тест на высокий уровень экспрессии. Впоследствии, можно проверить получаемые конструкции на ряд свойств, таких как уровень экспрессии, стабильность протеазы или связывание с сывороткой.

В одном из аспектов настоящего изобретения обеспечивает полинуклеотидные последовательности, кодирующие компоненты гибридного белка, при том, что создание последовательности претерпевает оптимизирование кодона. Конкретной интерес представляет оптимизирование кодона с целью повышения экспрессии полипептидных композиций и для улучшения генетической стабильности кодирующего гена в организмах-источниках. Например, оптимизирование кодона имеет особое значение для последовательностей XTEN, которые богаты глицином или которые имеют очень повторяющиеся аминокислотные последовательности. Оптимизирование кодона осуществляют с использованием компьютерных программ (Gustafsson, C., et al. (2004) Trends Biotechnol, 22: 346-53), некоторые из которых минимизируют рибосомальную паузу (Coda Genomics Inc.). В одном варианте осуществления настоящего изобретения возможно выполнять оптимизацию кодонов путем построения библиотеки кодонов, при условии, что все члены библиотеки кодируют ту же самую аминокислотную последовательность, но там, где использование кодонов изменяется. Такие библиотеки могут быть подвергнуты скринингу на высокую экспрессию

и генетически стабильные члены, которые особенно подходят для крупномасштабного производства XTEN-содержащих продуктов. При создании последовательностей XTEN можно рассмотреть ряд свойств. Можно минимизировать повторяемость в кодирующих DNA последовательностей. Кроме того, можно избежать или минимизировать использование кодонов, которые редко используются организмом-источником (например, кодоны аргинина AGG и AGA и кодон лейцина в E. coli). В случае E. coli, два кодона глицина, GGA и GGG, редко используют в высоко экспрессированных протеинах. Таким образом, оптимизирование кодона гена, кодирующего последовательности XTEN, может быть очень желательным. Последовательности DNA, которые имеют высокий уровень глицина, что приводит к высокому содержанию GC, который может привести к нестабильности или низким уровням экспрессии. Таким образом, если это возможно, то предпочтительно выбирать кодоны таким образом, чтобы содержание GC в XTEN-кодирующей последовательности подходило организму получения, который будет использоваться для изготовления XTEN.

В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения библиотеки полинуклеотидов строят с использованием раскрытых способов, при том, что все члены библиотеки кодируют одинаковую аминокислотную последовательность, но там, где использование кодонов для соответствующих аминокислот в последовательности изменяют или оптимизируют для предполагаемой клетки-хозяина. Такие библиотеки могут быть подвергнуты скринингу на высокую экспрессию и генетически стабильные члены, которые особенно подходят для крупномасштабного производства XTEN-содержащих продуктов. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения библиотеки оптимизируют для экспрессии в эукариотической клетке-хозяине.

При желании, можно упорядочить клоны в библиотеке, для того, чтобы устранить изоляты, которые содержат нежелательные последовательности. Исходная библиотека коротких последовательностей XTEN допускает некоторое изменение в аминокислотной последовательности. Например, можно рандомизировать отдельные кодоны, так, что количество гидрофильных аминокислот может наблюдаться в конкретном положении. В процессе итеративной мультимеризации, возможно экранировать полученные члены библиотеки для других характеристик, таких как растворимость или устойчивость к протеазе, в дополнение к тесту на высокоуровневую экспрессию.

После того, как выбран ген, кодирующий XTEN, необходимой длины и свойств, он генетически слит в нужном месте на нуклеотидах, кодирующих ген(ы) FVIII(s) с помощью клонирования его в конструкцию по соседству и во фрейме с геном, кодирующим FVIII, или, альтернативно, между нуклеиновыми кислотами, кодирующими соседние домены FVIII, или, альтернативно, в пределах последовательности, кодирующей данный домен FVIII, или, альтернативно, во фрейме с нуклеиновыми кислотами, кодирующими спейсер/последовательность расщепления, связанную с концевой XTEN. Настоящее изобретение обеспечивает различные пермутации вышеуказанного, в зависимости от CFXTEN, который должен быть закодирован. Например, ген, кодирующий гибридный белок CFXTEN, который содержит FVIII и два XTEN, такие как отображены в формуле VI, как показано выше, ген будет иметь полинуклеотиды, кодирующие FVIII, кодирующие два XTEN, которые могут быть идентичными или различными в композиции и длине последовательности. В отдельном неограничивающем варианте осуществления вышеуказанного, полинуклеотиды FVIII могут кодировать фактор VIII и полинуклеотиды, кодирующие С-конец, XTEN может кодировать XTEN из 288 аминокислот и полинуклеотиды, кодирующие внутренний XTEN, соседний к С-концу домена A2 может кодировать XTEN из 144 аминокислот. Этап клонирования генов FVIII в конструкцию XTEN могут происходить через этап лигирования или мультимеризация, как показано на фиг. 14. Конструкции, кодирующие гибридные белки CFXTEN, могут быть построены в различных конформациях компонентов XTEN, CF и спейсерных последовательностей, таких как конформации по формулам I-VIII. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения конструкция содержит полинуклеотидные последовательности, комплементарные тем, или те, которые кодируют мономерный полипептид компонентов в следующем порядке (от 5' до 3') FVIII, внутренний по отношению к домену B XTEN, и С-концевой XTEN. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения конструкция содержит полинуклеотидные последовательности, комплементарные тем, или те, которые кодируют мономерный полипептид компонентов в следующем порядке (5' to 3') FVIIII, спейсерная область, связанная с С-концом, и XTEN. Спейсерные полинуклеотиды могут, необязательно, содержать последовательности, кодирующие расщепленные последовательности. Как будет очевидно специалистам в данной области техники, возможны различные пермутации доменов FVIII и вводимых XTEN.

Гомология, сходство последовательности или идентичность последовательности нуклеотида или аминокислотных последовательностей может также определяться традиционно при использовании известного программного обеспечения или компьютерных программ, таких как программы сравнения пар BestFit или Gap (GCG Wisconsin Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis. 53711). BestFit использует алгоритм локальной гомологии от Smith и Waterman (Advances in Applied Mathematics. 1981. 2: 482-489), чтобы найти лучший сегмент идентичности или сходства между двумя последовательностями. Gap обеспечивает общие выравнивания: всей последовательности со всей другой схожей последовательностью с использованием способа Needleman и Wunsch, (Journal of Molecular Biology. 1970. 48:443-453). При использовании, программы сравнительного анализа первичной структуры

последовательности, такой как BestFit, для определения степени гомологии последовательности, сходства или идентичности, могут быть использованы по умолчанию, или для оптимизации результатов идентичности, сходства или гомологи может быть выбрана соответствующая оценочная матрица.

Нуклеотидные последовательности, которые являются "комплементарными", представляют собой такие, которые способны к спариванию оснований в соответствии со стандартными правилами комплементарности Watson-Crick. Как используется в данном документе, термин "комплементарные последовательности" означает нуклеотидные последовательности, которые являются по существу комплементарными, которые могут быть оценены с помощью того же нуклеотидного сравнения, изложеного выше, или определены как способные к гибридизации с полинуклеотидами, которые кодируют последовательности CFXTEN при жестких условиях, таких, как описаны в данном документе.

Получаемые полинуклеотиды, кодирующие слитые гибридные белки CFXTEN, затем могут быть индивидуально клонированы в экспрессирующий вектор. Нуклеотидную последовательность вводят в вектор с помощью различных процедур. В общем, DNA вводят в соответствующий сайт(ы) рестрикционной эндонуклеазы с использованием способов, известных в данном уровне техники. Компоненты вектора, как правило, содержат, но без ограничения ими, одну или несколько сигнальных последовательностей, точку начала репликации, один или несколько маркерных генов, элемент энхансера, промотор и стоп-кодон транскрипции. Построение подходящих векторов, которые содержат один или несколько этих компонентов использует стандартные способы лигирования, которые известны специалисту в данной области техники. Подобные способы хорошо известны в данной области техники, хорошо описаны в научной и патентной литературе.

Различные векторы являются общедоступными. Вектор может быть, например, в виде плазмиды, космиды, вирусной частицы или фага, которые могут быть легко подвергнуты рекомбинантным способам DNA, и выбор вектора часто зависит от клетки-хозяина, в которую он должен быть введен. Таким образом, вектор может быть автономно реплицирующимся вектором, т.е. вектор, который существует в качестве экстрахромосомной субстанции, репликация которого не зависит от хромосомной репликации, например, плазмиды. С другой стороны, вектор может быть таким, который при введении в клетку-хозяина, интегрирован в геном клетки-хозяина и реплицируется вместе с хромосомой(ами), в которую он был интегрирован. Репрезентативные плазмиды, проиллюстрированные фиг. 17, отображены с кодирующимися областями для различных конформаций FVIII и компонентов XTEN.

Настоящее изобретение обеспечивает использование плазмидных векторов, которые содержат последовательности репликации и контроля, которые являются совместимыми с, и распознаются, клетками-хозяевами, и функционально связаны с геном CFXTEN для контролируемой экспрессии гибридного белка CFXTEN. Вектор обычно несет сайт репликации, а также последовательности, кодирующие протеины, которые являются способными обеспечить фенотипический отбор в трансформированных клетках. Подобные векторные последовательности хорошо известны для различных бактерий, дрожжей и вирусов. Применимые экспрессирующие векторы, которые могут использоваться, содержат, например, сегменты хромосомных, не-хромосомных и синтетических последовательностей DNA. "Экспрессирующий вектор" соответствует конструкции DNA, содержащей последовательность DNA, которая представляет собой функционально связанную с подходящей последовательностью контроля, способной к осуществлению экспрессии DNA, кодирующей гибридный белок в подходящем хозяине. Требованиями являются то, что векторы являются воспроизводимыми и жизнеспособными в выбранной клетке-хозяине. При необходимости могут быть использованы векторы с низким или высоким количеством копий.

Другие подходящий векторы содержат, но без ограничения ими, производные SV40 и pcDNA, и известные бактериальные плазмиды, такие как col EI, pCRl, pBR322, pMal-C2, pET, pGEX, как описано Smith, et al., Gene 57:31-40 (1988), pMB9 и их производные, плазмиды, такие как RP4, DNA фага, такие как многочисленные производные фага I, такие как NM989, а также другие DNA фага, такие как M13 и филаментная одноцепочечная DNA фага; плазмиды дрожжей, такие как 2-х микронная плазмида или производные плазмиды 2m, а также центромерные и интегративные бифункциональные векторы дрожжей; векторы, применимые в эукариотических клетках, такие как векторы, применимые для клеток насекомых или млекопитающих; векторы, полученные из комбинаций плазмид и DNA фагов, таких как плазмиды, которые были модифицированы, чтобы использовать DNA фага или последовательности контроля за экспрессией; и подобные. Экспрессирующие системы дрожжей, которые также могут быть использованы в настоящем изобретении, содержат, но без ограничения ими, неслитый вектор pYES2 (Invitrogen), слитый pYESHisA, B, C (Invitrogen), векторы pRS и подобные.

Последовательности контроля вектора содержат промотор для осуществления транскрипции, дополнительную последовательность оператора для управления такой транскрипцией, последовательность, кодирующую подходящие сайты связывания рибосомы mRNA, и последовательности, которые контролируют терминацией транскрипции и трансляции. Промотор может быть любой последовательностью DNA, которая иллюстрирует транскрипционную активность в выбранной клетке-хозяине, и может быть получена из генов, кодирующих белки, либо гомологичных, либо гетерологичных клетке-хозяину.

Примеры подходящих промоторов для управления транскрипцией DNA, кодирующей вариант полипептид FVIII в клетках млекопитающих, представляют собой промотор SV40 (Subramani et al., Mol.

Cell. Biol. 1 (1981), 854-864), промотор MT-1 (ген металлотионеина) (Palmiter et al., Science 222 (1983), 809-814), промотор CMV (Boshart et al., Cell 41:521-530, 1985) или основной поздний промотор аденовируса 2 (Kaufman и Sharp, Mol. Cell. Biol, 2:1304-1319, 1982). Вектор также может нести такие последовательности, как UCOE (универсальные хроматинраскрывающие элементы). Примеры подходящих промоторов для использования в клетках-хозяевах нитчатых грибов представляют собой, например, промотор ADH3 или промотор tpiA. Примеры других используемых промоторов представляют собой полученный из гена, кодирующего амилазу TAKA A. oryzae, аспарагиновую протеиназу Rhizomucor miehei, нейтральную α-амилазу A. niger, кислотоустойчивую α-амилазу A. niger, A. niger или A. awamoriglucoamylase (gluA), липазу Rhizomucor miehei, щелочную протеазу A. oryzae, триозофосфатизомеразу A. oryzae или ацетамидазу A. nidulans. Предпочтительными являются промоторы TAKA-амилазы и gluA.

Промоторы, подходящие для использования в экспрессирующих векторах с прокариотическими хозяевами, содержат β-лактамазу и системы промотирования лактозы [Chang et al., Nature, 275:615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979)], щелочную фосфатазу, систему промотирования триптофана (trp) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36776] и гибридные промоторы, такие как составной промотор [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)], все функционально связаны с DNA, кодирующей полипептиды CFXTEN. Промоторы для использования в бактериальных системах могут также содержать последовательность Shine-Dalgarno (S.D.), функционально связанную с DNA, кодирующей полипептиды CFXTEN.

Настоящее изобретение предусматривает использование других экспрессирующих систем, которые содержат, например, бакуловирусную систему экспрессии с обоими неслитыми векторами переноса, такими как, но без ограничения ими, pVL941 Summers, et al., Virology 84:390-402 (1978)), pVL1393 (Invitrogen), pVL1392 (Summers, et al., Virology 84:390- 402 (1978) и Invitrogen) и pBlueBacIII (Invitrogen), и могут быть использованы слитые векторы переноса, такие как, но без ограничения ими, pAc700 (Summers, et al., Virology 84:390-402 (1978)), pAc701 и pAc70-2 (такие как pAc700, с различными рамками считывания), pAc360 Invitrogen) и pBlueBacHisA, B, C (Invitrogen).

Примеры подходящих промоторов для управления транскрипцией DNA, кодирующей вариант полипептида FVIII в клетках млекопитающих, представляют собой промотор CMV (Boshart et al., Cell 41:521-530, 1985), промотор SV40 (Subramani et al., Mol. Cell. Biol. 1 (1981), 854-864), MT-1 (ген металлотионеина) промотор (Palmiter et al., Science 222 (1983), 809-814), основной поздний промотор аденовируса 2 (Kaufman и Sharp, Mol. Cell. Biol, 2:1304-1319, 1982). Вектор может также нести такие последовательности, как UCOE (универсальные хроматинраскрывающие элементы).

Последовательности DNA, кодирующие CFXTEN, могут, кроме того, при необходимости, быть функционально соединена с соответствующим терминатором, таким как терминатор hGH (Palmiter et al., Science 222, 1983, pp. 809-814) или терминаторы TPI1 (Alber и Kawasaki, J. Mol. Appl. Gen. 1, 1982, pp. 419-434) или ADH3 (McKnight et al., EMBO J. 4, 1985, pp. 2093-2099). Экспрессирующие векторы могут также содержать набор сайтов сплайсинга RNA, расположенный в прямом направлении от промотора и в обратном направлении от инсерционного сайта последовательности CFXTEN, который содержит сайты сплайсинга, полученные из аденовируса. Кроме того, содержащееся в экспрессирующих векторах представляет собой сигнал полиаденилирования, расположенный в прямом направлении от инсерционного сайта. Особенно предпочтительные сигналы полиаденилирования содержат ранний или поздний сигнал полиаденилирования от SV40 (Kaufman и Sharp, ibid.), сигнал полиаденилирования от области Elb 5 аденовируса, терминатора hGH (DeNoto et al. Nucl. Acids Res. 9:3719-3730, 1981). Экспрессирующие векторы могут также содержать некодирующую вирусную лидерную последовательность, такую как трехкомпонентная лидерная последовательность аденовируса 2, расположенная между промотором и сайтами сплайсинга RNA; и последовательности энхансера, такие как энхансер SV40.

Для направления CFXTEN по настоящему изобретению в секреторный путь клеток-хозяев, секреторная сигнальная последовательность (также известная как лидерная последовательность, препропоследовательность или препоследовательность) может содержаться в рекомбинантном векторе. Секреторная сигнальная последовательность функционально связана с последовательностями DNA, кодирующими CFXTEN, обычно расположенными на 5' конце по отношению к последовательности DNA, кодирующей гибридный белок CFXTEN. Секреторная сигнальная последовательность может быть, как правило, связанна с природным протеином FVIII или может образовывать ген, кодирующий другой секретируемый протеин. Неограничивающие примеры содержат OmpA, PhoA и DsbA в случае экспрессии E. coli, ppL-alpha, DEX4, сигнальную последовательность инвертазы, сигнальную последовательность кислой фосфатазы, CPY или INU1 в случае экспрессии дрожжей, и IL2L, SV40, IgG kappa и IgG лямбда в случае экспрессии млекопитающих. Сигнальные последовательности являются, как правило, протеолитически удаленными от протеина во время способа транслокации и секретирования, генерирования определенного N-конца. Способы раскрыты в Arnau, et al., Protein Expression and Purification 48: 1-13 (2006).

Процедуры, используемые для лигирования последовательности DNA, кодирующей CFXTEN, промотор и, необязательно, терминатор и/или секреторную сигнальную последовательность, соответственно, и для вставки их в подходящие векторы, которые содержат информацию, необходимую для реплика-

ции, хорошо известны специалистам в данной области техники (см., например, Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001). Таким образом, в пределах конструкции получают слитую молекулу DNA, кодирующую мономерный гибридный белок CFXTEN. Необязательно, эта слитая молекула DNA может быть транспортирована или клонирована в другую конструкцию, которая представляет собой более соответствующий экспрессирующий вектор. В этот момент клетка-хозяин, способная к экспрессированию слитой молекулы DNA, может быть трансформирована слитой молекулой DNA.

Неограничивающие примеры клеточных линий млекопитающих для использования по настоящему изобретению представляют собой COS-1 (ATCC CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), BHK-21 (ATCC CCL 10)) и BHK-293 (ATCC CRL 1573; Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977), клетки BHK-570 (ATCC CRL 10314), CHO-K1 (ATCC CCL 61), CHO-S (Invitrogen 11619-012), и 293-F (Invitrogen R790-7) и родительские и производные клеточные линии, известные в данной области техники, применимые для экспрессии FVIII. Клеточная линия tk-ts 13 BHK также доступна от ATCC с учетным номером CRL 1632. Кроме того, в настоящем изобретении может быть использован ряд других клеточных линий, который содержит Rat Hep I (гепатома крыс; ATCC CRL 1600), Rat Hep II (гепатома крыс; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), легкие человека (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9,1), CHO (ATCC CCL 61) и клетки DUKX (Urlaub и Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, 1980).

Примеры подходящих клеток дрожжей содержат клетки Saccharomyces spp. или Schizosaccharomyces spp., в конкретных штаммах Saccharomyces cerevisiae или Saccharomyces kluyveri. Способы трансформации клеток дрожжей с гетерологической DNA и получения гетерологических полипептидов описаны, например, в патенте США № 4599311, патенте США № 4931373, патенте США № 4870008, 5037743 и патенте США № 4845075, все из которых содержаться в данном описании в виде ссылки. Трансформированные клетки выбирают по фенотипу, определенному с помощью селектируемого маркера, обычно устойчивость или способность лекарственного средства расти при отсутствии конкретного питательного вещества, например, лейцина. Предпочтительный вектор для использования в дрожжах представляет собой вектор POT1, раскрытый в патенте США № 4931373. Последовательности DNA, кодирующие CFXTEN, могут быть предвосхищены сигнальной последовательностью и, необязательно, лидерной последовательностью, например, как описано выше. Дополнительные примеры подходящих клеток дрожжей представляют собой штаммы Kluyveromyces, такие как K. lactis, Hansenula, например, H. Polymorpha или Pichia, например, P. pastoris (cf. Gleeson et al., J. Gen. Microbiol. 132, 1986, pp. 3459-3465; патент США № 4882279). Примеры других клеток грибка представляют собой клетки филаментного грибка, например, Aspergillus spp., Neurospora spp., Fusarium spp. или Trichoderma spp., в конкретных штаммы A. oryzae, A. nidulans или A. niger. Использование Aspergillus spp. для экспрессии протеинов описано в, например, EP 272 277, EP 238 023, EP 184 438. Превращение F. oxysporum может быть, например, выполнено, как описано в Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156. Превращение Trichoderma spp. может быть осуществлено, например, как описано в EP 244 234.

Другие подходящие клетки, которые могут использовать по настоящему изобретению, содержат, но без ограничения ими, штаммы прокариотических клеток-хозяев, таких как Escherichia coli, (например, штамм DH5-α), Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium, или штаммы рода Pseudomonas, Streptomyces и Staphylococcus. Неограничивающие примеры подходящих прокариот содержат таковые из рода: Actinoplanes; Archaeoglobus; Bdellovibrio; Borrelia; Chloroflexus; Enterococcus; Escherichia; Lactobacillus; Listeria; Oceanobacillus; Paracoccus; Pseudomonas; Staphylococcus; Streptococcus; Streptomyces; Thermo-плазма; и Vibrio.

Способы трансфекции клеток млекопитающих и экспрессирования последовательностей DNA, введенных в клетки, описаны в, например, Kaufman и Sharp, J. Mol. Biol. 159 (1982), 601-621; Southern и Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1 (1982), 327-341; Loyter et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA 79 (1982), 422-426; Wigler et al., Cell 14 (1978), 725; Corsaro и Pearson, Somatic Cell Genetics 7 (1981), 603, Graham и van der Eb, Virology 52 (1973), 456; и Neumannet al., EMBO J. 1 (1982), 841-845.

Последовательности клонированной DNA вводят в культивируемые клетки млекопитающих с помощью, например, кальцийфосфатопосредованной трансфекции (Wigler et al., Cell 14:725-732, 1978; Corsaro и Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603-616, 1981; Graham и Van der Eb, Virology 52d:456-467, 1973), трансфекции многих коммерчески доступных веществ, таких как FuGENEG Roche Diagnostics, Mannheim, Германия) или липофектамина (Invitrogen) или с помошью электропорации (Neumann et al., EMBO J. 1:841-845, 1982). Чтобы определить и выбрать клетки, которые экспрессируют экзогенную DNA, ген, который придает селектируемый фенотип (селективный маркер), как правило, вводят в клетки вместе с геном или cDNA, представляющим интерес. Предпочтительные селективные маркеры содержат гены, которые придают устойчивость к лекарствам, таким как неомицин, гигромицин, пуромицин, зеоцином и метотрексат. Селективный маркер может быть амплифицируемым селектируемым маркером. Предпочтительный амплифицируемый селектируемый маркер представляет собой последовательность дигидрофолатредуктазы (DHFR). Дополнительные примеры селектируемых маркеров хорошо известны специалистам в данной области техники и содержат репортеры, такие как улучшенный зеленый флуоресцент-

ный белок (EGFP), бета-галактозидаза (β-gal) или хлорамфеникол-ацетилтрансфераза (CAT). Селектируемый маркеры представлены Thilly (Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, Mass., включенными в данный документ в виде ссылки). Специалист в данной области техники сможет легко выбрать подходящие селектируемые маркеры. Любой известный селективный маркер возможно использовать до тех пор, пока он способен экспрессироваться одновременно с нуклеиновой кислотой, кодирующей генный продукт.

Селектируемые маркеры могут быть введены в клетку на отдельной плазмиде в то же время, как и представляющий интерес ген, или же они могут быть введены в этой же плазмиде. Если, с той же плазмидой, селектируемый маркер и ген, представляющий интерес, могут находиться под контролем различных промоторов или того самого промотора, последний механизм получает бицистронное сообщение. Конструкции этого типа известны в данной области техники (например, Levinson и Simonsen, патент США № 4713339). Он также может быть полезным при добавлении дополнительной DNA, известной как "носитель DNA", к смеси, которая вводится в клетки.

После того, как клетки поглощают DNA, их выращивают в соответствующей среде роста, как правило, 1-2 дня, чтобы начать экспрессирование гена, представляющего интерес. Как используется в данном документе, термин "соответствующая среда роста" означает среду, которая содержит питательные вещества и другие компоненты, необходимые для роста клеток и экспрессии CFXTEN, представляющего интерес как правило, включают источник углерода, источник азота, незаменимые аминокислоты, незаменимые сахара, витамины, соли, фосфолипиды, белки и факторы роста. Для получения гамма-карбоксилированных протеинов среда содержит витамин K, предпочтительно, при концентрации от около 0,1 мкг/мл до около 5 мкг/мл. Выбор лекарственного средства затем используют для выбора в случае роста клеток, которые экспрессируют селектируемый маркер в стабильной форме. В случае клеток, которые были трансфицированы с амплифицируемым селектируемым маркером, концентрация лекарственного средства может быть увеличена для того, чтобы выбрать в случае увеличенного количества копий клонируемых последовательностей, тем самым увеличивая уровни экспрессии. Клоны стабильно трансфицированных клеток затем подвергают скринингу на экспрессию варианта полипептида FVIII, представляющего интерес.

Трансформированную или трансфицированную клетку-хозяина затем культивируют в подходящей питательной среде в условиях, допускающих экспрессию полипептида CFXTEN, после которой получаемый пептид может быть восстановлен из культуры в качестве изолированного гибридного белка. Средой, используемой для культивирования клеток, может быть любая обычная среда, подходящая для выращивания клеток-хозяев, такая как минимальная или сложная среда, содержащая соответствующие добавки. Подходящие среды доступны от коммерческих поставщиков или могут быть получены в соответствии с опубликованными рецептами (например, в каталогах American Type Culture Collection). Условия культивирования, такие как температура, pH и подобные, представляют собой те, которые ранее использовались для клетки-хозяина, выбранной для экспрессии, и будут очевидны специалисту в данной области техники.

Экспрессию гена измеряют в непосредственно образце, например, с помощью обычного саузерн-блоттинга, нозерн-блоттинга для количественной оценки транскрипции mRNA [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], дот-блоттинга (анализа DNA) или гибридизации in situ, с использованием соответственно меченного зонда, основываясь на последовательности, обеспечиваемой в данном документе. Кроме того, антитела могут быть использованы, которые могут распознавать специфические дуплексы, в том числе дуплексы DNA, дуплексы RNA и гибридные дуплексы DNA-RNA или DNA-протеиновые дуплексы. Антитела, в свою очередь, могут быть маркированы и может быть осуществлен анализ, если дуплекс связан с поверхностью таким образом, что при образовании на поверхности дуплекса может быть обнаружено присутствие антитела, связанного с дуплексом.

Экспрессия генов, в качестве альтернативы, может быть измерена с помощью иммунологических флуоресцентных способов, таких как иммуногистохимическое окрашивание срезов клеток или ткани и анализа культуры клеток, или жидкостей тела, или обнаружения селектируемых маркеров для количественного определения непосредственно экспрессии генного продукта. Антитела, применимые для иммуногистохимического окрашивания и/или анализа образцов жидкостей, могут быть либо моноклональными или поликлональными, и могут быть получены от любого млекопитающего. В целях удобства, могут быть получены антитела к природной последовательности полипептида FVIII или к синтетическому пептиду, основанному на последовательностях DNA, которые обеспечивают в данном документе, или к экзогенной последовательности, слитой с FVIII, и кодирующей специфический эпитоп антитела. Примеры селектируемых маркеров хорошо известны специалистам в данной области техники и содержат такие репортеры, как улучшенный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), бета-галактозидаза (β-gal) или хлорамфеникол-ацетилтрансфераза (CAT). Экспрессированный продукт(ы) полипептида CFXTEN может быть очищен посредством способов, известных в данной области техники, или с помощью способов, раскрытых в данном документе. Могут использовать такие способы, как гель-хроматография, аффинная очистка (например, с использованием колонки с анти-FVIII антителом), фракционирование солями, ио-

нообменная хроматография, гель-проникающая хроматография, адсорбционная хроматография на гидроксиапатите, хроматография с гидрофобным взаимодействием и гель-электрофорез; каждый с учетом восстановления и очистки гибридного белка получают с помощью соответствующих клеток-хозяев. Дополнительную очистку могут выполнять с помощью способов обычной химической очистки, таких как высокоэффективная жидкостная хроматография. Некоторые экспрессированные CFXTEN могут требовать рефолдинга во время выделения и очистки. Способы очистки описаны у Robert K. Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Charles R. Castor (ed.), Springer-Verlag 1994, и Sambrook, et al., выше. Разделения с помощью многоэтапной очистки также описаны в Baron, et al., Crit. Rev. Biotechnol. 10:179-90 (1990) и ниже, et al., J. Chromatogr. A. 679:67-83 (1994). Для терапевтических целей желательно, чтобы эти гибридные белки CFXTEN по настоящему изобретению являлись по существу чистыми. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения CFXTEN по настоящему изобретению очищают до по меньшей мере около от 90 до 95% гомогенности, предпочтительно, до по меньшей мере около 98% гомогенности. Чистота может быть оценена с помощью, например, гель-электрофореза, HPLC и аминоконцевого секвенирования белков.

VIII) Фармацевтические композиции.

Настоящее изобретение обеспечивает фармацевтические композиции, которые содержат CFXTEN. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция содержит гибридный белок CFXTEN, раскрытый в данном документе, примешанный к по меньшей мере одному фармацевтически приемлемому носителю. Полипептиды CFXTEN по настоящему изобретению могут быть составлены в соответствии с известными способами для получения фармацевтически применимых композиций, причем полипептид комбинируют в примеси с фармацевтически приемлемой основой носителя, такой как водные растворы, буферы, растворители и/или фармацевтически приемлемые суспензии, эмульсии, стабилизаторы или вспомогательные вещества. Примеры безводных растворителей содержат пропилэтиленгликоль, полиэтиленгликоль и растительные масла. Композиции фармацевтических композиций получают для хранения с помощью смешивания активного ингредиента CFXTEN, который имеет нужную степень чистоты с дополнительными физиологически приемлемыми носителями, вспомогательными веществами (например, хлорид натрия, соль кальция, сахароза или полисорбат) или стабилизаторами (например, сахароза, трегалоза, раффиноза, аргинин, соль кальция, глицин или гистидин), как описано в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980), в виде лиофилизированных композиций или водных растворов.

Фармацевтическая композиция может быть обеспечена в виде лиофилизированного порошка для разведения перед введением. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция может быть обеспечена в жидкой форме в пробирке, содержание которого могут вводить непосредственно пациенту. Кроме того, композицию обеспечивают в виде жидкости в предварительно заполненном шприце для введения композиции. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения композицию обеспечивают в виде жидкости в предварительно наполненной пробирке, которая может быть встроена в насос.

Фармацевтические композиции могут быть введены любым подходящим способом, или путем, в том числе подкожно, подкожно с помощью инфузионного насоса, внутримышечно и внутривенно. Следует иметь в виду, что предпочтительный путь будет меняться в зависимости от заболевания и возраста пациента, и от тяжести заболевания, подлежащего лечению.

В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция CFXTEN в жидкой форме или после разведения (если обеспечивают в виде лиофилизированного порошка) содержит фактор свертывания VIII с активностью по меньшей мере 50 МЕ/мл, или по меньшей мере 100 МЕ/мл, или по меньшей мере 200 МЕ/мл, или по меньшей мере 300 МЕ/мл, или по меньшей мере 400 МЕ/мл, или активность по меньшей мере 500 МЕ/мл, или активность по меньшей мере 600 МЕ/мл, состав которой способен увеличить активность фактора VIII до по меньшей мере 1,5% нормального уровня плазмы в крови в течение по меньшей мере около 12 ч, или по меньшей мере около 24 ч, или по меньшей мере около 48 ч, или по меньшей мере около 72 ч, или по меньшей мере около 96 ч, или по меньшей мере около 120 ч после введения фармацевтической композиции фактора VIII субъекту, нуждающемуся в стандартной профилактике. В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция CFXTEN в жидкой форме или после разведения (если обеспечивают в виде лиофилизированного порошка) содержит фактор свертывания VIII с активностью по меньшей мере 50 МЕ/мл, или по меньшей мере 100 МЕ/мл, или по меньшей мере 200 МЕ/мл, или по меньшей мере 300 МЕ/мл, или по меньшей мере 400 МЕ/мл, или по меньшей мере 500 МЕ/мл, или активность по меньшей мере 600 МЕ/мл, состав которой способен увеличить активность фактора VIII до по меньшей мере 2,5% нормального уровня плазмы в крови в течение по меньшей мере около 12 ч, или по меньшей мере около 24 ч, или по меньшей мере около 48 ч, или по меньшей мере около 72 ч, или по меньшей мере около 96 ч, или по меньшей мере около 120 ч после введения субъекту нуждающемуся в стандартной профилактике. Отдельно предусмотрено, что фармацевтические композиции вышеуказанного могут быть составлены для того, чтобы содержать одно или несколько вспомогательных веществ, буферов или других ингредиентов, известных в данной области техники, чтобы быть совместимыми с введением внутривенным пу-

тем, подкожным путем или внутримышечным путем. Таким образом, в вариантах осуществления настоящего изобретения, описанных выше в этом абзаце, фармацевтическую композицию вводят подкожно, внутримышечно или внутривенно.

Композиции по настоящему изобретению могут быть составлены с использованием различных вспомогательных веществ. Подходящие вспомогательные вещества содержат микрокристаллическую целлюлозу (например, Avicel PH102, Avicel PH101), полиметакрилат, поли(этилакрилат, метилметакрилат, хлорид триметиламмонийэтилметакрилата) (такой как Eudragit RS-30D), гидроксипропилметилцеллюлоза (Methocel K100M, Premium CR Methocel K100M, Methocel E5, Opadry®), стеарат магния, тальк, триэтилцитрат, водная дисперсия этилцеллюлозы (Surelease®) и протаминсульфат. Средство замедленного действия может также содержать носитель, который может содержать, например, растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические и средства замедления абсорбция. Фармацевтически приемлемые соли могут также быть использованы в этих средствах замедленного действия, например, минеральные соли, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты или сульфаты, а также соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты или бензоаты. Композиция может также содержать жидкости, такие как вода, физиологический раствор, глицерин и этанол, а также вещества, такие как смачивающие средства, эмульгирующие средства или pH буферизующие средства. Также в качестве носителя могут быть использованы липосомы.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения композиции по настоящему изобретению инкапсулируют в липосомы, которые продемонстрировали применение в доставке эффективных активных средств контролируемым образом в течение пролонгированных периодов времени. Липосомы являются закрытыми двухслойными мембранами, содержащими захваченный объем воды. Липосомы могут быть также однослойными везикулами, имеющими один бислой мембраны или многослойные везикулы с несколькими бислоями мембраны, каждый из которых отделен от следующего с помощью водного слоя. Структура полученного мембранного бислоя такова, что гидрофобные (неполярные) хвосты липида ориентированы по направлению к центру бислоя, в то время как гидрофильные (полярные) головки ориентированы по направлению к водной фазе. В отдельном варианте осуществления настоящего изобретения липосома может быть нанесена с конформационно-лабильным водорастворимым полимером, который избегает поглощение органами системы мононуклеарных фагоцитов, прежде всего печени и селезенки. Подходящие гидрофильные полимеры в случае окружающих липосом содержат, без ограничения, PEG, поливинилпирролидон, поливинилметиловый эфир, полиметилоксазолин, полиэтилоксазолин, полигидроксипропилоксазолин, полигидроксипропилметакриламид, полиметакриламид, полидиметилакриламид, полигидроксипропилметакрилат, полигидроксэтилакрилат, гидроксиметилцеллюлозу, гидроксиэтилцеллюлозу, полиэтиленгликоль, полиаспартамид и гидрофильные пептидные последовательности, как описано в патентах США № 6316024; 6126966; 6056973; 6043094, содержания которых представлены в виде ссылки во всей их полноте. Дополнительные липосомальные способы описаны в патентах США № 6759057; 6406713; 6352716; 6316024; 6294191; 6126966; 6056973; 6043094; 5965156; 5916588; 5874104; 5215680; и 4684479, содержания которых включены в данный документ в виде ссылки. Они описывают липосомы и покрытые липидами микропузырьки и способы их изготовления. Таким образом, специалист в данной области техники, с учетом как раскрытого по настоящему изобретению, так и раскрытого в этих других патентах может производить липосомы для замедленного высвобождения полипептидов по настоящему изобретению.

В случае жидких композиций желательным свойством является то, что препарат поставляют в форме, которая может пройти через 25, 28, 30, 31, 32 калибр игл в случае внутривенного, внутримышечного, внутрисуставного или подкожного введения.

Шприцевые инфузионные насосы могут также использоваться в качестве средств замедленного действия. Такие устройства описаны в патентах США № 4976696; 4933185; 5017378; 6309370; 6254573; 4435173; 4398908; 6572585; 5298022; 5176502; 5492534; 5318540; и 4988337, содержания которых включены в данный документ в виде ссылки. Специалист в данной области техники, с учетом и раскрытого в настоящем изобретению, и раскрытого в другие патентах, может получать шприцевой инфузионные насос для замедленного высвобождения композиций по настоящему изобретению.

IX) Фармацевтические наборы.

В дополнительных аспектах настоящее изобретение обеспечивает набор для облегчения использования полипептидов CFXTEN. Набор содержит фармацевтическую композицию, обеспечиваемую в данном документе, контейнер и этикетку или листовку-вкладыш в упаковке на, или связанные с, контейнере. Подходящие контейнеры содержат, например, флаконы, пробирки, шприцы и т.д., образованные из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит фармацевтическую композицию ввиде композиции, которая является эффективной при лечении заболевания, связанного с FVIII, и могут иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может иметь баллон с внутривенным раствором или пробирку, которая имеет пробку, прокалываемую иглой для подкожной инъекции). Листовка-вкладыш в упаковке может приводить утвержденные показания к препарату, инструкции для воссозда-

ния и/или введения препарата в случае использования в случае указанного симптома, соответствующей дозировки и информации по безопасности, и информацию, определяющую номер партии и истечение срока действия лекарственного средства. В дополнительном варианте осуществления вышеизложенного, набор может содержать второй контейнер, который может нести соответствующий разбавитель для фармацевтической композиции, использование которого будет предоставляться пользователю с соответствующей концентрацией, чтобы быть доставленной субъекту.

Примеры

Пример 1. Построение сегментов мотива XTEN_AD36.

Следующие пример описывают построение коллекции генов с оптимизированным кодоном, кодирующим последовательности мотива из 36 аминокислот. В качестве первого этапа, спейсерный вектор pCW0359 строят, основываясь на векторе pET, и который содержит промотор T7. pCW0359 кодирует домен, связывающий целлюлозу (CBD) и сайт распознавания протеазы TEV с последующей спейсерной последовательностью, которая является окруженной по бокам сайтами BsaI, BbsI, и KpnI. Сайты BsaI и BbsI вводят так, что они после расщепления генерируют совместимые "липкие" концы DNA. Спейсерная последовательность следует за процессированным вариантом гена GFP и гистидиновой меткой. Спейсерная последовательность содержит стоп-кодоны и, таким образом, клетки E. coli осуществляют нефлуоресцирующие колонии спейсерной формы плазмиды pCW0359. Спейсерный вектор pCW0359 для удаления спейсерного сегмента расщепляют BsaI и KpnI и получаемый фрагмент вектора выделяют с помощью очистки на агарозном геле. Последовательности обозначают XTEN_AD36, отражая семейство AD мотивов. Их сегменты имеют аминокислотную последовательность $[X]_3$, где X представляет собой пептид из 12 аминокислот с последовательностями: GESPGGSSGSES (SEQ ID NO: 19), GSEGSSGPGESS (SEQ ID NO: 20), GSSESGSSEGGP (SEQ ID NO: 21) или GSGGEPSESGSS (SEQ ID NO: 22). Вставку получают с помощью ренатурации следующих пар фосфорилированных синтетических олигонуклеотидных пар:

AD1for: AGGTGAATCTCCDGGTGGYTCYAGCGGTTCYGARTC (SEQ ID NO: 1619)

AD1rev: ACCTGAYTCRGAACCGCTRGARCCACCHGGAGATTC (SEQ ID NO: 1620)

AD2for: AGGTAGCGAAGGTTCTTCYGGTCCDGGYGARTCYTC (SEQ ID NO: 1621)

AD2rev: ACCTGARGAYTCRCCHGGACCRGAAGAACCTTCGCT (SEQ ID NO: 1622)

AD3for: AGGTTCYTCYGAAAGCGGTTCTTCYGARGGYGGTCC (SEQ ID NO: 1623)

AD3rev: ACCTGGACCRCCYTCRGAAGAACCGCTTTCRGARGA (SEQ ID NO: 1624)

AD4for: AGGTTCYGGTGGYGAACCDTCYGARTCTGGTAGCTC (SEQ ID NO: 1625)

Также ренатурируют фосфорилированный олигонуклеотид 3KpnIstopperFor: AGGTTCGTCTTCACTCGAGGGTAC (SEQ ID NO: 1626) и нефосфорилированный олигонуклеотид pr_3KpnIstopperRev: CCTCGAGTGAAGACGA (SEQ ID NO: 1627). Лигируют ренатурированные олигонуклеотидные пары, что приводит к смеси продуктов с различной длиной, которые представляют различное количество повторений из 12 аминокислот, лигированных до сегмента BbsI/KpnI. Продукты, соответствующие длине в 36 аминокислот выделяют из смеси с помощью препаративного электрофореза в агарозном геле и лигируют в спейсерный вектор pCW0359, расщепляемый BsaI/KpnI. Большинство клонов в полученной библиотеке, обозначенные LCW0401, демонстрируют зеленую флуоресценцию после индуцирования, что иллюстрирует тот факт, что последовательность XTEN_AD36 была лигирована во фрейме с геном GFP, и что большая чать последовательностей XTEN_AD36 имеет хорошие уровни экспрессии. Проверяют 96 изолятов из библиотеки LCW0401 на высокий уровень флуоресценции штамповкой их на агаровую пластинку, которая содержит IPTG. Подобные изоляты оценивают с помощью PCR и определяют 48 изолятов, которые содержат сегменты с 36 аминокислотами, а также сильную флуоресценцию. Эти изоляты секвенируют и определяют 39 клонов, которые содержат правильные сегменты XTEN_AD36. Имена файлов нуклеотидных и аминокислотных конструкций и последовательностей этих сегментов приведены в табл. 13.

Таблица 13
DNA и аминокислотные последовательности 36-мерных мотивов AD
(SEQ ID NOS 203-278, соответственно, в порядке появления)

Имя файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
LCW0401_001_GFP-N_A01.ab1	GSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGESPGGSSGSES	GGTTCTGGTGGCGAACCGTCCGAGTCTGGTAGCTCAGGTGAATCTCCGGGTGGCTCTAGCGGTTCCGAGTCAGGTGAATCTCCTGGTGGTTCCAGCGGTTCCGAGTCA
LCW0401_002_GFP-N_B01.ab1	GSEGSSGPGESSGESPGGSSGSESGSSESGSSEGGP	GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGCGAGTCTTCAGGTGAATCTCCTGGTGGTTCCAGCGGTTCTGAATCAGGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGCGGTCCA
LCW0401_003_GFP-N_C01.ab1	GSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGESPGGSSGSES	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGTGGTCCAGGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGTGGTCCAGGTGAATCTCCGGGTGGCTCCAGCGGTTCCGAGTCA
LCW0401_004_GFP-N_D01.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSS	GGTTCCGGTGGCGAACCGTCTGAATCTGGTAGCTCAGGTTCTTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGTGGTCCAGGTTCTGGTGGTGAACCTTCCGAGTCTGGTAGCTCA
LCW0401_007_GFP-N_F01.ab1	GSSESGSSEGGPGSEGSSGPGESSGSEGSSGPGESS	GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGTGGTCCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTGAGTCTTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGTGAATCTTCA
LCW0401_008_GFP-N_G01.ab1	GSSESGSSEGGPGESPGGSSGSESGSEGSSGPGESS	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGTGGTCCAGGTGAATCTCCAGGTGGTTCCAGCGGTTCTGAGTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGTGAATCCTCA
LCW0401_012_GFP-N_H01.ab1	GSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESS	GGTTCTGGTGGTGAACCGTCTGAGTCTGGTAGCTCAGGTTCCGGTGGCGAACCATCCGAATCTGGTAGCTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCAGGTGAGTCTTCA
LCW0401_015_GFP-N_A02.ab1	GSSESGSSEGGPGSEGSSGPGESSGESPGGSSGSES	GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGCGGTCCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGCGAATCTTCAGGTGAATCTCCTGGTGGCTCCAGCGGTTCTGAGTCA
LCW0401_016_GFP-N_B02.ab1	GSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGP	GGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGCGGTCCAGGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGCGGTCCAGGTTCTTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGCGGTCCA
LCW0401_020_GFP-N_E02.ab1	GSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESSGSSESGSSEGGP	GGTTCCGGTGGCGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGCGAATCTTCAGGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGCGGTCCA
LCW0401_022_GFP-N_F02.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSS	GGTTCTGGTGGTGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCAGGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAAGGTGGTCCAGGTTCCGGTGGCGAACCTTCTGAATCTGGTAGCTCA
LCW0401_024_GFP-N_G02.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGESPGGSSGSES	GGTTCTGGTGGCGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCAGGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAAGGTGGTCCAGGTGAATCTCCAGGTGGTTCTAGCGGTTCTGAATCA
LCW0401_026_GFP-N_H02.ab1	GSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGSEGSSGPGESS	GGTTCTGGTGGCGAACCGTCTGAGTCTGGTAGCTCAGGTGAATCTCCTGGTGGCTCCAGCGGTTCTGAATCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGTGAATCTTCA
LCW0401_027_GFP-N_A03.ab1	GSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGSGGEPSESGSS	GGTTCCGGTGGCGAACCTTCCGAATCTGGTAGCTCAGGTGAATCTCCGGGTGGTTCTAGCGGTTCTGAGTCAGGTTCTGGTGGTGAACCTTCCGAGTCTGGTAGCTCA
LCW0401_028_GFP-N_B03.ab1	GSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGP	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGCGGTCCAGGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGCGGTCCAGGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAAGGCGGTCCA
LCW0401_030_GFP-	GESPGGSSGSESGSEGSSGPGESSGSEGSS	GGTGAATCTCCGGGTGGCTCCAGCGGTTCTGAGTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCC

N_C03.ab1	GPGESS	GGGTGAGTCCTCAGGTAGCGAAGGTTCTTC CGGTCCTGGTGAGTCTTCA
LCW0401_03 1_GFP-N_D03.ab1	GSGGEPSESGSSGSG GEPSESGSSGSSESG SSEGGP	GGTTCTGGTGGCGAACCTTCCGAATCTGGT AGCTCAGGTTCCGGTGGTGAACCTTCTGAA TCTGGTAGCTCAGGTTCTTCTGAAAGCGGT TCTTCCGAGGGCGGTCCA
LCW0401_03 3_GFP-N_E03.ab1	GSGGEPSESGSSGSG GEPSESGSSGSGGEP SESGSS	GGTTCCGGTGGTGAACCTTCTGAATCTGGT AGCTCAGGTTCCGGTGGCGAACCATCCGA GTCTGGTAGCTCAGGTTCCGGTGGTGAACC ATCCGAGTCTGGTAGCTCA
LCW0401_03 7_GFP-N_F03.ab1	GSGGEPSESGSSGSS ESGSSEGGPGSEGSS GPGESS	GGTTCCGGTGGCGAACCTTCTGAATCTGGT AGCTCAGGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCT GAGGGCGGTCCAGGTAGCGAAGGTTCTTC TGGTCCGGGCGAGTCTTCA
LCW0401_03 8_GFP-N_G03.ab1	GSGGEPSESGSSGSE GSSGPGESSGSGGEP SESGSS	GGTTCCGGTGGTGAACCGTCCGAGTCTGGT AGCTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCG GGTGAGTCTTCAGGTTCTGGTGGCGAACCG TCCGAATCTGGTAGCTCA
LCW0401_03 9_GFP-N_H03.ab1	GSGGEPSESGSSGES PGGSSGSESGSGGEP SESGSS	GGTTCTGGTGGCGAACCGTCCGAATCTGGT AGCTCAGGTGAATCTCCTGGTGGTTCCAGC GGTTCCGAGTCAGGTTCTGGTGGCGAACCT TCCGAATCTGGTAGCTCA
LCW0401_04 0_GFP-N_A04.ab1	GSSESGSSEGGPGSG GEPSESGSSGSSESG SSEGGP	GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGC GGTCCAGGTTCCGGTGGTGAACCATCTGA ATCTGGTAGCTCAGGTTCTTCTGAAAGCGG TTCTTCTGAAGGTGGTCCA
LCW0401_04 2_GFP-N_C04.ab1	GSEGSSGPGESSGES PGGSSGSESGSEGSS GPGESS	GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCTGGTGAG TCTTCAGGTGAATCTCCAGGTGGCTCTAGC GGTTCCGAGTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCT GGTCCTGGCGAGTCCTCA
LCW0401_04 6_GFP-N_D04.ab1	GSSESGSSEGGPGSS ESGSSEGGPGSSESG SSEGGP	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGC GGTCCAGGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCT GAGGGCGGTCCAGGTTCCTCCGAAAGCGG TTCTTCTGAGGGTGGTCCA
LCW0401_04 7_GFP-N_E04.ab1	GSGGEPSESGSSGES PGGSSGSESGESPGG SSGSES	GGTTCTGGTGGCGAACCTTCCGAGTCTGGT AGCTCAGGTGAATCTCCGGGTGGTTCTAGC GGTTCCGAGTCAGGTGAATCTCCGGGTGGT TCCAGCGGTTCTGAGTCA
LCW0401_05 1_GFP-N_F04.ab1	GSGGEPSESGSSGSE GSSGPGESSGESPGG SSGSES	GGTTCTGGTGGCGAACCATCTGAGTCTGGT AGCTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCA GGCGAGTCTTCAGGTGAATCTCCTGGTGGC TCCAGCGGTTCTGAGTCA
LCW0401_05 3_GFP-N_H04.ab1	GESPGGSSGSESGES PGGSSGSESGESPGG SSGSES	GGTGAATCTCCTGGTGGTTCCAGCGGTTCC GAGTCAGGTGAATCTCCAGGTGGCTCTAG CGGTTCCGAGTCAGGTGAATCTCCTGGTGG TTCTAGCGGTTCTGAATCA
LCW0401_05 4_GFP-N_A05.ab1	GSEGSSGPGESSGSE GSSGPGESSGSGGEP SESGSS	GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCAGGTGA ATCTTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCC TGGTGAATCCTCAGGTTCCGGTGGCGAACC ATCTGAATCTGGTAGCTCA

LCW0401_059_GFP-N_D05.ab1	GSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESSGESPGGSSGSES	GGTTCTGGTGGCGAACCATCCGAATCTGGTAGCTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGCGAATCTTCAGGTGAATCTCCAGGTGGCTCTAGCGGTTCCGAATCA
LCW0401_060_GFP-N_E05.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSS	GGTTCCGGTGGTGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCAGGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGTGGTCCAGGTTCCGGTGGTGAACCTTCTGAGTCTGGTAGCTCA
LCW0401_061_GFP-N_F05.ab1	GSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESS	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGCGGTCCAGGTTCTGGTGGCGAACCATCTGAATCTGGTAGCTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCGGGTGAATCTTCA
LCW0401_063_GFP-N_H05.ab1	GSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESSGSEGSSGPGESS	GGTTCTGGTGGTGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGCGAGTCTTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGTGAATCTTCA
LCW0401_066_GFP-N_B06.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSS	GGTTCTGGTGGCGAACCATCCGAGTCTGGTAGCTCAGGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGCGGTCCAGGTTCTGGTGGTGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCA
LCW0401_067_GFP-N_C06.ab1	GSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGESPGGSSGSES	GGTTCCGGTGGCGAACCTTCCGAATCTGGTAGCTCAGGTGAATCTCCGGGTGGTTCTAGCGGTTCCGAATCAGGTGAATCTCCAGGTGGTTCTAGCGGTTCCGAATCA
LCW0401_069_GFP-N_D06.ab1	GSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSESPGGSSGSES	GGTTCCGGTGGTGAACCATCTGAGTCTGGTAGCTCAGGTTCCGGTGGCGAACCGTCCGAGTCTGGTAGCTCAGGTGAATCTCCGGGTGGTTCCAGCGGTTCCGAATCA
LCW0401_070_GFP-N_E06.ab1	GSEGSSGPGESSGSSESGSSEGGPGSEGSSGPGESS	GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCGGGCGAATCCTCAGGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGTGGTCCAGGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCTGGTGAATCTTCA
LCW0401_078_GFP-N_F06.ab1	GSSESGSSEGGPGESPGGSSGSESGESPGGSSGSES	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAAGGCGGTCCAGGTGAATCTCCGGGTGGCTCCAGCGGTTCTGAATCAGGTGAATCTCCTGGTGGCTCCAGCGGTTCCGAGTCA
LCW0401_079_GFP-N_G06.ab1	GSEGSSGPGESSGSEGSSGPGESSGSGGEPSESGSS	GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGCGAGTCTTCAGGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCTGGCGAGTCTTCAGGTTCCGGTGGCGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCA

Пример 2. Построение сегментов XTEN_AE36.

Строят библиотеку кодонов, кодирующих последовательности XTEN длиной в 36 аминокислот. Последовательность XTEN обозначают XTEN_AE36. Их сегменты имеют аминокислотную последовательность $[X]_3$, где X представляет собой пептид из 12 аминокислот с последовательностью: GSPAGSPTSTEE (SEQ ID NO: 23), GSEPATSGSETP (SEQ ID NO: 24), GTSESATPESGP (SEQ ID NO: 25) или GTSTEPSEGSAP (SEQ ID NO: 26). Вставку получают с помощью ренатурации следующих пар фосфорилированных синтетических олигонуклеотидных пар:

AE1for: AGGTAGCCCDGCWGGYTCTCCDACYTCYACYGARGA (SEQ ID NO: 1628)

AE1rev: ACCTTCYTCRGTRGARGTHGGAGARCCWGCHGGGCT (SEQ ID NO: 1629)

AE2for: AGGTAGCGAACCKGCWACYTCYGGYTCTGARACYCC (SEQ ID NO: 1630)

AE2rev: ACCTGGRGTYTCAGARCCRGARGTWGCMGGTTCGCT (SEQ ID NO: 1631)

AE3for: AGGTACYTCTGAAAGCGCWACYCCKGARTCYGGYCC (SEQ ID NO: 1632)

AE3rev: ACCTGGRCCRGAYTCMGGRGTWGCGCTTTCAGARGT (SEQ ID NO: 1633)

AE4for: AGGTACYTCTACYGAACCKTCYGARGGYAGCGCWCC (SEQ ID NO: 1634)

AE4rev: ACCTGGWGCGCTRCCYTCRGAMGGTTCRGTAGARGT (SEQ ID NO: 1635)

Также ренатурируют фосфорилированный олигонуклеотид 3KpnIstopperFor: AGGTTCGTCTTCAC-

TCGAGGGTAC (SEQ ID NO: 1626) и нефосфорилированный олигонуклеотид pr_3KpnIstopperRev: CCTCGAGTGAAGACGA (SEQ ID NO: 1627). Лигируют ренатурированные олигонуклеотидные пары, что приводит к смеси продуктов с различной длиной, которые представляют различное количество повторений из 12 аминокислот, лигированных с сегментом BbsI/KpnI. Из смеси выделяют продукты, соответствующие длине в 36 аминокислот, с помощью препаративного электрофореза в агарозном геле и лигируют в спейсерный вектор pCW0359, расщепляемый BsaI/KpnI. Большинство клонов в полученной библиотеке, обозначенные LCW0402, после индуцирования демонстрируют зеленую флуоресценцию, что иллюстрирует тот факт, что последовательность XTEN_AE36 была лигирована во фрейме с геном GFP и большая часть последовательностей XTEN_AE36 демонстрирует хорошую экспрессию. Проверяют 96 изолятов из библиотеки LCW0402 на высокий уровень флуоресценции штамповкой их на агаровую пластинку, которая содержит IPTG. Подобные изоляты оценивают с помощью PCR и определяют 48 изолятов, которые содержат сегменты с 36 аминокислотами, а также сильную флуоресценцию. Эти изоляты секвенируют и определяют 37 клонов, которые содержат правильные сегменты XTEN_AE36. Имена файлов нуклеотидных и аминокислотных конструкций и последовательностей этих сегментов приведены в табл. 14.

Таблица 14

DNA и аминокислотные последовательности 36-мерных мотивов AE (SEQ ID NOS 279-352, соответственно, в порядке появления)

Имя файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
LCW0402_002_GFP-N_A07.ab1	GSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGT STEPSEGSAP	GGTAGCCCGGCAGGCTCTCCGACCTCTACT GAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCG GAGTCCGGCCCAGGTACCTCTACCGAACCG TCTGAGGGCAGCGCACCA
LCW0402_003_GFP-N_B07.ab1	GTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAP	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGC GCTCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAG GGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCT TCTGAAGGTAGCGCACCA
LCW0402_004_GFP-N_C07.ab1	GTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGT SESATPESGP	GGTACCTCTACCGAACCGTCTGAAGGTAGC GCACCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCT GAGTCCGGTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCA ACCCCGGAGTCTGGCCCA
LCW0402_005_GFP-N_D07.ab1	GTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGT SESATPESGP	GGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGTAGC GCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCG GAATCCGGCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCA ACCCCGGAGTCCGGCCCA
LCW0402_006_GFP-N_E07.ab1	GSEPATSGSETPG TSESATPESGPGS PAGSPTSTEE	GGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTGAA ACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCT GAATCCGGCCCAGGTAGCCCGGCAGGTTCT CCGACTTCCACTGAGGAA
LCW0402_008_GFP-N_F07.ab1	GTSESATPESGPG SEPATSGSETPGT STEPSEGSAP	GGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCC GGTCCAGGTAGCGAACCGGCTACTTCTGGC TCTGAGACTCCAGGTACTTCTACCGAACCG TCCGAAGGTAGCGCACCA
LCW0402_009_GFP-N_G07.ab1	GSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGS EPATSGSETP	GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAACCTCCACT GAGGAAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAACC TCCACTGAAGAAGGTAGCGAACCGGCTACC TCCGGCTCTGAAACTCCA
LCW0402_011_GFP-N_A08.ab1	GSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGT STEPSEGSAP	GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCTACCTCTACTG AGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTG AGTCTGGTCCAGGTACCTCTACTGAACCGT CCGAAGGTAGCGCTCCA
LCW0402_012_GFP-N_B08.ab1	GSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAP	GGTAGCCCTGCTGGCTCTCCGACTTCTACTG AGGAAGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTT CTACTGAGGAAGGTACTTCTACCGAACCTT CCGAAGGTAGCGCTCCA
LCW0402_013_GFP-N_C08.ab1	GTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAP	GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCC GGTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAA GGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCT TCTGAGGGTAGCGCTCCA

LCW0402_014_GFP-N_D08.ab1	GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP	GGTACCTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAGCCCGGCAGGTTCTCCTACTTCCACTGAGGAAGGTACTTCTACCGAACCTTCTGAGGGTAGCGCACCA
LCW0402_015_GFP-N_E08.ab1	GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP	GGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGCTCTGAGACTCCAGGTAGCCCTGCTGGCTCTCCGACCTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCTGGCCCA
LCW0402_016_GFP-N_F08.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP	GGTACTTCTACCGAACCTTCCGAGGGCAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCCGGCCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCCGGTCCA
LCW0402_020_GFP-N_G08.ab1	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE	GGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGCAGCGCACCAGGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGTTCTGAAACCCCAGGTAGCCCAGCAGGTTCTCCAACTTCTACTGAAGAA
LCW0402_023_GFP-N_A09.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP	GGTAGCCCTGCTGGCTCTCCAACCTCCACCGAAGAAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGCCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCTGAAACCCCA
LCW0402_024_GFP-N_B09.ab1	GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE	GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCCGGCCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACTTCCACCGAGGAAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAACTTCTACTGAAGAA
LCW0402_025_GFP-N_C09.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	GGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCA
LCW0402_026_GFP-N_D09.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP	GGTAGCCCGGCAGGCTCTCCGACTTCCACCGAGGAAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACCCCA
LCW0402_027_GFP-N_E09.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCCCAGCAGGCTCTCCGACTTCCACTGAGGAAGGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCACCAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCA
LCW0402_032_GFP-N_H09.ab1	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE	GGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGTTCTGAAACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCGGAGTCTGGTCCAGGTAGCCCTGCAGGTTCTCCTACCTCCACTGAGGAA
LCW0402_034_GFP-N_A10.ab1	GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP	GGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCTGGCCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCA
LCW0402_036_GFP-N_C10.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCCACCGAGGAAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCTCCA
LCW0402_03	GTSTEPSEGSAPG	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGC

9_GFP-N_E10.ab1	TSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAP	GCTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAA GGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCT TCCGAAGGTAGCGCACCA
LCW0402_040_GFP-N_F10.ab1	GSEPATSGSETPG TSESATPESGPGT STEPSEGSAP	GGTAGCGAACCTGCAACCTCTGGCTCTGAA ACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCT GAATCTGGCCCAGGTACTTCTACTGAACCG TCCGAGGGCAGCGCACCA
LCW0402_041_GFP-N_G10.ab1	GTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAP	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGC GCACCAGGTAGCCCAGCAGGTTCTCCTACC TCCACCGAGGAAGGTACTTCTACCGAACCG TCCGAGGGTAGCGCACCA
LCW0402_050_GFP-N_A11.ab1	GSEPATSGSETPG TSESATPESGPGS EPATSGSETP	GGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTGAA ACTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCG GAATCCGGCCCAGGTAGCGAACCGGCTACT TCCGGCTCTGAAACCCCA
LCW0402_051_GFP-N_B11.ab1	GSEPATSGSETPG TSESATPESGPGS EPATSGSETP	GGTAGCGAACCGGCAACTTCCGGCTCTGAA ACCCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCT GAGTCTGGCCCAGGTAGCGAACCTGCTACC TCTGGCTCTGAAACCCCA
LCW0402_059_GFP-N_E11.ab1	GSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGT STEPSEGSAP	GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAA ACTCCAGGTAGCGAACCTGCAACCTCCGGC TCTGAAACCCCAGGTACTTCTACTGAACCTT CTGAGGGCAGCGCACCA
LCW0402_060_GFP-N_F11.ab1	GTSESATPESGPG SEPATSGSETPGS EPATSGSETP	GGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAATCT GGCCCAGGTAGCGAACCGGCTACTTCTGGT TCTGAAACCCCAGGTAGCGAACCGGCTACC TCCGGTTCTGAAACTCCA
LCW0402_061_GFP-N_G11.ab1	GTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGT SESATPESGP	GGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGC GCTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAG GGCAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCA ACCCCTGAATCCGGTCCA
LCW0402_065_GFP-N_A12.ab1	GSEPATSGSETPG TSESATPESGPGT SESATPESGP	GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAA ACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCG GAATCTGGTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCT ACTCCGGAATCCGGTCCA
LCW0402_066_GFP-N_B12.ab1	GSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGT STEPSEGSAP	GGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGCTCTGAA ACTCCAGGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGT TCTGAAACTCCAGGTACCTCTACCGAACCT TCCGAAGGCAGCGCACCA
LCW0402_067_GFP-N_C12.ab1	GSEPATSGSETPG TSTEPSEGSAPGS EPATSGSETP	GGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGAA ACTCCAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAG GGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCTGCTACT TCTGGTTCTGAAACTCCA
LCW0402_069_GFP-N_D12.ab1	GTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGS EPATSGSETP	GGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGC GCACCAGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAG GGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCGGCAACC TCCGGTTCTGAAACTCCA
LCW0402_073_GFP-N_F12.ab1	GTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGS PAGSPTSTEE	GGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGTAGC GCTCCAGGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGT TCTGAAACCCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCT CCGACCTCCACCGAGGAA
LCW0402_074_GFP-N_G12.ab1	GSEPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGT SESATPESGP	GGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGCTCTGAG ACTCCAGGTAGCCCAGCTGGTTCTCCAACC TCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCT ACCCCTGAATCTGGTCCA
LCW0402_075_GFP-N_H12.ab1	GTSESATPESGPG SEPATSGSETPGT SESATPESGP	GGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCTGAGTCT GGCCCAGGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGC TCTGAGACTCCAGGTACCTCTGAAAGCGCA ACCCCGGAATCTGGTCCA

Пример 3. Построение сегментов XTEN_AF36.

Строят библиотеку кодонов, кодирующих последовательности длиной в 36 аминокислот, последовательности обозначают XTEN_AF36. Их сегменты имеют аминокислотную последовательность $[X]_3$, где X представляет собой пептид из 12 аминокислот с последовательностью: GSTSESPSGTAP (SEQ ID NO: 27), GTSTPESGSASP (SEQ ID NO: 28), GTSPSGESSTAP (SEQ ID NO: 29) или GSTSSTAESPGP (SEQ ID NO: 30). Вставку получают с помощью ренатурации следующих пар фосфорилированных синтетических олигонуклеотидных пар:

AF1for: AGGTTCTACYAGCGAATCYCCKTCTGGYACYGCWCC (SEQ ID NO: 1636)

AF1rev: ACCTGGWGCRGTRCCAGAMGGRGATTCGCTRGTAGA (SEQ ID NO: 1637)

AF2for: AGGTACYTCTACYCCKGAAAGCGGYTCYGCWTCTCC (SEQ ID NO: 1638)

AF2rev: ACCTGGAGAWGCRGARCCGCTTTCMGGRGTAGARGT (SEQ ID NO: 1639)

AF3for: AGGTACYTCYCCKAGCGGYGAATCTTCTACYGCWCC (SEQ ID NO: 1640)

AF3rev: ACCTGGWGCRGTAGAAGATTCRCCGCTMGGRGARGT (SEQ ID NO: 1641)

AF4for: AGGTTCYACYAGCTCTACYGCWGAATCTCCKGGYCC (SEQ ID NO: 1642)

AF4rev: ACCTGGRCCMGGAGATTCWGCRGTAGAGCTRGTRGA (SEQ ID NO: 1643)

Также ренатурируют фосфорилированный олигонуклеотид 3KpnIstopperFor: AGGTTCGTCTTCAC-TCGAGGGTAC (SEQ ID NO: 1626) и нефосфорилированный олигонуклеотид pr_3KpnIstopperRev: CCTCGAGTGAAGACGA (SEQ ID NO: 1627). Лигируют ренатурированные олигонуклеотидные пары, что приводит к смеси продуктов с различной длиной, что представляет различное количество повторений из 12 аминокислот, лигированных с сегментом BbsI/KpnI. С помощью препаративного электрофореза в агарозном геле из смеси выделяют продукты, соответствующие длине в 36 аминокислот, и лигируют в спейсерный вектор pCW0359, расщепляемый BsaI/KpnI. Большинство клонов в полученной библиотеке, обозначенные LCW0403, после индуцирования демонстрируют зеленую флуоресценцию, что иллюстрирует тот факт, что последовательность XTEN_AF36 была лигирована во фрейме с геном GFP и большая часть последовательностей XTEN_AF36 демонстрирует хорошую экспрессию. Проверяют 96 изолятов из библиотеки LCW0403 на высокий уровень флуоресценции штамповкой их на агаровую пластинку, которая содержит IPTG. подобные изоляты оценивают с помощью PCR и определяют 48 изолятов, которые содержат сегменты с 36 аминокислотами, а также сильную флуоресценцию. Эти изоляты секвенируют и определяют 44 клона, которые содержат правильные XTEN_AF36 сегменты. Имена файлов нуклеотидных и аминокислотных конструкций и последовательностей этих сегментов приведены в табл. 15.

Таблица 15

DNA и аминокислотные последовательности 36-мерных мотивов AF SEQ ID NOS 353-440, соответственно, в порядке появления)

Имя файла	**Аминокислотная последовательность**	**Нуклеотидная последовательность**
LCW0403_004_GFP-N_A01.ab1	GTSTPESGSASPG TSPSGESSTAPGT SPSGESSTAP	GGTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCA TCTCCAGGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTT CTACTGCTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGCG AATCTTCTACTGCTCCA
LCW0403_005_GFP-N_B01.ab1	GTSPSGESSTAPG STSSTAESPGPGT SPSGESSTAP	GGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACC GCACCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAA TCTCCGGGCCCAGGTACTTCTCCGAGCGGT GAATCTTCTACTGCTCCA
LCW0403_006_GFP-N_C01.ab1	GSTSSTAESPGPG TSPSGESSTAPGT STPESGSASP	GGTTCCACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTG GTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGTGAATCTTC TACTGCTCCAGGTACTTCTACTCCTGAAAGC GGCTCTGCTTCTCCA
LCW0403_007_GFP-N_D01.ab1	GSTSSTAESPGPG STSSTAESPGPGT SPSGESSTAP	GGTTCTACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCTG GCCCAGGTTCCACCAGCTCTACCGCAGAAT CTCCGGGTCCAGGTACTTCCCCTAGCGGTG AATCTTCTACCGCACCA
LCW0403_00	GSTSSTAESPGPG	GGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTG

8_GFP-N_E01.ab1	TSPSGESSTAPGTSTPESGSASP	GCCCAGGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCCAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGTTCTGCATCTCCA
LCW0403_010_GFP-N_F01.ab1	GSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAP	GGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTCCAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGCTCTGCATCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGCACCA
LCW0403_011_GFP-N_G01.ab1	GSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCCAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGCTCTGCATCTCCAGGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGTTCTGCATCTCCA
LCW0403_012_GFP-N_H01.ab1	GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAP	GGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCACCGCTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGCACCA
LCW0403_013_GFP-N_A02.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAP	GGTTCCACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGGCCCAGGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGGTCCAGGTACTTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCTCCA
LCW0403_014_GFP-N_B02.ab1	GSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAP	GGTTCCACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCCAGGTACCTCTACCCCTGAAAGCGGCTCTGCATCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCGTCTGGCACCGCACCA
LCW0403_015_GFP-N_C02.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGTCCAGGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGTCCAGGTACCTCCCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCACCA
LCW0403_017_GFP-N_D02.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGP	GGTTCTACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCGTCTGGCACCGCACCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTCCA
LCW0403_018_GFP-N_E02.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGP	GGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGCCCAGGTTCCACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGTCCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGTCCA
LCW0403_019_GFP-N_F02.ab1	GSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGCTCCAGGTTCCACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTTCCACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGTCCA
LCW0403_023_GFP-N_H02.ab1	GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAP	GGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGTACCGCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCGTCTGGTACTGCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGTACTGCACCA
LCW0403_024_GFP-N_A03.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGP	GGTTCCACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGCCCAGGTTCCACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTCCA
LCW0403_025_GFP-	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGT	GGTTCCACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTCCAGGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAAT

N_B03.ab1	SPSGESSTAP	CTCCGGGTCCAGGTACCTCCCCTAGCGGCG AATCTTCTACCGCTCCA
LCW0403_028_GFP-N_D03.ab1	GSSPSASTGTGPG SSTPSGATGSPGS STPSGATGSP	GGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACCGGTACCG GCCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAA CTGGCTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGG TGCAACCGGCTCCCCA
LCW0403_029_GFP-N_E03.ab1	GTSPSGESSTAPG TSTPESGSASPGS TSSTAESPGP	GGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTG CTCCAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGCT CCGCATCTCCAGGTTCTACTAGCTCTACTGC TGAATCTCCTGGTCCA
LCW0403_030_GFP-N_F03.ab1	GSTSSTAESPGPG STSSTAESPGPGT STPESGSASP	GGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGG GTCCAGGTTCTACCAGCTCTACTGCAGAAT CTCCTGGCCCAGGTACTTCTACTCCGGAAA GCGGTTCCGCTTCTCCA
LCW0403_031_GFP-N_G03.ab1	GTSPSGESSTAPG STSSTAESPGPGT STPESGSASP	GGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCG CTCCAGGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATC TCCTGGCCCAGGTACTTCTACCCCGGAAAG CGGCTCCGCTTCTCCA
LCW0403_033_GFP-N_H03.ab1	GSTSESPSGTAPG STSSTAESPGPGS TSSTAESPGP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACTG CACCAGGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAAT CTCCGGGCCCAGGTTCCACCAGCTCTACCG CAGAATCTCCTGGTCCA
LCW0403_035_GFP-N_A04.ab1	GSTSSTAESPGPG STSESPSGTAPGS TSSTAESPGP	GGTTCCACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCG GGCCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCT GGCACTGCACCAGGTTCTACTAGCTCTACC GCAGAATCTCCGGGCCCA
LCW0403_036_GFP-N_B04.ab1	GSTSSTAESPGPG TSPSGESSTAPGT STPESGSASP	GGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCGG GTCCAGGTACTTCCCCGAGCGGTGAATCTT CTACTGCACCAGGTACTTCTACTCCGGAAA GCGGTTCCGCTTCTCCA
LCW0403_039_GFP-N_C04.ab1	GSTSESPSGTAPG STSESPSGTAPGT SPSGESSTAP	GGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCACC GCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCT GGTACCGCACCAGGTACTTCTCCTAGCGGC GAATCTTCTACCGCACCA
LCW0403_041_GFP-N_D04.ab1	GSTSESPSGTAPG STSESPSGTAPGT STPESGSASP	GGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGTACTG CTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGG CACCGCACCAGGTACTTCTACCCCTGAAAG CGGCTCCGCTTCTCCA
LCW0403_044_GFP-N_E04.ab1	GTSTPESGSASPG STSSTAESPGPGS TSSTAESPGP	GGTACCTCTACTCCTGAAAGCGGTTCTGCA TCTCCAGGTTCCACTAGCTCTACCGCAGAA TCTCCGGGCCCAGGTTCTACTAGCTCTACTG CTGAATCTCCTGGCCCA
LCW0403_046_GFP-N_F04.ab1	GSTSESPSGTAPG STSESPSGTAPGT SPSGESSTAP	GGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGCACT GCACCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCT GGTACCGCACCAGGTACTTCTCCGAGCGGC GAATCTTCTACTGCTCCA
LCW0403_047_GFP-N_G04.ab1	GSTSSTAESPGPG STSSTAESPGPGS TSESPSGTAP	GGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTG GCCCAGGTTCCACTAGCTCTACCGCAGAAT CTCCGGGCCCAGGTTCTACTAGCGAATCCC

		CTTCTGGTACCGCTCCA
LCW0403_049_GFP-N_H04.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASP	GGTTCCACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTCCAGGTACCTCTACTCCTGAAAGCGGTTCCGCATCTCCA
LCW0403_051_GFP-N_A05.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGCCCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGTACCGCTCCA
LCW0403_053_GFP-N_B05.ab1	GTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGP	GGTACCTCCCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCACCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGCTCCAGGTTCCACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGGTCCA
LCW0403_054_GFP-N_C05.ab1	GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTACTGCTCCAGGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCTCCAGGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGTCCA
LCW0403_057_GFP-N_D05.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCGTCTGGCACCGCACCAGGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCACCA
LCW0403_058_GFP-N_E05.ab1	GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASP	GGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCGTCTGGCACTGCACCAGGTACCTCTACCCCTGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCA
LCW0403_060_GFP-N_F05.ab1	GTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGP	GGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCATCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCGTCTGGCACCGCACCAGGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGCCCA
LCW0403_063_GFP-N_G05.ab1	GSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGGCCCAGGTACCTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCCAGGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCCA
LCW0403_064_GFP-N_H05.ab1	GTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAP	GGTACCTCCCCTAGCGGCGAATCTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCTCCAGGTACCTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCACCA
LCW0403_065_GFP-N_A06.ab1	GSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAP	GGTTCCACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCGTCTGGCACCGCACCA
LCW0403_066_GFP-N_B06.ab1	GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACTAGCGAATCTCCGTCTGGCACTGCTCCAGGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCCAGGTACTTCCCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCTCCA
LCW0403_067_GFP-N_C06.ab1	GSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGP	GGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGTACCGCTCCAGGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGCTCCGCTTCTCCAGGTTCCACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTCCA
LCW0403_068_GFP-N_D06.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAP	GGTTCCACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTTCTACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCGTCTGGCACCGCACCA
LCW0403_069_GFP-N_E06.ab1	GSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTACCGCACCAGGTACTTCTACCCCGGAAAGCGGCTCTGCTTCTCCAGGTACTTCTACCCCGGAAAGCGGCTCCGCATCTCCA
LCW0403_070_GFP-N_F06.ab1	GSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTACTGCTCCAGGTACTTCTACTCCTGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGTTCTGCATCTCCA

Пример 4. Построение сегментов XTEN_AG36.

Строят библиотеку кодонов, кодирующих последовательности длиной в 36 аминокислот. Последовательности обозначают XTEN_AG36. Их сегменты имеют аминокислотную последовательность $[X]_3$, где X представляет собой пептид из 12 аминокислот с последовательностью: GTPGSGTASSSP (SEQ ID NO: 31), GSSTPSGATGSP (SEQ ID NO: 32), GSSPSASTGTGP (SEQ ID NO: 33) или GASPGTSSTGSP (SEQ ID NO: 34). Вставку получают с помощью ренатурации следующих пар фосфорилированных синтетических олигонуклеотидных пар:

AG1for: AGGTACYCCKGGYAGCGGTACYGCWTCTTCYTCTCC (SEQ ID NO: 1644)

AG1rev: ACCTGGAGARGAAGAWGCRGTACCGCTRCCMGGRGT (SEQ ID NO: 1645)

AG2for: AGGTAGCTCTACYCCKTCTGGTGCWACYGGYTCYCC (SEQ ID NO: 1646)

AG2rev: ACCTGGRGARCCRGTWGCACCAGAMGGRGTAGAGCT (SEQ ID NO: 1647)

AG3for: AGGTTCTAGCCCKTCTGCWTCYACYGGTACYGGYCC (SEQ ID NO: 1648)

AG3rev: ACCTGGRCCRGTACCRGTRGAWGCAGAMGGGCTAGA (SEQ ID NO: 1649)

AG4for: AGGTGCWTCYCCKGGYACYAGCTCTACYGGTTCTCC (SEQ ID NO: 1650)

AG4rev: ACCTGGAGAACCRGTAGAGCTRGTRCCMGGRGAWGC (SEQ ID NO: 1651)

Также ренатурируют фосфорилированный олигонуклеотид 3KpnIstopperFor: AGGTTCGTCTTCAC-TCGAGGGTAC (SEQ ID NO: 1626) и нефосфорилированный олигонуклеотид pr_3KpnIstopperRev: CCTCGAGTGAAGACGA (SEQ ID NO: 1627). Лигируют ренатурированные олигонуклеотидные пары, что приводит к смеси продуктов с различной длиной, что представляет различное количество повторений из 12 аминокислот, лигированных с сегментом BbsI/KpnI. С помощью препаративного электрофореза в агарозном геле из смеси выделяют продукты, соответствующие длине в 36 аминокислот, и лигируют в спейсерный вектор pCW0359, расщепляемый BsaI/KpnI. Большинство клонов в полученной библиотеке, обозначенные LCW0404, после индуцирования демонстрируют зеленую флуоресценцию, что иллюстрирует тот факт, что последовательность XTEN_AG36 была лигирована во фрейме с геном GFP и большая часть последовательностей XTEN_AG36 демонстрируют хорошую экспрессию. Проверяют 96 изолятов из библиотеки LCW0404 на высокий уровень флуоресценции штамповкой их на агаровую пластинку, которая содержит IPTG. Подобные изоляты оценивают с помощью PCR и определяют 48 изолятов, которые содержат сегменты с 36 аминокислотами, а также сильную флуоресценцию. Эти изоляты секвенируют и определяют 44 клона, которые содержат правильные XTEN_AG36 сегменты. Имена файлов нуклеотидных и аминокислотных конструкций и последовательностей этих сегментов приведены в табл. 16.

Таблица 16

DNA и аминокислотные последовательности 36-мерных мотивов AG (SEQ ID NOS 441-528, соответственно, в порядке появления)

Имя файла	Аминокислотная последовательность	Нуклеотидная последовательность
LCW0404_001_GFP-N_A07.ab1	GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP	GGTGCATCCCCGGGCACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTACTCCTGGTAGCGGTACTGCTTCTTCTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_003_GFP-N_B07.ab1	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCTACCGGTACCGGTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_006_GFP-N_C07.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP	GGTGCATCTCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACTGGTACCGGCCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGTTCCCCA
LCW0404_007_GFP-N_D07.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP	GGTACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACTGGTTCCCCAGGTGCATCCCCTGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_009_GFP-	GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSRPS	GGTACCCCTGGCAGCGGTACTGCTTCTTCTTCTCCAGGTGCTTCCCCTGGTACCAGCTCTAC

N_E07.ab1	ASTGTGP	CGGTTCTCCAGGTTCTAGACCTTCTGCATCC ACCGGTACTGGTCCA
LCW0404_011_GFP-N_F07.ab1	GASPGTSSTGSPGS STPSGATGSPGASP GTSSTGSP	GGTGCATCTCCTGGTACCAGCTCTACCGGTT CTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTAC TGGCTCTCCAGGTGCTTCCCCGGGTACCAG CTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_012_GFP-N_G07.ab1	GTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSSTP SGATGSP	GGTACCCCGGGCAGCGGTACCGCATCTTCC TCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTA CCGGTTCCCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTG GTGCAACCGGCTCCCCA
LCW0404_014_GFP-N_H07.ab1	GASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGASP GTSSTGSP	GGTGCATCTCCGGGCACTAGCTCTACTGGT TCTCCAGGTGCATCCCCTGGCACTAGCTCTA CTGGTTCTCCAGGTGCTTCTCCTGGTACCAG CTCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_015_GFP-N_A08.ab1	GSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGASP GTSSTGSP	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGC TCCCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCCACTG GTACTGGCCCAGGTGCTTCCCCGGGCACCA GCTCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_016_GFP-N_B08.ab1	GSSTPSGATGSPGS STPSGATGSPGTPG SGTASSSP	GGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACCGGTT CCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTAC TGGTTCCCCAGGTACTCCGGGCAGCGGTAC TGCTTCTTCCTCTCCA
LCW0404_017_GFP-N_C08.ab1	GSSTPSGATGSPGS STPSGATGSPGASP GTSSTGSP	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGT TCCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTA CTGGCTCCCCAGGTGCATCCCCTGGCACCA GCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_018_GFP-N_D08.ab1	GTPGSGTASSSPGS SPSASTGTGPGSSTP SGATGSP	GGTACTCCTGGTAGCGGTACCGCATCTTCCT CTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACCGG TACCGGTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGT GCTACTGGCTCTCCA
LCW0404_023_GFP-N_F08.ab1	GASPGTSSTGSPGS SPSASTGTGPGTPG SGTASSSP	GGTGCTTCCCCGGGCACTAGCTCTACCGGT TCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACTG GTACTGGCCCAGGTACTCCGGGCAGCGGTA CTGCTTCTTCCTCTCCA
LCW0404_025_GFP-N_G08.ab1	GSSTPSGATGSPGS STPSGATGSPGASP GTSSTGSP	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGCT CTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAAC CGGCTCCCCAGGTGCTTCTCCGGGTACCAG CTCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_029_GFP-N_A09.ab1	GTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSSPS ASTGTGP	GGTACCCCTGGCAGCGGTACCGCTTCTTCCT CTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTAC TGGCTCTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCATCT ACCGGTACCGGCCCA
LCW0404_030_GFP-N_B09.ab1	GSSTPSGATGSPGT PGSGTASSSPGTPG SGTASSSP	GGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACCGGCT CCCCAGGTACCCCGGGCAGCGGTACCGCAT CTTCCTCTCCAGGTACTCCGGGTAGCGGTA CTGCTTCTTCTTCTCCA
LCW0404_031_GFP-N_C09.ab1	GTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGASP GTSSTGSP	GGTACCCCGGGTAGCGGTACTGCTTCTTCCT CTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAAC CGGCTCTCCAGGTGCTTCTCCGGGCACCAG CTCTACCGGTTCTCCA

LCW0404_034_GFP-N_D09.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGTGCATCCCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_035_GFP-N_E09.ab1	GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP	GGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTACCCCGGGCAGCGGTACCGCATCTTCTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACTGGTTCTCCA
LCW0404_036_GFP-N_F09.ab1	GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP	GGTTCTAGCCCGTCTGCTTCCACCGGTACTGGCCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACTGGTTCCCCAGGTACCCCTGGTAGCGGTACCGCTTCTTCTTCTCCA
LCW0404_037_GFP-N_G09.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP	GGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCTCCA
LCW0404_040_GFP-N_H09.ab1	GASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP	GGTGCATCCCCGGGCACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTCCA
LCW0404_041_GFP-N_A10.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP	GGTACCCCTGGTAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGTTCTCCAGGTACCCCGGGTAGCGGTACCGCATCTTCTTCTCCA
LCW0404_043_GFP-N_C10.ab1	GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP	GGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACCGGTACTGGCCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACCGGCTCCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACTGGCTCTCCA
LCW0404_045_GFP-N_D10.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP	GGTGCTTCTCCTGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCTACCGGTACTGGTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACTGGTACTGGTCCA
LCW0404_047_GFP-N_F10.ab1	GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP	GGTACTCCTGGCAGCGGTACCGCTTCTTCTTCTCCAGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTGCTTCTCCGGGCACTAGCTCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_048_GFP-N_G10.ab1	GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGTTCCCCAGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTCCA
LCW0404_049_GFP-N_H10.ab1	GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGTTCTCCAGGTACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACTGGCTCTCCA
LCW0404_050_GFP-N_A11.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP	GGTGCATCTCCTGGTACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCTACCGGTACCGGTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_051_GFP-	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTAC

N_B11.ab1	SGATGSP	TGGTTCCCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGT GCAACTGGCTCTCCA
LCW0404_05 2_GFP-N_C11.ab1	GASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGASP GTSSTGSP	GGTGCATCCCCGGGTACCAGCTCTACCGGT TCTCCAGGTACTCCTGGCAGCGGTACTGCA TCTTCCTCTCCAGGTGCTTCTCCGGGCACCA GCTCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_05 3_GFP-N_D11.ab1	GSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGASP GTSSTGSP	GGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACTGGTT CTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCATCCACTGG TACCGGTCCAGGTGCTTCCCCTGGCACCAG CTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_05 7_GFP-N_E11.ab1	GASPGTSSTGSPGS STPSGATGSPGSSPS ASTGTGP	GGTGCATCTCCTGGTACTAGCTCTACTGGTT CTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAA CCGGCTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATC TACCGGTACTGGTCCA
LCW0404_06 0_GFP-N_F11.ab1	GTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGASP GTSSTGSP	GGTACTCCTGGCAGCGGTACCGCATCTTCC TCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAA CTGGTTCCCCAGGTGCTTCTCCGGGTACCA GCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_06 2_GFP-N_G11.ab1	GSSTPSGATGSPGT PGSGTASSSPGSSTP SGATGSP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACCGGC TCCCCAGGTACTCCTGGTAGCGGTACCGCT TCTTCTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTG GTGCTACCGGCTCCCCA
LCW0404_06 6_GFP-N_H11.ab1	GSSPSASTGTGPGS SPSASTGTGPGASP GTSSTGSP	GGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACCGGTACCG GCCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCTACCGG TACTGGTCCAGGTGCTTCTCCGGGTACTAG CTCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_06 7_GFP-N_A12.ab1	GTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSNP SASTGTGP	GGTACCCCGGGTAGCGGTACCGCTTCTTCTT CTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTAC CGGCTCTCCAGGTTCTAACCCTTCTGCATCC ACCGGTACCGGCCCA
LCW0404_06 8_GFP-N_B12.ab1	GSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGASP GTSSTGSP	GGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACTGGTACTG GCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTAC CGGCTCTCCAGGTGCTTCTCCGGGTACTAG CTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_06 9_GFP-N_C12.ab1	GSSTPSGATGSPGA SPGTSSTGSPGTPGS GTASSSP	GGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGC TCTCCAGGTGCATCCCCGGGTACCAGCTCT ACCGGTTCTCCAGGTACTCCGGGTAGCGGT ACCGCTTCTTCCTCTCCA
LCW0404_07 0_GFP-N_D12.ab1	GSSTPSGATGSPGS STPSGATGSPGSSTP SGATGSP	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGT TCCCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAA CCGGCTCCCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGG TGCAACTGGCTCTCCA
LCW0404_07 3_GFP-N_E12.ab1	GASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGSSTP SGATGSP	GGTGCTTCTCCTGGCACTAGCTCTACCGGTT CTCCAGGTACCCCTGGTAGCGGTACCGCAT CTTCCTCTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGG TGCTACTGGTTCCCCA
LCW0404_07 5_GFP-N_F12.ab1	GSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGSSPS ASTGTGP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCT CCCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACCGG TACCGGTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCATCT ACTGGTACTGGTCCA
LCW0404_08 0_GFP-N_G12.ab1	GASPGTSSTGSPGS SPSASTGTGPGSSPS ASTGTGP	GGTGCTTCCCCGGGCACCAGCTCTACTGGT TCTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCTACTG GTACTGGTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTC CACTGGTACTGGTCCA
LCW0404_08 1_GFP-N_H12.ab1	GASPGTSSTGSPGS SPSASTGTGPGTPG SGTASSSP	GGTGCTTCCCCGGGTACCAGCTCTACCGGT TCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCTACCG GTACCGGTCCAGGTACCCCTGGCAGCGGTA CCGCATCTTCCTCTCCA

Пример 5. Построение XTEN_AE864.

XTEN_AE864 строят с помощью серийной димеризации XTEN_AE36 с AE72, 144, 288, 576 и 864. Коллекцию сегментов XTEN_AE72 строят из 37 различных сегментов XTEN_AE36. Культуры E. coli, которые несут все 37 различных 36-аминокислотных сегментов, смешивают и изолируют плазмиду. Этот плазмидный пул расщепляют BsaI/NcoI для того, чтобы получить небольшой фрагмент в качестве вставки. Аналогичный плазмидный пул расщепляют BbsI/NcoI для того, чтобы получить большие фрагмент в качестве вектора. Фрагменты вставки и вектора лигируют, что приводит к удвоению длины и трансформируют смесь для лигирования в клетки BL21Gold(DE3) для получения колоний XTEN_AE72.

Эту библиотеку сегментов XTEN_AE72 обозначают LCW0406. Все клоны из LCW0406 комбинируют и снова димеризуют с использованием такого же способа, как описано выше, с получением библиотеки LCW0410 XTEN_AE144. Все клоны из LCW0410 комбинируют и димеризуют снова с использованием такого же способа, как описано выше, с получением библиотеки LCW0414 of XTEN_AE288. Два

изолята LCW0414.001 и LCW0414.002 выбирают случайным образом из библиотеки и секвенируют для проверки идентичностей. Все клоны из LCW0414 комбинируют и димеризуют снова с использованием такого же способа, как описано выше, с получением библиотеки LCW0418 of XTEN_AE576. Проверяют 96 изолятов из библиотеки LCW0418 на высокий уровень флуоресценции GFP. 8 изоляты с нужными размерами вставок с помощью PCR и сильной флуоресценцией секвенируют и 2 изолята (LCW0418.018 и LCW0418.052) выбирают для дальнейшего использования, основываясь на данных секвенирования и экспрессии.

Специфический клон pCW0432 XTEN_AE864 строят с помощью комбинирования LCW0418.018 XTEN_AE576 и LCW0414.002 XTEN_AE288 с использованием такого же способа димеризации, как описано выше.

Пример 6. Построение XTEN_AM144.

Коллекцию сегментов XTEN_AM144 строят начиная с 37 различных сегментов XTEN_AE36, 44 сегментов XTEN_AF36 и 44 сегментов XTEN_AG36.

Культуры E. coli, которые несут все 125 различные 36-аминокислотные сегменты смешивают и изолируют плазмиду. Этот плазмидный пул расщепляют BsaI/NcoI для того, чтобы получить небольшой фрагмент в качестве вставки. Этот же плазмидный пул расщепляют BbsI/NcoI для того, чтобы получить большие фрагмент в качестве вектора. Фрагменты вставки и вектора лигируют, что приводит к удвоению длины, а смесь для лигирования трансформируют в клетки BL21Gold(DE3) для получения колоний XTEN_AM72.

Эту библиотеку сегментов XTEN_AM72 обозначают LCW0461. Все клоны из LCW0461 комбинируют и димеризуют снова с использованием такого же способа, как описано выше, с получением библиотеки LCW0462. 1512 Изоляты из библиотеки LCW0462 обследуют на экспрессию протеина. Отдельные колонии транспортируют в 96-луночные планшеты и культивируют в течение ночи в качестве стартовых культур. Эти стартовые культуры разбавляют в свежей самоиндуцируемой среде и культивируют в течение 20-30ч. Экспрессию измеряют с использованием спектрофотометра для чтения планшетов с помощью флуоресценции с возбуждением при 395 нм и эмиссией при 510 нм. 192 изолятов демонстрируют высокий уровень экспрессии и подвергают секвенированию DNA. Большинство клонов в библиотеке LCW0462 демонстрируют хорошую экспрессию и схожие физико-химические свойства, предполагающие, что большинство комбинаций сегментов XTEN_AM36 дают применимые последовательности XTEN. В качестве предпочтительной коллекции сегментов XTEN_AM144 в случае построения мультифункциональных протеинов, которые содержат несколько сегментов XTEN выбирают тридцать изолятов из LCW0462. Имена файлов нуклеотидных и аминокислотных конструкций и последовательностей этих сегментов приведены в табл. 17.

Таблица 17
DNA и аминокислотные последовательности сегментов AM144
(SEQ ID NOS 529-594, соответственно, в порядке появления)

Клон	Усеченная последовательность	Белковая последовательность
LCW462_r1	GGTACCCCGGGCAGCGGTACCGCATCTTCCTCTCC	GTPGSGTASSSP
	AGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGTTCCCC	GSSTPSGATGSP
	AGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCC	GSSTPSGATGSP
	CAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCTACCTCTACTGAG	GSPAGSPTSTEE
	GAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCTGG	GTSESATPESGP
	TCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCG	GTSTEPSEGSAP
	CTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACCGGTACCG	GSSPSASTGTGP
	GCCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCTACCGGTACTG	GSSPSASTGTGP
	GTCCAGGTGCTTCTCCGGGTACTAGCTCTACTGGTT	GASPGTSSTGSP
	CTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGC	GTSTEPSEGSAP
	GCACCAGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAG	GTSTEPSEGSAP
	CGCTCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCTG	GSEPATSGSETP
	AAACTCCA	
LCW462_r5	GGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGCACTGCACC	GSTSESPSGTAP
	AGGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACCGCAC	GSTSESPSGTAP
	CAGGTACTTCTCCGAGCGGCGAATCTTCTACTGCTC	GTSPSGESSTAP
	CAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCT	GTSTEPSEGSAP
	CCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCGC	GTSTEPSEGSAP
	ACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCG	GTSESATPESGP
	GTCCAGGTGCATCTCCTGGTACCAGCTCTACCGGTT	GASPGTSSTGSP
	CTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCT	GSSTPSGATGSP
	CTCCAGGTGCTTCCCCGGGTACCAGCTCTACCGGTT	GASPGTSSTGSP
	CTCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTG	GSTSESPSGTAP
	CACCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCGTCTGGCACT	GSTSESPSGTAP
	GCACCAGGTACCTCTACCCCTGAAAGCGGTTCCGC	GTSTPESGSASP
	TTCTCCA	
LCW462_r9	GGTACTTCTACCGAACCTTCCGAGGGCAGCGCACC	GTSTEPSEGSAP
	AGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCCGGCC	GTSESATPESGP
	CAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCCGGT	GTSESATPESGP
	CCAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGC	GTSTEPSEGSAP
	TCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAGTCCG	GTSESATPESGP
	GTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGC	GTSTEPSEGSAP
	GCACCAGGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGTAG	GTSTEPSEGSAP
	CGCTCCAGGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCTG	GSEPATSGSETP
	AAACCCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACCTCC	GSPAGSPTSTEE
	ACCGAGGAAGGTGCTTCTCCTGGCACCAGCTCTAC	GASPGTSSTGSP
	TGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCTACCGG	GSSPSASTGTGP
	TACTGGTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACTGG	GSSPSASTGTGP
	TACTGGTCCA	
LCW462_r10	GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACCCC	GSEPATSGSETP
	AGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCTGGTC	GTSESATPESGP
	CAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCCGGT	GTSESATPESGP
	CCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCACCGCT	GSTSESPSGTAP
	CCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTACCGC	GSTSESPSGTAP
	ACCAGGTACTTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCG	GTSPSGESSTAP
	CACCAGGTGCATCTCCGGGTACTAGCTCTACCGGT	GASPGTSSTGSP
	TCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACTGGTACC	GSSPSASTGTGP
	GGCCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGG	GSSTPSGATGSP
	TTCCCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCG	GSSTPSGATGSP
	GTTCCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTG	GSSTPSGATGSP
	GCTCCCCAGGTGCATCCCCTGGCACCAGCTCTACC	GASPGTSSTGSP
	GGTTCTCCA	
LCW462_r	GGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCA	GASPGTSSTGSP

15	GGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGTCCA	GSSPSASTGTGP
	GGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCTCCA	GSSTPSGATGSP
	GGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAATCTGGCCC	GTSESATPESGP
	AGGTAGCGAACCGGCTACTTCTGGTTCTGAAACCC	GSEPATSGSETP
	CAGGTAGCGAACCGGCTACCTCCGGTTCTGAAACT	GSEPATSGSETP
	CCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCCGG	GTSESATPESGP
	TCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCG	GTSTEPSEGSAP
	CTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGC	GTSTEPSEGSAP
	GCTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAG	GTSTEPSEGSAP
	CGCACCAGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTA	GTSTEPSEGSAP
	GCGCTCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCT	GSEPATSGSETP
	GAAACTCCA	
LCW462_r16	GGTACCTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCC	GTSTEPSEGSAP
	AGGTAGCCCGGCAGGTTCTCCTACTTCCACTGAGG	GSPAGSPTSTEE
	AAGGTACTTCTACCGAACCTTCTGAGGGTAGCGCA	GTSTEPSEGSAP
	CCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCTGAGTCTGG	GTSESATPESGP
	CCCAGGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGCTCTGAGA	GSEPATSGSETP
	CTCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAATCT	GTSESATPESGP
	GGTCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCTACCTCTACT	GSPAGSPTSTEE
	GAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTC	GTSESATPESGP
	TGGTCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCCGAAGGTA	GTSTEPSEGSAP
	GCGCTCCAGGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCT	GSEPATSGSETP
	GAAACTCCAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGG	GTSTEPSEGSAP
	TAGCGCTCCAGGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTT	GSEPATSGSETP
	CTGAAACTCCA	
LCW462_r20	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGCTCC	GTSTEPSEGSAP
	AGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAGGGCAGCGCTC	GTSTEPSEGSAP
	CAGGTACCTCTACCGAACCTTCTGAAGGTAGCGCA	GTSTEPSEGSAP
	CCAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGC	GTSTEPSEGSAP
	TCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAGGGCAGCG	GTSTEPSEGSAP
	CTCCAGGTACCTCTACCGAACCTTCTGAAGGTAGC	GTSTEPSEGSAP
	GCACCAGGTACTTCTACCGAACCTTCCGAGGGCAG	GTSTEPSEGSAP
	CGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGT	GTSESATPESGP
	CCGGCCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAA	GTSESATPESGP
	TCCGGTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGG	GTSTEPSEGSAP
	TAGCGCTCCAGGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTT	GSEPATSGSETP
	CTGAAACCCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACC	GSPAGSPTSTEE
	TCCACCGAGGAA	
LCW462_r23	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCGCTCC	GTSTEPSEGSAP
	AGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAAGGCAGCGCTC	GTSTEPSEGSAP
	CAGGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGTAGCGCA	GTSTEPSEGSAP
	CCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGCT	GSTSESPSGTAP
	CCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGCACCGC	GSTSESPSGTAP
	ACCAGGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGCTCCGCTT	GTSTPESGSASP
	CTCCAGGTAGCGAACCTGCAACCTCTGGCTCTGAA	GSEPATSGSETP
	ACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATC	GTSESATPESGP
	TGGCCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGCA	GTSTEPSEGSAP
	GCGCACCAGGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGT	GTSTEPSEGSAP
	AGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGA	GTSESATPESGP

	ATCCGGCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGG AGTCCGGCCCA	GTSESATPESGP
LCW462_r 24	GGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACCGGCTCTCCA GGTTCTAGCCCGTCTGCTTCTACCGGTACCGGTCCA GGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACTGGTTCTCCA GGTAGCCCTGCTGGCTCTCCGACTTCTACTGAGGA AGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCTACTGAGG AAGGTACTTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCT CCAGGTGCTTCCCCGGGCACTAGCTCTACCGGTTCT CCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACTGGTACTGGC CCAGGTACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTTCCTCT CCAGGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGC CCAGGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCT CCAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGTTCTGCATC TCCA	GSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGP GSSTPSGATGSP GSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAP GASPGTSSTGSP GSSPSASTGTGP GTPGSGTASSSP GSTSSTAESPGP GTSPSGESSTAP GTSTPESGSASP
LCW462_r 27	GGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCC AGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAGTCCGGTC CAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCA CCAGGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGTAGCGC ACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAATCCG GCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCC GGCCCAGGTACTCCTGGCAGCGGTACCGCTTCTTC TTCTCCAGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTACTGG TTCTCCAGGTGCTTCTCCGGGCACTAGCTCTACTGG TTCTCCAGGTAGCCCTGCTGGCTCTCCGACTTCTAC TGAGGAAGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCTA CTGAGGAAGGTACTTCTACCGAACCTTCCGAAGGT AGCGCTCCA	GTSTEPSEGSAP GTSESATPESGP GTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAP GTSESATPESGP GTSESATPESGP GTPGSGTASSSP GASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSP GSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAP
LCW462_r 28	GGTAGCCCAGCAGGCTCTCCGACTTCCACTGAGGA AGGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCAC CAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCT CCAGGTACCTCTACCGAACCGTCTGAAGGTAGCGC ACCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCTGAGTCCG GTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCT GGCCCAGGTACCCCGGGTAGCGGTACTGCTTCTTC CTCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGG CTCTCCAGGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACCG GTTCTCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGC AGCGCTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGA GTCCGGTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAG GTAGCGCACCA	GSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAP GTSESATPESGP GTSESATPESGP GTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSP GTSTEPSEGSAP GTSESATPESGP GTSTEPSEGSAP
LCW462_r 38	GGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTGAAACTCC AGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCCGGCC CAGGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGCTCTGAAACC CCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACCGGCTC CCCAGGTACTCCTGGTAGCGGTACCGCTTCTTCTTC TCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGCTC CCCAGGTGCATCTCCTGGTACCAGCTCTACCGGTTC TCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTC	GSEPATSGSETP GTSESATPESGP GSEPATSGSETP GSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSP GSSTPSGATGSP

	TCCAGGTGCTTCCCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTC	GASPGTSSTGSP
	TCCAGGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGAAA	GSEPATSGSETP
	CTCCAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGC	GTSTEPSEGSAP
	GCTCCAGGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGA	GSEPATSGSETP
	AACTCCA	
LCW462_r39	GGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCTCC	GTSTEPSEGSAP
	AGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCGCAC	GTSTEPSEGSAP
	CAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGT	GTSESATPESGP
	CCAGGTAGCCCTGCTGGCTCTCCGACTTCTACTGA	GSPAGSPTSTEE
	GGAAGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCTACTG	GSPAGSPTSTEE
	AGGAAGGTACTTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGC	GTSTEPSEGSAP
	GCTCCAGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCCAC	GSPAGSPTSTEE
	CGAGGAAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGTA	GTSTEPSEGSAP
	GCGCTCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGC	GTSTEPSEGSAP
	AGCGCTCCAGGTGCTTCCCCGGGCACCAGCTCTAC	GASPGTSSTGSP
	TGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCTACTGG	GSSPSASTGTGP
	TACTGGTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACTGG	GSSPSASTGTGP
	TACTGGTCCA	
LCW462_r41	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGTTCCCCA	GSSTPSGATGSP
	GGTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCA	GASPGTSSTGSP
	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTCCA	GSSTPSGATGSP
	GGTAGCCCTGCTGGCTCTCCAACCTCCACCGAAGA	GSPAGSPTSTEE
	AGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGCC	GTSESATPESGP
	CAGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCTGAAACC	GSEPATSGSETP
	CCAGGTGCATCTCCTGGTACTAGCTCTACTGGTTCT	GASPGTSSTGSP
	CCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGCTC	GSSTPSGATGSP
	TCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACCGGTACTGG	GSSPSASTGTGP
	TCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGC	GSTSESPSGTAP
	TCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGCACCG	GSTSESPSGTAP
	CACCAGGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGCTCCGCT	GTSTPESGSASP
	TCTCCA	
LCW462_r42	GGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCACCGCTCCA	GSTSESPSGTAP
	GGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTACCGCACC	GSTSESPSGTAP
	AGGTACTTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCAC	GTSPSGESSTAP
	CAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCTGGC	GTSESATPESGP
	CCAGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGC	GTSTEPSEGSAP
	TCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCG	GTSTEPSEGSAP
	CACCAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGC	GTSTEPSEGSAP
	GCTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAGTC	GTSESATPESGP
	CGGTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTA	GTSTEPSEGSAP
	GCGCACCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACC	GSSTPSGATGSP
	GGTTCCCCAGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTACC	GASPGTSSTGSP
	GGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACT	GSSTPSGATGSP
	GGCTCTCCA	
LCW462_r43	GGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGGCCC	GSTSSTAESPGP
	AGGTACCTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCC	GTSPSGESSTAP
	AGGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCC	GTSPSGESSTAP
	AGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTCC	GSTSSTAESPGP
	AGGTTCTACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCC	GSTSSTAESPGP

	CAGGTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCTTCTC	GTSTPESGSASP
	CAGGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTC	GTSPSGESSTAP
	CAGGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCC	GSTSSTAESPGP
	CAGGTACTTCTACCCCGGAAAGCGGCTCCGCTTCT	GTSTPESGSASP
	CCAGGTTCTACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGC	GSTSSTAESPGP
	CCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCGTCTGGCACCGC	GSTSESPSGTAP
	ACCAGGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGC ACCA	GTSPSGESSTAP
LCW462_r 45	GGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCATCTCC	GTSTPESGSASP
	AGGTTCTACCAGCGAATCCCCGTCTGGCACCGCAC	GSTSESPSGTAP
	CAGGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGCC	GSTSSTAESPGP
	CAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCT	GTSTEPSEGSAP
	CCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCGC	GTSTEPSEGSAP
	ACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCG	GTSESATPESGP
	GTCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCT	GTSESATPESGP
	GGCCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAG	GTSTEPSEGSAP
	CGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTA	GTSTEPSEGSAP
	GCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAG	GTSESATPESGP
	TCCGGTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAAGG	GTSTEPSEGSAP
	CAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGG GTAGCGCTCCC	GTSTEPSEGSAP
LCW462_r 47	GGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACC	GTSTEPSEGSAP
	AGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTC	GTSTEPSEGSAP
	CAGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCTGAAACT	GSEPATSGSETP
	CCAGGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGTAGCGC	GTSTEPSEGSAP
	ACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAATCCG	GTSESATPESGP
	GCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCC	GTSESATPESGP
	GGCCCAGGTGCATCTCCGGGTACTAGCTCTACCGG	GASPGTSSTGSP
	TTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACTGGTAC	GSSPSASTGTGP
	CGGCCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTG	GSSTPSGATGSP
	GTTCCCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACC	GSSTPSGATGSP
	GGTTCCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACT	GSSTPSGATGSP
	GGCTCCCCAGGTGCATCCCCTGGCACCAGCTCTAC CGGTTCTCCA	GASPGTSSTGSP
LCW462_r 54	GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACTCC	GSEPATSGSETP
	AGGTAGCGAACCTGCAACCTCCGGCTCTGAAACCC	GSEPATSGSETP
	CAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCA	GTSTEPSEGSAP
	CCAGGTAGCGAACCTGCAACCTCTGGCTCTGAAAC	GSEPATSGSETP
	CCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCTG	GTSESATPESGP
	GCCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGCAGC	GTSTEPSEGSAP
	GCACCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGG	GSSTPSGATGSP
	CTCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGG	GSSTPSGATGSP
	CTCCCCAGGTGCTTCTCCGGGTACCAGCTCTACTGG	GASPGTSSTGSP
	TTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGG	GSSTPSGATGSP
	TTCCCCAGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTACCGG	GASPGTSSTGSP
	TTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGG CTCTCCA	GSSTPSGATGSP
LCW462_r 55	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCGCTCC	GTSTEPSEGSAP
	AGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAAGGCAGCGCTC	GTSTEPSEGSAP

	CAGGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGTAGCGCA	GTSTEPSEGSAP
	CCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCCGG	GTSESATPESGP
	TCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCG	GTSTEPSEGSAP
	CTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGC	GTSTEPSEGSAP
	GCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCGTCTGGCACT	GSTSESPSGTAP
	GCTCCAGGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACC	GTSPSGESSTAP
	GCTCCAGGTACTTCCCCTAGCGGCGAATCTTCTACC	GTSPSGESSTAP
	GCTCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCTACCTCTACT	GSPAGSPTSTEE
	GAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTC	GTSESATPESGP
	TGGTCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCCGAAGGTA GCGCTCCA	GTSTEPSEGSAP
LCW462_r57	GGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCC	GTSTEPSEGSAP
	AGGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGAAACCC	GSEPATSGSETP
	CAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACCTCCACCGAG	GSPAGSPTSTEE
	GAAGGTAGCCCGGCAGGCTCTCCGACCTCTACTGA	GSPAGSPTSTEE
	GGAAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCG	GTSESATPESGP
	GCCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCTGAGGGCAGC	GTSTEPSEGSAP
	GCACCAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAG	GTSTEPSEGSAP
	CGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGCA	GTSTEPSEGSAP
	GCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAA	GTSESATPESGP
	TCCGGTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAAC	GSSTPSGATGSP
	CGGCTCCCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCCACTGG	GSSPSASTGTGP
	TACTGGCCCAGGTGCTTCCCCGGGCACCAGCTCTA CTGGTTCTCCA	GASPGTSSTGSP
LCW462_r61	GGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGCTCTGAGACTCC	GSEPATSGSETP
	AGGTAGCCCTGCTGGCTCTCCGACCTCTACCGAAG	GSPAGSPTSTEE
	AAGGTACCTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCTGGC	GTSESATPESGP
	CCAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGC	GTSTEPSEGSAP
	TCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCG	GTSTEPSEGSAP
	CACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCC	GTSESATPESGP
	GGTCCAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGC	GTSTPESGSASP
	ATCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCGTCTGGCA	GSTSESPSGTAP
	CCGCACCAGGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTC	GSTSSTAESPGP
	CGGGCCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAG	GTSESATPESGP
	TCCGGTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAAGG	GTSTEPSEGSAP
	CAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGG GTAGCGCTCCA	GTSTEPSEGSAP
LCW462_r64	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCGCTCC	GTSTEPSEGSAP
	AGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAAGGCAGCGCTC	GTSTEPSEGSAP
	CAGGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGTAGCGCA	GTSTEPSEGSAP
	CCAGGTACCTCTACCGAACCGTCTGAAGGTAGCGC	GTSTEPSEGSAP
	ACCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCTGAGTCCG	GTSESATPESGP
	GTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCT	GTSESATPESGP
	GGCCCAGGTACTCCTGGCAGCGGTACCGCATCTTC	GTPGSGTASSSP
	CTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACTGG	GSSTPSGATGSP
	TTCCCCAGGTGCTTCTCCGGGTACCAGCTCTACCGG	GASPGTSSTGSP
	TTCTCCAGGTTCCACCAGCTCTACTGCTGAATCTCC	GSTSSTAESPGP
	TGGTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTAC	GTSPSGESSTAP
	TGCTCCAGGTACTTCTACTCCTGAAAGCGGCTCTGC	GTSTPESGSASP

	TTCTCCA	
LCW462_r67	GGTAGCCCGGCAGGCTCTCCGACCTCTACTGAGGA	GSPAGSPTSTEE
	AGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGGCC	GTSESATPESGP
	CAGGTACCTCTACCGAACCGTCTGAGGGCAGCGCA	GTSTEPSEGSAP
	CCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGG	GTSESATPESGP
	TCCAGGTAGCGAACCGGCTACTTCTGGCTCTGAGA	GSEPATSGSETP
	CTCCAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGTAGC	GTSTEPSEGSAP
	GCACCAGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCCAC	GSPAGSPTSTEE
	CGAGGAAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGTA	GTSTEPSEGSAP
	GCGCTCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGC	GTSTEPSEGSAP
	AGCGCTCCAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGG	GTSTEPSEGSAP
	CAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAAG	GTSTEPSEGSAP
	GCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCCGAA	GTSTEPSEGSAP
	GGTAGCGCACCA	
LCW462_r69	GGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACCGCACC	GTSPSGESSTAP
	AGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGCC	GSTSSTAESPGP
	CAGGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCTC	GTSPSGESSTAP
	CAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCTGGC	GTSESATPESGP
	CCAGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGC	GTSTEPSEGSAP
	TCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCG	GTSTEPSEGSAP
	CACCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACTGGTACTG	GSSPSASTGTGP
	GCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACCGGCT	GSSTPSGATGSP
	CTCCAGGTGCTTCTCCGGGTACTAGCTCTACCGGTT	GASPGTSSTGSP
	CTCCAGGTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCA	GTSTPESGSASP
	TCTCCAGGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACT	GTSPSGESSTAP
	GCTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACT	GTSPSGESSTAP
	GCTCCA	
LCW462_r70	GGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCTGGCCC	GTSESATPESGP
	AGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTC	GTSTEPSEGSAP
	CAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCA	GTSTEPSEGSAP
	CCAGGTAGCCCTGCTGGCTCTCCGACTTCTACTGA	GSPAGSPTSTEE
	GGAAGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCTACTG	GSPAGSPTSTEE
	AGGAAGGTACTTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGC	GTSTEPSEGSAP
	GCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACCGGTACT	GSSPSASTGTGP
	GGCCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACCGG	GSSTPSGATGSP
	CTCCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACTGG	GSSTPSGATGSP
	CTCTCCAGGTAGCGAACCGGCAACTTCCGGCTCTG	GSEPATSGSETP
	AAACCCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAG	GTSESATPESGP
	TCTGGCCCAGGTAGCGAACCTGCTACCTCTGGCTC	GSEPATSGSETP
	TGAAACCCCA	
LCW462_r72	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGCTCC	GTSTEPSEGSAP
	AGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAGGGCAGCGCTC	GTSTEPSEGSAP
	CAGGTACCTCTACCGAACCTTCTGAAGGTAGCGCA	GTSTEPSEGSAP
	CCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGTTCC	GSSTPSGATGSP
	CCAGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTACCGGTTCT	GASPGTSSTGSP
	CCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCT	GSSTPSGATGSP
	CCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGG	GTSESATPESGP
	TCCAGGTAGCGAACCGGCTACTTCTGGCTCTGAGA	GSEPATSGSETP
	CTCCAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGTAGC	GTSTEPSEGSAP

	GCACCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACT	GSTSESPSGTAP
	GCACCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCGTCTGGCAC	GSTSESPSGTAP
	TGCACCAGGTACCTCTACCCCTGAAAGCGGTTCCG	GTSTPESGSASP
	CTTCTCCA	
LCW462_r73	GGTACCTCTACTCCTGAAAGCGGTTCTGCATCTCCA	GTSTPESGSASP
	GGTTCCACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGCCC	GSTSSTAESPGP
	AGGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCC	GSTSSTAESPGP
	AGGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACTGGTACTGGCCC	GSSPSASTGTGP
	AGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACCGGCTCTCC	GSSTPSGATGSP
	AGGTGCTTCTCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCC	GASPGTSSTGSP
	AGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTGAAACCC	GSEPATSGSETP
	CAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCCGGC	GTSESATPESGP
	CCAGGTAGCCCGGCAGGTTCTCCGACTTCCACTGA	GSPAGSPTSTEE
	GGAAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTG	GSTSESPSGTAP
	CACCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCGTCTGGCACT	GSTSESPSGTAP
	GCACCAGGTACCTCTACCCCTGAAAGCGGTTCCGC	GTSTPESGSASP
	TTCTCCC	
LCW462_r78	GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCTACCTCTACTGAGGA	GSPAGSPTSTEE
	AGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCTGGTC	GTSESATPESGP
	CAGGTACCTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCT	GTSTEPSEGSAP
	CCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCACCGCT	GSTSESPSGTAP
	CCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTACCGC	GSTSESPSGTAP
	ACCAGGTACTTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCG	GTSPSGESSTAP
	CACCAGGTACCTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGC	GTSTEPSEGSAP
	GCTCCAGGTAGCCCGGCAGGTTCTCCTACTTCCACT	GSPAGSPTSTEE
	GAGGAAGGTACTTCTACCGAACCTTCTGAGGGTAG	GTSTEPSEGSAP
	CGCACCAGGTAGCGAACCTGCAACCTCTGGCTCTG	GSEPATSGSETP
	AAACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAA	GTSESATPESGP
	TCTGGCCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGG	GTSTEPSEGSAP
	CAGCGCACCA	
LCW462_r79	GGTACCTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCC	GTSTEPSEGSAP
	AGGTAGCCCGGCAGGTTCTCCTACTTCCACTGAGG	GSPAGSPTSTEE
	AAGGTACTTCTACCGAACCTTCTGAGGGTAGCGCA	GTSTEPSEGSAP
	CCAGGTACCTCCCCTAGCGGCGAATCTTCTACTGCT	GTSPSGESSTAP
	CCAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCT	GTSPSGESSTAP
	CCAGGTACCTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGC	GTSPSGESSTAP
	ACCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGTACTG	GSTSESPSGTAP
	CTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGCACC	GSTSESPSGTAP
	GCACCAGGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGCTCCGC	GTSTPESGSASP
	TTCTCCAGGTAGCGAACCTGCAACCTCTGGCTCTG	GSEPATSGSETP
	AAACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAA	GTSESATPESGP
	TCTGGCCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGG	GTSTEPSEGSAP
	CAGCGCACCA	
LCW462_r87	GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACCCC	GSEPATSGSETP
	AGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCTGGTC	GTSESATPESGP
	CAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCCGGT	GTSESATPESGP
	CCAGGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACCGC	GTSPSGESSTAP
	ACCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGG	GSTSSTAESPGP
	GCCCAGGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACT	GTSPSGESSTAP

	GCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTACT GCTCCAGGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACT GCTCCAGGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTCC GGGTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCG GTTCCCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCG GCTCCCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAAACT GGCTCTCC	GSTSESPSGTAP GTSPSGESSTAP GSTSSTAESPGP GSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSP GSSTPSGANWL S
LCW462_r88	GGTAGCCCTGCTGGCTCTCCGACTTCTACTGAGGA AGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCTACTGAGG AAGGTACTTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCT CCAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGC TCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCG CACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCC GGTCCAGGTGCATCTCCTGGTACCAGCTCTACCGG TTCTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGG CTCTCCAGGTGCTTCCCCGGGTACCAGCTCTACCG GTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTG GTTCTCCAGGTACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTT CCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACTG GCTCTCCA	GSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAP GTSESATPESGP GASPGTSSTGSP GSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSP GSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSP
LCW462_r89	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGTTCTCCA GGTACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCA GGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACTGGCTCTCCA GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCTACCTCTACTGAGGA AGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCTGGTC CAGGTACCTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCT CCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCTGAGTCTGG CCCAGGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGCTCTGAGA CTCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAATCT GGTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGTAG CGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAAT CCGGCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAG TCCGGCCCA	GSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSP GSPAGSPTSTEE GTSESATPESGP GTSTEPSEGSAP GTSESATPESGP GSEPATSGSETP GTSESATPESGP GTSTEPSEGSAP GTSESATPESGP GTSESATPESGP

Пример 7. Построение XTEN_AM288.

Всю библиотеку LCW0462 димеризуют, как описано в примере 6, что приводит к библиотеке клонов XTEN_AM288, обозначенной LCW0463. 1512 изолятов из библиотеки LCW0463 обследуют с использованием протокола, описанного в примере 6. 176 высоко экспрессированных клонов секвенируют и выбирают 40 предпочтительных сегментов XTEN_AM288 для построения мультифункциональных протеинов, которые содержат несколько сегментов XTEN с 288 аминокислотными остатками.

Пример 8. Построение XTEN_AM432.

Получают библиотеку сегментов XTEN_AM432 с помощью сегментов рекомбинирования из библиотеки LCW0462 сегментов XTEN_AM144 и сегменты из библиотеки LCW0463 сегментов XTEN_AM288. Эту новую библиотеку сегментов XTEN_AM432 обозначают LCW0464. Плазмиды выделяют из культур E. coli, которые несут LCW0462 и LCW0463 соответственно. 1512 изолятов из библиотеки LCW0464 обследуют с использованием протокола, описанного в примере 6. 176 высоко экспрессированных клонов секвенируют и выбирают 39 предпочтительных сегментов XTEN_AM432 для построения более длинного XTEN и для построения мультифункциональных протеинов, которые содержат несколько сегментов XTEN с 432 аминокислотных остатков.

Одновременно с этим строят библиотеку LMS0100 сегментов XTEN_AM432 с использованием предпочтительных сегментов XTEN_AM144 и XTEN_AM288. Тестирование этой библиотеки дает 4 изолята, которые выбирают для дополнительного конструирования.

Пример 9. Построение XTEN_AM875.

Спейсерный вектор pCW0359 расщепляют BsaI и KpnI для удаления спейсерного сегмента, а получаемый фрагмент вектора выделяют с помощью очистки на агарозном геле.

Ренатурируют фосфорилированный олигонуклеотид BsaI-AscI-KpnIforP:
AGGTGCAAGCGCAAGCGGCGCGCCAAGCACGGGAGGTTCGTCTTCACTCGAGGGTAC (SEQ ID NO: 1652) и нефосфорилированный олигонуклеотид BsaI-AscI-KpnIrev:
CCTCGAGTGAAGACGAACCTCCCGTGCTTGGCGCGCCGCTTGCGCTTGC (SEQ ID NO: 1653) для введения островка для секвенирования A (SI-A), который кодирует аминокислоты GASASGAPSTG (SEQ ID NO: 1654) и имеет внутри рестрикционный фермент AscI распознавания нуклеотидной последовательности GGCGCGCC. Лигируют ренатурированные олигонуклеотидные пары BsaI и KpnI расщепляемым спейсерным вектором pCW0359, полученным выше для получения pCW0466, который содержит SI-A. Затем получают библиотеку сегментов XTEN_AM443 с помощью рекомбинирования 43 предпочтительных сегментов XTEN_AM432 в примере 8 и сегментов SI-A из pCW0466 на С-конце с использованием такого же способа димеризации, описанного в примере 5. Эту новую библиотеку сегментов XTEN_AM443 обозначают LCW0479. Получают библиотека сегментов XTEN_AM875 с помощью сегментов рекомбинирования из библиотеки LCW0479 сегментов XTEN_AM443 и 43 предпочтительных сегментов

XTEN_AM432 из примера 8 с использованием такого же способа димеризации, описанного в примере 5. Эту новую библиотеку сегментов XTEN_AM875 обозначают LCW0481.

Пример 10. Построение XTEN_AM1318.

Ренатурируют фосфорилированный олигонуклеотид BsaI-FseI-KpnIforP: AGGTCCAGAACCAACGGGGCCGGCCCCAAGCGGAGGTTCGTCTTCACTCGAGGGTAC (SEQ ID NO: 1655) и нефосфорилированный олигонуклеотид BsaI-FseI-KpnIrev: CCTCGAGTGAAGACGAACCTCCGCTTGGGGCCGGCCCCGTTGGTTCTGG (SEQ ID NO: 1656) для введения островка для секвенирования B (SI-B), который кодирует аминокислоты GPEPTGPAPSG (SEQ ID NO: 1657) и имеет рестрикционный фермент FseI распознавания нуклеотидной последовательности GGCCGGCC внутри. Лигируют ренатурированные олигонуклеотидные пары BsaI и KpnI, расщепляемыми спейсерным вектором pCW0359, как используют в примере 9 для получения pCW0467, который содержит SI-B. Затем получают библиотеку сегментов XTEN_AM443 с помощью рекомбинирования 43 предпочтительных сегментов XTEN_AM432 из примера 8 и сегментов SI-B из pCW0467 на C-конце, с использованием такого же способа димеризации, описанного в примере 5. Эту новую библиотеку сегментов XTEN_AM443 обозначают LCW0480.

Получают библиотеку сегментов XTEN_AM1318 с помощью сегментов рекомбинирования из библиотеки LCW0480 сегментов XTEN_AM443 и сегменты из библиотеки LCW0481 сегментов XTEN_AM875 с использованием такого же способа димеризации, как в примере 5. Эту новую библиотеку сегмента XTEN_AM1318 обозначают LCW0487.

Пример 11. Построение XTEN_AD864.

С использованием нескольких последовательных циклов димеризации, собирают коллекцию последовательностей XTEN_AD864, начиная с сегментов XTEN_AD36, приведенных в примере 1. Эти последовательности собирают как описано в примере 5. Некоторые изоляты XTEN_AD864 оценивают и определяют, чтобы продемонстрировать хорошую экспрессию и превосходную растворимость при физиологических условиях. Секвенируют промежуточную конструкцию XTEN_AD576. Этот клон оценивают в эксперименте PK на яванских макаках и измеряют время полужизни около 20 ч.

Пример 12. Построение XTEN_AF864.

С использованием нескольких последовательных циклов димеризации, собирают коллекцию последовательностей XTEN_AF864, начиная с сегментов XTEN_AF36, приведенных в примере 3. Эти последовательности собирают, как описано в примере 5. Некоторые изоляты XTEN_AF864 оценивают и определяют, чтобы продемонстрировать хорошую экспрессию и превосходную растворимость при физиологических условиях. Промежуточную конструкцию XTEN_AF540 секвенируют. Этот клон оценивают в эксперименте PK на яванских макаках и измеряют время полужизни около 20ч. Полноразмерный клон XTEN_AF864 имеет превосходную растворимость и демонстрирует время полужизни, которое в случае яванских макак превышает 60ч. Собирают второй набор последовательностей XTEN_AF, который содержит островок для секвенирования, как описано в примере 9.

Пример 13. Построение XTEN_AG864.

С использованием нескольких последовательных циклов димеризации, собирают коллекцию последовательностей XTEN_AG864, начиная с сегментов XTEN_AD36, приведенных в примере 1. Эти последовательности собирают, как описано в примере 5. Некоторые изоляты XTEN_AG864 оценивают и определяют, чтобы продемонстрировать хорошую экспрессию и превосходную растворимость при физиологических условиях. Полноразмерный клон XTEN_AG864 имеет превосходную растворимость и демонстрирует время полужизни, которое в случае яванских макак превышает 60ч.

Пример 14. Способы получения и оценки CFXTEN с внутренним и концевым XTEN.

Создание, построение и оценка CFXTEN, который содержит FVIII и один или несколько XTEN, осуществляют с использованием систематического подхода. Области, подходящие для инсерционных сайтов XTEN содержат, но без ограничения ими, области в, или близкие к, известным границам домена FVIII, границам экзона, известным наружным петлям, областям с низкой степенью порядка и гидрофильными областями. С помощью анализа вышеуказанного, различные области по всей последовательности последовательности FVIII без домена B (BDD) идентифицируют в качестве инсерционных сайтов XTEN, Неограничивающие примеры которых приводят в табл. 5-8, и схематически иллюстрируют на фиг. 8 и 9. Сначала, создают отдельные конструкции (с использованием способов, описанных ниже) в которых DNA кодирует уникальный XTEN или фрагмент XTEN с длиной, изменяющейся в диапазоне от 6 до 2004 аминокислотных остатков, вводят в последовательность FVIII, соответствующую, или близкую (например, в пределах 6 аминокислот) каждому из уникальных инсерционных сайтов, которые определены в табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9, а получаемые конструкции, которые экспрессируют и восстанавливают протеин, затем оценивают на их влияние на сохранение использования прокоагулянтной активности, например, один из in vitro анализов из табл. 49. Например, с использованием способов, описанных ниже, создают конструкции, в которые последовательность XTEN вводят в пределах последовательностей доменов FVIII A1, A2, B, A3, C1 и C2, а также связанных с C-концом, а получаемые экспрессируют гибридные белки оценивают с помощью хромогенного анализа из табл. 49, по сравнению с FVIII, не связанным с XTEN. Гибридные белки CFXTEN могут быть дополнительно разделены, действуя в со-

ответствии с высокой, средней и низкой категориями, основанными на действиях, которое они проявляют. В тех случаях, когда CFXTEN проявляет активность, что сопоставимо или незначительно ниже, по сравнению с FVIII, инсерционный сайт считается подходящим. В тех случаях, когда активность является промежуточной, инсерционный сайт может быть изменен на 1-6 аминокислот по направлению к N- или С-концу инсерционного сайта и/или могут быть изменены длина или суммарный заряд XTEN, а полученную конструкцию(и) оценивают повторно, чтобы определить, улучшается ли активность. Кроме того, XTEN вводят в конструкцию с фланкирующими сайтами расщепления; предпочтительно, сайты, которые являются восприимчивыми к расщеплению с помощью протеаз, обеспечивают в анализах коагулирующей активности, так что XTEN высвобождают во время активации компонента FVIII, тем самым обеспечивая дополнительную информацию о пригодности инсерционного сайта XTEN в гибридном белке.

Как только оценивают все отдельные инсерционные сайты и определяют благоприятные инсерционные сайты, создают библиотеки конструкций с двумя, тремя, четырьмя, пятью или более XTEN, вводимыми в пермутации благоприятных сайтов. Длина и суммарный заряд XTEN (например, XTEN семейство AE в зависимости от AG) изменяют для того, чтобы определить влияния этих переменных на активность FVIII и физико-химические свойства гибридного белка. Конструкции CFXTEN, которые сохраняют нужную степень прокоагулянтной активности FVIII in vitro затем оценивают in vivo с использованием мышиной и/или собачьей модели гемофилии А, как описано в примерах ниже, или других моделях, известных в данной области техники. Кроме того, конструкции анализируют в присутствии ингибиторов FVIII и других анти-FVIII антител, для определения конструкций, которые сохраняют активность. Кроме того, создают конструкции CFXTEN, которые встраивают расщепленные последовательности в, или около, область(и) соединения FVIII и XTEN (например, последовательностей из табл. 8), разработанную для секретирование XTEN, и оценивают на повышение активности FVIII и влияния на конечное время полужизни. С помощью циклического способа получения конструкций, комбинирующих различные инсерционные сайты, различных длин и качеств и оценки композиции XTEN (например, различные семейства XTEN), специалист получает, с помощью вышеуказанных способов, CFXTEN с нужными свойствами, такими как, но без ограничения ими, прокоагулянтная активность FVIII, сниженное связывание с ингибиторами FVIII, улучшенные фармакокинетические свойства, способность вводить субъекту различными путями и/или улучшенные фармацевтические свойства.

Пример 15. Способы получения и оценки CFXTEN, который содержит FVIII и AE_XTEN.

Общая схема получения и оценки композиций CFXTEN проиллюстрированы на фиг. 15, и формирует основу для общего описания данного Примера. Использование раскрытых способов и те, которые известны любому специалисту в данной области техники, вместе с указаниями, обеспечиваемыми в иллюстративных Примерах, квалифицированный специалист в данной области техники может создавать и оценивать гибридные белки CFXTEN, которые содержат XTEN и FVIII, или варианты FVIII, известные в данной области техники. Пример, таким образом, должен быть истолкован в качестве исключительно иллюстративных, а не ограничивающих способов в любой форме; многочисленные вариации будут очевидны специалисту в данной области. В этом Примере, создают CFXTEN фактора VIII BDD, связанный с XTEN семейством AE мотивов.

Общая схема получения полинуклеотидов, кодирующих XTEN, проиллюстрирована на фиг. 11 и 12. Фиг. 14 представляет собой принципиальную блок-схему репрезентативных этапов сборки полинуклеотидной конструкции XTEN в отдельных вариантах осуществления настоящего изобретения. Отдельные олигонуклеотиды 501 ренатурируют в мотивы последовательности 502, такие как 12-аминокислотный мотив ("12-мер"), который лигируют дополнительными мотивами последовательности из библиотеки, которые могут мультимеризовать для создания пула, который охватывает нужную длину XTEN 504, а также лигируют более малой концентрацией олигосодержащих сайтов рестрикции BbsI и KpnI 503. Библиотеки мотивов содержат специфическую последовательность семейства XTEN; например, последовательности AD, AE, AF, AG, AM или AQ из табл. 3., как проиллюстрировано на фиг. 14, длина XTEN, в данном случае, составляет 36 аминокислотных остатков, но большие длины достигают с помощью этого общего способа. Например, мультимеризацию осуществляют с помощью лигирования, PCR с перекрывающимися праймерами, PCR-сборкой или схожими способами клонирования, известными в данной области техники, которые, в данном случае, приводят к конструкции с 288 аминокислотными остатками. Получаемый пул продуктов лигирования очищают на геле и обрезают бэнд с нужной длиной XTEN, что приводит к изолированному гену XTEN с последовательностью-стоппером 505. Ген XTEN может быть клонирован в спейсерный вектор. В данном случае, вектор кодирует дополнительную последовательность CBD 506 и ген GFP 508. Затем осуществляют расщепление с BbsI/HindIII для удаления 507 и 508 и размещения стоп-кодона. Затем получаемые продукт клонируют в расщепляемый вектор BsaI/HindIII, который содержит ген, кодирующий FVIII, что приводит к гену 500, кодирующему гибридный белок CFXTEN с 288 аминокислотным XTEN, связанному с С-концом фактора VIII. Как должно быть очевидно любому специалисту в данной области техники, способы используют для создания конструкций в альтернативных конформациях, с различными длинами XTEN или в нескольких локализациях.

Последовательности DNA, кодирующие FVIII, обычно получают с помощью стандартных способов, известных в данной области техники, из библиотеки cDNA, полученной из соответствующего кле-

точного источника, из геномной библиотеки, или может быть создана синтетически (например, автоматизированный нуклеотидный синтез) с использованием последовательности DNA, полученной из общедоступных баз данных, патентов, или литературных источников. В настоящем примере, получают вариант FVIII без домена B (BDD), как описано в примере 17. Ген или полинуклеотид, кодирующий часть протеина FVIII или его комплемент затем клонируют в конструкции, такой как описана в данном документе, которая может быть плазмидой или другим вектором под контролем соответствующих последовательностей транскрипции и трансляции на высоком уровне экспрессии протеина в биологической системе. Второй ген или полинуклеотид, кодирующий часть XTEN или его комплемент, генетически сливают с нуклеиновыми кислотами, кодирующими конец гена FVIII с помощью клонирования его в конструкцию по соседству и во фрейме с геном, кодирующим CF, через этап лигирования или мультимеризации. Таким образом, в пределах конструкции получают слитую молекулу DNA, кодирующую (или комплементарную к) гибридный белок CFXTEN., необязательно, ген, кодирующий второй XTEN вводят и лигируют внутри рамки считывания, внутренней по отношению к нуклеиновым кислотам, кодирующим FVIII-кодирующую область. Конструкции создают в различных конформациях, чтобы кодировать различные инсерционные сайты XTEN в последовательностях FVIII, которые содержит таковые из табл. 5, табл. 6, табл. 7, табл. 8 и табл. 9 или те, которые проиллюстрированы на фиг. 8-9., необязательно, слитую молекулу DNA транспортируют или клонируют в другую конструкцию, которая представляет собой более соответствующий экспрессирующий вектор; например, вектор, соответствующий клетке-хозяину млекопитающего, такой как CHO, BHK и подобные. В этот момент, клетку-хозяина, способную к экспрессированию слитой молекулы DNA, трансформируют со слитой молекулой DNA, описаной более полно ниже, или с помощью хорошо известных способов, в зависимости от типа клетки-хозяина, как описано выше.

Клетки-хозяева, которые содержат XTEN-FVIII, экспрессирующие вектор, культивируют в обычных питательных средах, измененных таким образом, чтобы соответствовать активизации промотора. Условия культивирования, такие как температура, pH и подобное, которые, ранее использовали в клетке-хозяине, выбранной для экспрессии, и будут очевидны специалисту в данной области. После экспрессии гибридного белка, культуральный бульон собирают и отделяют от клеточной массы и получают неочищенный экстракт, сохраненный для очистки гибридного белка.

Экспрессию гена измеряют непосредственно в образце, например, с помощью обычного саузерн-блоттинга, нозерн-блоттинга для количественной оценки транскрипции mRNA [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], дот-блоттинга (анализа DNA), или in situ гибридизации, с использованием соответственно меченого зонда, основываясь на последовательности, обеспечиваемой в данном документе. Кроме того, экспрессию гена измеряют с помощью иммунологических флуоресцентных способов, таких как иммуногистохимическое окрашивание клеток для непосредственной количественной оценки продукт экспрессии гена. Антитела, применимые для иммуногистохимического окрашивания и/или анализа пробных жидкостей, могут быть либо моноклональными, либо поликлональными, и может быть получены для любого млекопитающего. В целях удобства, могут быть получены антитела против полипептида последовательности FVIII с использованием синтетического пептида, основываясь на последовательностях, которые обеспечивают в данном документе, или против экзогенной последовательности, слитой с FVIII, и кодирующей специфический эпитоп антитела. Примеры селектируемых маркеров хорошо известны специалистам в данной области техники и содержат репортеры, такие как улучшенный зеленый флуоресцентный белок (EGFP), бета-галактозидаза (β-gal) или хлорамфеникол-ацетилтрансфераза (CAT).

Полипептидный продукт CFXTEN очищают с помощью способов, известных в данной области техники. Способы, такие как гель-хроматография, аффинная очистка, фракционирование солями, ионообменная хроматография, гель-проникающая хроматография, адсорбционная хроматография на гидроксиапатите, хроматография с гидрофобным взаимодействием или гель-электрофорез представляют собой все способы, которые могут использоваться в очистке. Специфические способы очистки описаны в Robert K. Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Charles R. Castor, ed., Springer-Verlag 1994, и Sambrook, et al., выше. Многоэтапные очищающие разделения также описаны у Baron, et al., Crit. Rev. Biotechnol. 10:179-90 (1990) и Below, et al., J. Chromatogr. A. 679:67-83 (1994).

Как проиллюстрировано на фиг. 15, изолированные гибридные белки CFXTEN характеризуются их химическими свойствами и свойствами активности. Изолированный гибридный белок характеризуется, например, последовательностью, чистотой, средней молекулярной массой, растворимостью и стабильным использованием стандартных способов, известных в данной области техники. Гибридный белок, удовлетворяющий предполагаемым стандартам, оценивают на активность, которая может быть измерена in vitro или in vivo с помощью измерения одного из связанных с фактором VIII параметров, описанных в данном документе, с использованием одного или нескольких анализов, раскрытых в данном документе, или с использованием анализов из примеров или табл. 49.

Кроме того, гибридный белок FVIII CFXTEN вводят с одним или несколькими животными видами для определения стандартных фармакокинетических параметров и фармакодинамических свойств, как описано в примерах 25 и 26.

С помощью циклического способа получения, экспрессии и извлечения конструкций CFXTEN, с последующей их характеристикой с использованием способов, раскрытых в данном документе или других известных в данной области техники, композиции CFXTEN, которые содержат CF, и XTEN получают и оценивают для подтверждения ожидаемых свойств, таких как улучшенная растворимость, улучшенная стабильность, улучшенные фармакокинетические свойства и сниженная иммуногенность, которые ведут к, в целом, улучшенной терапевтической активности, по сравнению с соответствующим неслитым FVIII. Для этих слитых белков, не обладающих требуемыми свойствами, конструируют различную последовательность или конформацию, экспрессируют, изолируют и оценивают с помощью этих способов, для того, чтобы получить композиции с подобными свойствами.

Пример 16. Построение экспрессирующих плазмидов BDD FVIII.

I. Построение экспрессирующих векторов FVIII без домена B (BDD FVIII).

Экспрессирующий вектор, который кодирует BDD FVIII, создают с помощью клонирования открытой рамки считывания FVIII BDD в вектор pcDNA4 (Invitrogen, CA), который содержит polyA для обеспечения оптимальной экспрессии гена FVIII млекопитающего, что приводит к конструкции, обозначенной pBC0100. Некоторые природный сайты определяют в пределах этой конструкция для использования при клонировании, которая содержит BsiWI 48, AflII 381, PshAI 1098, KpnI 1873, BamHI 1931, PflMI 3094, ApaI 3574, XbaI 4325, NotI 4437, XhoI 4444, BstEII 4449, AgeI 4500, PmeI 4527. Для облегчения проведения анализа, нуклеиновые кислоты, кодирующие Myc и гистидиновую метки, вводят в открытую рамку считывания FVIII. pBC0100 амплифицируют способом PCR с использованием следующих праймеров: 1) F8-BsiWI-F: tattccCGTACGgccgccaccATGCAAATAGAGCTCTCCACCT (SEQ ID NO: 1658); 2) F8-nostop-XhoI-R1: GGTGACCTCGAGcgtagaggtcctgtgcctcg (SEQ ID NO: 1659) для введения BsiWI и XhoI в соответствующие локализации. Продукт PCR расщепляют BsiWI и XhoI. PcDNA4-Myc-His/C расщепляют Acc65I и XhoI, из которого получают два продукта 5003 и 68 bps. 5003bps продукт лигируют расщепляемым фрагментом FVIII, который подвергают PCR, и используют для трансформации DH5alpha. Энзимы Acc65I и BsiWI создают совместимые концы, но это лигирование подавляет сайт в случае дальнейшего расщепления. Получаемую конструкцию обозначают pBC0102 (pcDNA4-FVIII_3-Myc-His). Для облегчения разработки и осуществления будущих стратегий клонирования, особенно тех, которые содержат создание экспрессирующих конструкций BDD FVIII, содержащих несколько вставок XTEN, выбирают дополнительные уникальные сайты рестрикционных ферментов для включения, которые содержат BsiWI 908, NheI 1829 и ClaI 3281. Введение этих сайтов осуществляют посредством способа QuikChange (Agilent, CA) индивидуально. Получаемую конструкцию обозначают pBC0112 (pcDNA4-FVIII_4-Myc-His). Чтобы избежать проблем, которые могут возникать с линкерными пептидами, которые соединяют между Myc/His и FVIII/Myc, и для удаления сайтов рестрикционных ферментов, которые являются предпочтительными для дальнейшей вставки XTEN, подвергают мутации последовательности, кодирующие пептидные последовательности от ARGHPF (SEQ ID NO: 1660) до GAGSPGAETA (SEQ ID NO: 178) (между FVIII и Myc), от NMHTG (SEQ ID NO: 1661) до SPATG (SEQ ID NO: 1662) (между Myc и His) посредством способа QuikChange. Конструкцию обозначают pBC0114 (pcDNA4-FVIII_4-GAGSPGAETA-Myc-SPATG-His (GAGSPGAETA и SPATG, раскрытые как SEQ ID NOS 178 и 1662, соответственно)) (последовательность в табл. 21), которые используют в качестве основного вектора для построения и создания других экспрессирующих векторов, инкорпорированных в последовательности XTEN. Данные экспрессии и активности FVIII для этой конструкции представлены.

II. Построение экспрессирующих векторов FVIII без домена B (BDD FVIII).

Ген, кодирующий BDD FVIII, синтезируют с помощью GeneArts (Регенсбург, Германия) в векторе клонирования pMK (pMK-BDD FVIII). Протеины FVIII BDD содержат 1457 аминокислот с общей молекулярной массой 167539,66. В пределах протеина FVIII дикого типа находятся 6 доменов, домены A1, A2, B, A3, C1 и C2. В протеине FVIII BDD, большую часть домена B удаляют, так как было показано, что неструктурированный домен и удаление домена не изменяют критические функции этого протеина. Вектор pMK, используемый GeneArts, не содержит промотор, и не может использоваться в качестве экспрессирующего вектора. Сайты рестрикционных ферментов NheI на 5' конце и SfiI, SalI и XhoI на 3' конце вводят для облегчения субклонирования последовательности DNA, кодирующей BDD FVIII в таких экспрессирующих векторах, как CET1019-HS (Millipore). Некоторые уникальный сайты рестрикционных ферментов также вводят в последовательность FVIII, для того, чтобы позволить дальнейшую манипуляцию (например, вставку, мутагенез) последовательностей DNA. Уникальный сайты, приведенные с местом их разреза содержат, но без ограничения ими: SacI 391, AfiII 700, SpeI 966, PshAI 1417, Acc65I 2192, KpnI 2192, BamHI 2250, HindIII 2658, PfoI 2960, PflMI 3413, ApaI 3893, Bsp1201 3893, SwaI 4265, OliI 4626, XbaI 4644 и BstBI 4673. Сайт HindIII располагается на самом конце домена A2 и потенциально может быть использован для модификации домена B. Синтезированный pMK-BDD FVIII от GeneArts не содержит стоп-кодон. Стоп-кодон вводят с помощью амплификации фрагмента 127 bp FVIII с использованием следующих праймеров: 5'-GTGAACTCTCTAGACCCACCG-3' (SEQ ID NO: 1663); 5'-CTCCTCGAGGTCGACTCAGTAGAGGTCCTGTGCCTCG-3' (SEQ ID NO: 1664). Фрагмент расщепляют XbaI и SalI, и лигируют XbaI/SalI, расщепляемым pMK-BDD FVIII. Лигированную смесь DNA используют для трансформирования бактериальных клеток DH5a. Трансформанты подвергают скринингу с по-

мощью минипрепаративной DNA, а нужные конструкции подтверждают с помощью секвенирования DNA. Конструкция, которую называют pBC0027 (pMK-BDD FVIII-STOP), содержит кодирующие последовательности, которые кодируют протеин FVIII BDD. Конструкцию pBC0027 затем расщепляют NheI /SalI, и лигируют NheI/SalI, расщепляемым вектор CET1019-HS (Millipore). Вектор CET1019-HS содержит промотор CMV человека и последовательность UCOE для облегчения экспрессии гена. Лигированную смесь DNA используют для трансформирования бактериальных клеток DH5a. Трансформанты подвергают скринингу с помощью минипрепаративной DNA и желаемые конструкции подтверждают с помощью секвенирования DNA. Конечную конструкцию, которая кодирует протеин FVIII BDD под контролем промотора CMV человека, обозначают pBC0025 (CET1019-HS-BDD FVIII-STOP). Введение конструкции pBC0025 в клетки млекопитающих, как ожидается, для того, чтобы достигнуть экспрессию протеина FVIII BDD с прокоагулянтной активностью.

Пример 17. Построение плазмиды экспрессии в случае XTEN, содержащего BDD FVIII.

1. Вставка AE42 домена B.

Две реакции PCR осуществляют одновременно для того, чтобы вставить XTEN_AE42 в оставшуюся область домена B конструкций FVIII BDD. Реакции PCR содержат следующие праймеры:

cgaaagcgctacgcctgagaGTGGCCCTGGCTCTGAGCCAGCCACCTCCGGCTCTGAAACCCCT

GCCTCGAGCccaccagtcttgaaacgcc (SEQ ID NO: 1665);

TGATATGGTATCATCATAATCGATTTCCTCTTGATCTGACTG (SEQ ID NO: 1666);

agcttgaggatccagagttc (SEQ ID NO: 1667);

tctcaggcgtagcgctttcgCTTGTCCCCTCTTCTGTTGAGGTGGGGGAGCCAGCAGGAGAACC

TGGCGCGCCgttttgagagaagcttcttggt (SEQ ID NO: 1668).

Продукты PCR затем служат в качестве матриц, а вторую PCR осуществляют для введения XTEN_AE42 в FVIII, кодирующий нуклеотидные последовательности, окруженные по бокам BamHI и ClaI. Этот продукт PCR расщепляют BamHI и ClaI в то же самое время с расщеплением PBC0114 с теми же двумя энзимами. Продукт PCR лигируют расщепляемым вектором. Эту конструкцию обозначают pBC0135 (pcDNA4-FVIII_4XTEN_AE42-GAGSPGAETA-Myc-SPATG-His) (GAGSPGAETA и SPATG, раскрытые в качестве SEQ ID NOS 178 и 1662, соответственно), и кодирует FVIII BDD с AE42 XTEN, встроенный в пределах остаточного B-домена.

2. Вставка AE42 и мутация R1648A.

Способ QuikChange (Agilent, CA) используют для введения мутации R1648A в PBC0135. Эту конструкцию обозначают pBC0149 (pcDNA4-FVIII_4XTEN_AE42-GAGSPGAETA-Myc-SPATG-His_R1648A) (GAGSPGAETA и SPATG, раскрытые в виде SEQ ID NOS 178 и 1662, соответственно), что исключает этот сайт процессинга FVIII.

3. Вставка AE288 домена B.

XTEN_AE288 амплифицируют способом PCR с использованием следующих праймеров: tctcaaaacGGCGCGCCAggtacctcagagtctgctacc (SEQ ID NO: 1669) и tggtggGCTCGAGGCtggcgcactgccttc (SEQ ID NO: 1670). PBC0075 используют в качестве матрицы для этой реакции PCR. Продукт PCR расщепляют AscI и XhoI, и PBC0135 расщепляют такие же энзимы. Продукт PCR лигируют фрагментом PBC0135. Эту конструкцию обозначают pBC0136 (pcDNA4-FVIII_4XTEN_AE288-GAGSPGAETA-Myc-SPATG-His) (GAGSPGAETA и SPATG, раскрытые как SEQ ID NOS 178 и 1662, соответственно) и кодируют FVIII BDD с AE288 XTEN, встроенным в пределах остаточного B-домена.

4. Вставка AE288 и мутация R1648A.

XTEN_AE288 амплифицируют способом PCR, с использованием следующих праймеров: tctcaaaacGGCGCGCCAggtacctcagagtctgctacc (SEQ ID NO: 1671) и tggtggGCTCGAGGCtggcgcactgccttc (SEQ ID NO: 1672). Конструкцию pBC0075 используют в качестве матрицы для этой реакции PCR. Продукт PCR расщепляют AscI и XhoI, а pBC0149 расщепляют такие же энзимы. Продукт PCR лигируют фрагментом pBC0149. Эту конструкцию обозначают pBC0137 (pcDNA4-FVIII_4XTEN_AE288-GAGSPGAETA-Myc-SPATG-His R1648A) (GAGSPGAETA и SPATG, раскрытые как SEQ ID NOS 178 и 1662, соответственно) и содержит последовательность AE288 XTEN, внутреннюю по отношению к домену B, с мутацией R1648A, что исключает этот сайт процессинга FVIII.

3. Вставки AE144, AG144, AG288 домена B с и без мутациями R1648A.

Выбранные фрагменты XTEN амплифицируют способом PCR для введения сайтов AscI и XhoI в 5' и 3' конец соответственно. Продукт PCR расщепляют AscI и XhoI, и pBC0135 (в случае R1648) или pBC0149 (в случае A1648) расщепляют такими же энзимами. Продукт PCR лигируют вектором pBC0135 или pBC0149. Эти конструкции обозначают pSD0005, 6, 7, 8, 17 и 18.

Построение плазмид экспрессии в случае FVIII BDD со вставкой XTEN на C-конце.

1. C концевая вставка AE288.

XTEN_AE288 амплифицируют способом PCR с использованием следующих праймеров: ggggccgaaacggccggtacctcagagtctgctacc (SEQ ID NO: 1673) и tgttcggccgtttcggcccctggcgcactgccttc (SEQ ID NO: 1674). Конструкцию pBC0075 используют в качестве матрицы для этой реакции PCR. Продукт PCR

расщепляют SfiI, и pBC0114 расщепляют таким же энзимом. Продукт PCR лигируют расщепляемым фрагментом pBC0114. Эту конструкцию обозначают pBC0145 (pcDNA4-FVIII_4-XTEN_AE288- GAGSPGAETA-Myc-SPATG-His) (GAGSPGAETA и SPATG, раскрытые как SEQ ID NOS 178 и 1662, соответственно), и кодируют последовательность AE288 на С-конце BDD FVIII.

2. С концевая вставка AG288.

XTEN_AG288 создают и синтезируют с помощью DNA2.0 (Менло Парк, CA). Синтезированный ген амплифицируют способом PCR с использованием следующих праймеров: ggggccgaaacggccccgggagcgtcacc (SEQ ID NO: 1675) и tgttcggccgtttcggcccctgacccggttgcccc (SEQ ID NO: 1676). Продукт PCR расщепляют SfiI, и вектор на основе PBC0114 расщепляют таким же энзимом. Продукт PCR лигируют расщепляемым фрагментом PBC0114. Эту конструкцию обозначают pBC0146 (pcDNA4-FVIII_4-XTEN_AG288-GAGSPGAETA-Myc-SPATG-His) (GAGSPGAETA и SPATG, раскрытые как SEQ ID NOS 178 и 1662, соответственно), и кодируют последовательность AG288 на С-конце BDD FVIII.

3. С концевые вставки AE/AG144, 288, 864.

Сайты AscI и XhoI вводят в вектор на основе PBC0114 посредством способов QuikChange с использованием праймеров: 5O37-PBC0114-AscI-XhoI-F:

CAGGACCTCTACGGCGCgccagcctcgaGCGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGG (SEQ ID NO: 1677); 5O38-PBC0114-AscI-XhoI-R:

CCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCGCtcgaggctggcGCGCCGTAGAGGTCCTG (SEQ ID NO: 1678). Различные фрагменты XTEN амплифицируют способом PCR с AscI и XhoI, введенными в 5' и 3' конец соответственно. Продукт PCR лигируют расщепляемым вектором PBC0114. Эти конструкции обозначают pSD0013, pSD0014, pSD0015, pSD0016, pSD0019 и pSD0020.

Построение плазмид экспрессии в случае FVIII BDD с между- и внутри-доменными вставками XTEN 1. Вставки AE7, AE42 и AE144.

Для вставка AE42 в обозначенный сайты используют четыре различные стратегии (например, природные или введенные сайты рестрикции BsiWI 48, AflII 381, PshAI 1098, KpnI 1873, BamHI 1931, PflMI 3094, ApaI 3574, XbaI 4325, NotI 4437, XhoI 4444, BstEII 4449, AgeI 4500, PmeI 4527, BsiWI 908, NheI 1829 и ClaI 3281) в пределах FVIII BDD кодирующей каждую последовательность, участвующую в создании некоторых конструкций. В соответствии с проектом, эти вставки AE42 создают сайты AscI и XhoI, по обе стороны вставки, позволяют вводить/заменять более длинный XTEN, а также XTEN с различными последовательностями или встроенные расщепленные последовательности, по мере необходимости. В частности, конструкции, которые содержат вставки XTEN_144, приведены в табл. 21. Эти вставки создают с помощью замены либо AE7, либо AE42 на фрагмент PCRed XTEN_144, окруженный по бокам сайтами AscI и XhoI.

2. Способ, опосредованный двойной PCR.

Две реакции PCR осуществляют одновременно с этим для того, чтобы вставить XTEN_AE42 в обозначенный сайт. Две реакции PCR вводят XTEN в либо 3', либо 5' конец посредством использования длинного праймера, который содержит частичный XTEN. Продукты PCR затем служат в качестве матриц, а вторую PCR осуществляют для введения XTEN_AE42 в FVIII, кодирующий нуклеотидные последовательности, окруженные по бокам выбранными сайтами рестрикционных ферментов. Этот продукт PCR расщепляют соответствующими энзимами в то же самое время с расщеплением PBC0114 с использованием таких же двух энзимов. Продукт PCR лигируют расщепляемым вектором. С использованием этого способа, создают конструкции, обозначенные pBC0126, pBC0127, pBC0128 и pBC0129, что приводит к вставкам AE42 в локализациях R3, R3, P130, L216 соответственно. Последовательности приведены в табл. 21. Выбранные последовательности XTEN_144 затем могут подвергать PCR для введения сайтов AscI и XhoI в какой-либо конец фрагмента, и лигируют для расщепления конструкции FVIII-XTEN_AE42. Например, pSD0053 создают с помощью замены AE42 pBC0129 на XTEN_AE144. Другие конструкции XTEN_144 были созданы посредством такой же стратегии и приведены в табл. 21.

3. OuikChange-опосредрванный двухэтапный способ клонирования.

Способ QuikChange используют для введения XTEN_AE7 кодирующих последовательностей, которые являются окруженными по бокам AscI и XhoI в обозначенных сайтах. Получаемую промежуточную конструкцию затем расщепляют AscI и XhoI. XTEN_AE42 или XTEN_AE144 амплифицируют способом PCR для введения двух сайтов и расщепляют соответственно. Вектор и вставку затем лигируют для создания конечных конструкций. Последовательности приведены в табл. 21.

4. Способ лигирования тремя PCR II типа, опосредованный рестрикционным ферментом.

Три реакции PCR осуществляют для создания двух частей FVIII кодирующих фрагментов, окруженных по бокам одним рестрикционным ферментом I типа, который коррелирует с уникальным сайтом в пределах гена FVIII4 и одного энзима II типа (например, BsaI, BbsI, BfuAI), третья реакция PCR создает XTEN_AE42, окруженный по бокам двумя сайтами рестрикционных ферментов II типа. Три фрагмента PCR расщепляют соответствующими энзимами и лигируют в одну линейную часть, которая содержит вставку XTEN_AE42 в пределах фрагмента FVIII кодирующих последовательностей. Этот продукт затем расщепляют соответствующими уникальными энзимами в пределах FVIII кодирующих последовательностей и лигируют конструкцией PBC0114, расщепляемый такими же энзимами, и приводят к конструк-

циям, обозначенным pBC0130 (со вставкой XTEN на остатке P333), pBC0132 (со вставкой XTEN на остатке D403), pBC0133 (со вставкой XTEN на остатке R490). Последовательности приведены в табл. 21. Выбранные последовательности XTEN_144 затем могут подвергать PCR для введения сайтов AscI и XhoI в какой-либо конец фрагмента, и лигируют для расщепления конструкции FVIII-XTEN_AE42. Например, pSD0001 и pSD0003 создают с помощью замены AE42 pBC0132 на XTEN_AE144 и XTEN_AG144 соответственно. Другие конструкции XTEN_144, приведенные в табл. 21, создают посредством такой же стратегии.

5. Оригинальный синтез гена.

Оригинальный синтез гена осуществляют с помощью GeneArt (Регенсбург, Германия). Гены создают таким образом, что они содержат нуклеиновые кислоты, кодирующие XTEN_AE42, вводимые в обозначенный сайт(ы) и гены окружают по бокам двумя уникальными сайтами рестрикционных ферментов, выбранными в пределах гена FVIII_4. Синтезированные гены и PBC0114 расщепляют соответствующими энзимами и лигируют для создания конечного продукта с FVIII BDD, инкорпорирующем XTEN_AE42 между сайтами рестрикции. Выбранные последовательности XTEN_144 затем могут подвергать PCR для введения сайтов AscI и XhoI в какой-либо конец фрагмента, и лигируют для расщепления конструкции FVIII-XTEN_AE42.

Построение плазмиды экспрессии с двойными вставками XTEN в домене B и на C конце.

Конструкция pBC0136, которая кодирует FVIII BDD с AE288 XTEN, встроенным в пределах остаточного B-домена, расщепляют BamHI и ClaI, а получаемый от этого расщепления фрагмент 1372bps вставляют. Конструкцию pBC0146 расщепляют BamHI и ClaI, и часть 9791bps от этого расщепления представляет собой вектор. Вектор и вставку лигируют вместе для создания pBC0209, который содержит вставку AE288 в домене B и AG288 на C-конце. Такую же стратегию используют для создания конструкции, которая содержит две вставки AE288 в домене B и на C-конце, соответственно, с использованием PBC0145 в качестве вектора.

Построение плазмиды экспрессии с несколькоими вставками XTEN.

Конструкция pBC0127, которая кодирует AE42 XTEN в положении R3 FVIII, расщепляют BsiWI и AflII, а получаемый из этого расщепления фрагмент 468bps является вставкой. Конструкцию pBC0209 расщепляют BsiWI и AflII, часть 10830bps от этого расщепления представляет собой вектор. Вектор и вставку лигируют вместе для создания конструкции, обозначенной pBC0210, которая содержит вставку AE42 в домене A1, дополнительные три аминокислоты ATR для восстановления сигнальной последовательности расщепления, вставку AE288 XTEN в домене B и AG288 на C конце. Такую же методику используют для создания конструкций, кодирующих несколько XTEN в природных и введенных сайтах рестрикции; например, BsiWI 48, AflII 381, PshAI 1098, KpnI 1873, BamHI 1931, PflMI 3094, ApaI 3574, XbaI 4325, NotI 4437, XhoI 4444, BstEII 4449, AgeI 4500, PmeI 4527, BsiWI 908, NheI 1829 и ClaI 3281.

Построение экспрессирующих векторов BDD FVIII-Internal-XTEN_AE288.

Два сайта рестрикционных ферментов BsaI вводят в PBC0027 конструкции pMK-BDD FVIII между парами оснований 2673 и 2674 с использованием способа QuikChange в соответствии с протоколом производителя (Agilent Technologies, CA). Вводимые последовательности DNA представляют собой gggtctcccgcgccagggtctccc, а получаемую конструкцию обозначают pBC0205 (последовательность в табл. 21). Последовательность DNA, кодирующую AE288 (или другие варианты и длины XTEN; например, AE42, AG42, AG288, AM288), затем подвергают PCR, с праймерами, которые вводят сайты BsaI и в 5', и в 3'. Вектор pBC0205 и вставку (XTEN288) затем расщепляют BsaI и лигируют для создания pBC0206, который кодирует ген FVIII со вставкой XTEN_AE288 в домене B (последовательность в табл. 21). Конструкцию pBC0206 затем расщепляют NheI/SalI, и лигируют вектором CET1019-HS, расщепленным NheI/SalI (Millipore). Вектор CET1019-HS для облегчения экспрессии гена содержит промотор CMV человека и последовательность UCOE. Лигированную смесь DNA используют для трансформировании бактериальных клеток DH5a. Трансформанты подвергают скринингу с помощью минипрепаративной DNA, а нужные конструкции подтверждают с помощью секвенирования DNA. Конечную конструкцию, которая кодирует протеин FVIII BDD под контролем промотора CMV человека (последовательность в табл. 21), обозначают pBC0207 (CET1019-HS-BDD FVIII-STOP). Введение конструкции pBC0207 в клетки млекопитающих, как ожидается, позволяет достигнуть экспрессии протеина FVIII BDD с внутренним XTEN_AE288. Такой же протокол используют для введения, трансформирования и экспрессирования конструкций, которые содержат другие варианты и длины XTEN; например, AE42, AG42, AG288, AM288, AE864, AG864 или другие XTEN из табл. 4.

Построение экспрессирующих векторов FVIII-/-XTEN_AE864 BDD.

Фрагмент FVIII BDD с NheI и SfiI, фланкирующими 5' и 3' конец, получают с помощью расщепления конструкции pBC0025. Расщепленный фрагмент затем лигируют NheI/SfiI, расщепляющим вектор pSecTag (pBC0048 pSecTag-FVIII-/-XTEN_AE864), который кодирует FVIII с последующей последовательностью XTEN_AE864. Лигированную смесь DNA используют для трансформирования бактериальных клеток DH5a. Трансформанты подвергают скринингу с помощью минипрепаративной DNA, а нужные конструкции подтверждают с помощью секвенирования DNA. Конечная конструкция представляет собой pBC0060, который кодирует протеин BDD FVIII-/-XTEN_AE864 под контролем промотора CMV

человека. Введение конструкции pBC0060 в клетки млекопитающих предполагают для экспрессирования протеина FVIII с С концевымой слиянием XTEN (BDD FVIII-/-XTEN_AE864) с прокоагулянтной активностью.

Построение экспрессирующих векторов FVIII-/FXI/-XTEN_AE864 BDD.

Фрагмент FVIII BDD с NheI и SfiI, фланкирующими 5' и 3' конец, получают с помощью расщепления конструкция pBC0025. Расщепленный фрагмент затем лигируют вектором pSecTag, расщепленным NheI/SfiI (pBC0047 pSecTag-FVIII-/FXI/-XTEN_AE864), кодирующим FVIII с последующей последовательностью расщепления (/FXI/) FXI и XTEN_AE864. Лигированную смесь DNA используют для трансформирования бактериальных клеток DH5a. Трансформанты подвергают скринингу с помощью минипрепаративной DNA, а нужные конструкции подтверждают с помощью секвенирования DNA. Конечная конструкция представляет собой pBC0051, который кодирует протеин BDD FVIII-/FXI/-XTEN_AE864 под контролем промотора CMV человека. Введение конструкции pBC0051 в клетки млекопитающих предполагают для экспрессирования протеина FVIII с С-концевым слиянием XTEN (BDD FVIII-/FXI/-XTEN_AE864), который может быть впоследствии расщеплен FXI, таким образом высвобождая протеин FVIII BDD с прокоагулянтной активностью.

Построение экспрессирующих векторов BDD FVIII-/FXI/-XTEN, которые содержат AE288 или AG288.

Слитую последовательность AE864 XTEN в pBC0060 замещают с помощью расщепления последовательности XTEN_AE288 и AG288 BsaI и HindIII. Следующий этап лигирования с использованием соответствующего фрагмента XTEN AE288 или AG288 и pBC0051, расщепленного BsaI/HindIII, допускает замену последовательностей AE288 или AG288 в экспрессирующий вектор FVIII BDD. Получаемые конечные конструкции представляют собой pBC0061 в случае BDD FVIII-AE288, и pBC0062 в случае BDD FVIII-AG288. Введение конструкции pBC0061 в клетки млекопитающих предполагают для экспрессирования протеина FVIII с С-концевым слиянием AE288 XTEN (BDD FVIII-/-XTEN_AE288) с прокоагулянтной активностью. Введение конструкции pBC0062 в клетки млекопитающих для экспрессирования предполагает протеин FVIII с С-концевым слиянием AG288 XTEN (BDD FVIII-/-XTEN_AG288) с прокоагулянтной активностью.

Построение экспрессирующих векторов BDD FVIII-/FXI/-XTEN с альтернативным XTEN.

Слитую последовательность XTEN в pBC0051 замещают с помощью расщепления DNA, кодирующей другие последовательности XTEN (например, другие варианты и длины XTEN; например, AE42, AG42, AG288, AM288) BsaI и HindIII. Лигирование с использованием фрагмента XTEN и BsaI/HindIII, расщепляющий pBC0051, допускает обмен различных XTEN-кодирующих последовательностей в экспрессирующем векторе FVIII BDD, обеспечение альтернативных конструкций. Введение альтернативных конструкций в клетки млекопитающих предполагают для экспрессирования протеина FVIII с С-концевым XTEN (BDD FVIII-/FXI/-XTEN), который может быть впоследствии расщеплен FXI, высвобождает FVIII, что приводит к слиянию прокоагулирующего FVIII с прокоагулянтной активностью.

Пример 18. Построение плазмиды экспрессии в случае FVIII сигнальная последовательность-XTEN-/FXI/-BDD.

Построение экспрессирующих векторов в случае FVIII сигнальная последовательность-XTEN_AE864.

Кодирующие последовательности в случае сигнальной последовательности FVIII получают с помощью ренатурации двух следующих олигомеров: 5’-
CTAGCATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTT
TAGTGGGTCTCC-3’ (SEQ ID NO: 1679); 5’-
ACCTGGAGACCCACTAAAGCAGAATCGCAAAAGGCACAGAAAGAAGCAGGTGGAG
AGCTCTATTTGCATG-3’ (SEQ ID NO: 1680).

Ренатурированные олигомеры окружают по бокам сайты рестрикционных ферментов NheI и BsaI на каком-либо из концов, и лигируют вектором pCW0645, расщепленным NheI/BsaI, который кодирует FVII-XTEN_AE864. Лигированную смесь DNA используют для трансформирования бактериальных клеток DH5a. Трансформанты подвергают скринингу с помощью минипрепаративной DNA, а нужные конструкции подтверждают с помощью секвенирования DNA. Конечную конструкцию обозначают pBC0029, которая кодирует протеин сигнальная последовательность-XTEN_AE864 под контролем промотора CMV человека. Эту конструкцию используют в качестве промежуточной конструкции для создания конструкции экспрессии с XTEN, слитым на N-конце протеина FVIII, и также может использоваться в качестве основной плазмиды для создания экспрессирующих конструкций, которые делают возможным слияние XTEN на N-конце секретируемого протеина.

Построение экспрессирующих векторов FVIII сигнальная последовательность-XTEN_AE864-/FXI/-BDD.

Фрагмент 1800bp в пределах кодирующей области FVIII амплифицируют с использованием праймеров, которые вводят сайты NheI-BbsI-/FXI/-AgeI в 5' и эндогенный рестрикционный фермент KpnI на 3' конце. Фрагмент FVIII, расщепленный NheI/KpnI, лигируют вектором pBC0027, расщепленным NheI/KpnI. Лигированную смесь DNA используют для трансформирования бактериальных клеток DH5a.

Трансформанты подвергают скринингу с помощью минипрепаративной DNA, а нужные конструкции подтверждают с помощью секвенирования DNA. Получаемую конструкцию, которая содержит последовательности, кодирующие протеин /FXI/-FVIII без сигнальной последовательности FVIII, обозначают pBC0052. Эту конструкцию используют в качестве промежуточной конструкции для создания конструкции экспрессии с XTEN, слитым на N-конце протеин FVIII.

Вектор pBC0052 расщепляют энзимами BbsI/XhoI, и используют для лигирования pBC0029, расщепленного Bbsi/XhoI. Лигированную смесь DNA используют для трансформирования бактериальных клеток DH5a. Трансформанты подвергают скринингу с помощью минипрепаративной DNA, а нужные конструкции подтверждают с помощью секвенирования DNA. Конечную конструкцию, которая кодирует протеин FVIII сигнальная последовательность-XTEN_AE864-/FXI/-BDD под контролем промотора CMV человека, обозначают pBC0053. Введение конструкции pBC0053 в клетки млекопитающих предполагают для экспрессирования протеина FVIII с N-концевым слиянием XTEN (сигнальная последовательность-XTEN_AE864-/FXI/-BDD FVIII), который может быть впоследствии расщеплен FXI, таким образом высвобождая протеин FVIII BDD.

Построение экспрессирующих векторов FVIII сигнальная последовательность-XTEN-/FXI/-BDD.

Слитая последовательность XTEN в pBC0053 может быть замещена с помощью расщепления других фрагментов XTEN (например, AM, AF, AG) BsaI и BbsI. Лигирование с использованием фрагмент XTEN и pBC0053, расщепленного BsaI/BbsI, допускает обмен различных частей XTEN (например, AM, AF, AG) в экспрессирующем векторе FVIII BDD. Различные слияния XTEN могут повысить периоды полужизни этих протеинов по-разному, позволяет модифицировать свойства (например, эффективность, специфическая активность) этих протеинов. Введение любой этих слитых конструкций в клетки млекопитающих предполагают для экспрессирования протеина FVIII с N-концевым XTEN слиянием (FVIII сигнальная последовательность-XTEN-/FXI/-BDD), в котором слитый пептид XTEN может быть впоследствии расщеплен FXI, генерируя протеин FVIII BDD.

Пример 19. Построение FVIII BDD с междоменной вставкой XTEN.

Построение экспрессирующих векторов FVIII BDD со вставкой XTEN в границах домена A2-B.

Конструкция pBC0027 (pMK-BDD FVIII-STOP) представляет собой вектор клонирования, разработанный для того, чтобы содержать последовательности, кодирующие протеин FVIII BDD, а не промотор, расположенный для того, чтобы инициировать экспрессию BDD FVIII. Эту конструкцию используют для манипуляции кодирующих последовательностей FVIII BDD в качестве остова вектора, который содержит очень мало сайтов рестрикционных ферментов, что таким образом делает возможным легкие стратегии клонирования. Протеины BDD FVIII содержат 1457 аминокислот с общей молекулярной массой 167539,66. В пределах протеина FVIII дикого типа находится 6 доменов, домены A1, A2, B, A3, C1 и C2. В протеине FVIII BDD большую часть домена B удаляют, поскольку, как полагают, неструктурированный домен и удаление домена не изменяют критические функции этого протеина. Несмотря на это, границы домена B представляются отличными положениями для создания слияний XTEN, для того чтобы достигнуть расширение периодов полужизни протеина.

В пределах конструкции pBC0027, находится уникальный сайт HindIII рестрикционного фермента на границе области соединения A2-B. XTEN (например, последовательности из табл. 4, или 13-17) амплифицируют с использованием праймеров, которые вводят HindIII, и расщепленного сайта FXI на любом из концов последовательности, кодирующей XTEN. Слитая последовательность XTEN может быть изменена с помощью амплификации различных фрагментов XTEN. Различные слияния XTEN могут повышать периоды полужизни этих протеинов по-разному, делая возможной модификацию свойств (например, эффективности, специфической активности) этих протеинов. Фрагмент HindIII-/FXI/-XTEN-/FXI/-HindIII расщепляют HindIII и лигируют pBC0027, расщепляемым HindIII. Лигированную смесь DNA используют для трансформирования бактериальных клеток DH5a. Трансформанты подвергают скринингу с помощью минипрепаративной DNA, а нужные конструкции подтверждают с помощью секвенирования DNA. Конечную конструкцию, которая кодирует протеин FVIII BDD с междоменным слиянием XTEN (FVIII(A1-A2)-/FXI/-XTEN-/FXI/-FVIII(C1-C2)), а не промотором для инициирования экспрессии гена, обозначают pBC0054.

Конструкцию pBC0054 расщепляют NheI/SalI, и лигируют вектором CET1019-HS, расщепляемым NheI/SalI (Millipore). Вектор CET1019-HS для облегчения экспрессии гена содержит промотор CMV человека и последовательность UCOE. Лигированную смесь DNA используют для трансформирования бактериальных клеток DH5a. Трансформанты подвергают скринингу с помощью минипрепаративной DNA, а нужные конструкции подтверждают с помощью секвенирования DNA. Конечную конструкцию, которая кодирует протеин FVIII BDD с междоменным (между доменами A2/B) слиянием XTEN (FVIII(A1-A2)-/FXI/-XTEN-/FXI/-FVIII(C1-C2)) под контролем промотора CMV человека, обозначают pBC0055 (CET1019-HS- FVIII(A1-A2)-/FXI/-XTEN-/FXI/-FVIII(C1-C2)). Введение конструкции pBC0055 в клетки млекопитающих предполагают для экспрессирования протеина FVIII BDD с междоменным слиянием XTEN (FVIII(A1-A2)-/FXI/-XTEN-/FXI/-FVIII(C1-C2)), который может быть впоследствии расщеплен FXI, таким образом высвобождая протеин FVIII BDD.

Построение экспрессирующих векторов FVIII BDD со вставкой XTEN на границах доменов A1-A2.

Конструкцию pBC0027 строят в качестве матрицы в случае двух реакций PCR с использованием следующих четырех праймеров:
(Реакция I) 5'-ATGATGGCATGGAAGCCTAT-3' (SEQ ID NO: 1681); 5'-
ATCCCTCACCTTCGCCAGAACCTTCAGAACCCTCACCTTCAGAACCTTCACCAGAAC
CTTCACCATCTTCCGCTTCTTCATTATTTTTCAT-3' (SEQ ID NO: 1682).
(Реакция II) 5'-
TTCTGGCGAAGGTGAGGGATCTGAAGGCGGTTCTGAAGGTGAAGGTGGCTCTGAGG
GTTCCGAATATGATGATGATCTTACTGATTCTGAAAT-3' (SEQ ID NO: 1683); 5'-
TATTCTCTGTGAGGTACCAGC-3' (SEQ ID NO: 1684).

Получаемые продукты PCR представляют собой 150 bps и 800 bps соответственно. Продукт 800 bp используют в качестве матрицы для следующего этапа реакции PCR с продуктом 150 bp в качестве одного праймера и 5'-TATTCTCTGTGAGGTACCAGC-3' (SEQ ID NO: 1685) в качестве другого. Продукт для второго этапа PCR представляет собой 930 bps и расщепляют рестрикционными ферментами PshAI и ACC65I. Этот PshAI/Acc65I, окружающий фрагмент DNA, лигируют pBC0027, расщепляемым PshAI/Acc65I. Лигированную смесь DNA используют для трансформирования бактериальных клеток DH5a. Трансформанты подвергают скринингу с помощью минипрепаративной DNA, а нужные конструкции подтверждают с помощью секвенирования DNA. Конечную конструкцию, которая кодирует протеин FVIII BDD с междоменным (между доменами A1/A2) слиянием XTEN после остатка D345, обозначают pBC0058 (pMK-BDD FVIII-D345-XTENY36).

Конструкцию pBC0058 расщепляют NheI /SalI, и лигируют вектором CET1019-HS, расщепляемым NheI/SalI (Millipore). Вектор CET1019-HS содержит промотор CMV человека и последовательность UCOE для облегчения экспрессии гена. Лигированную смесь DNA используют для трансформирования бактериальных клеток DH5a. Трансформанты подвергают скринингу с помощью минипрепаративной DNA, а нужные конструкции подтверждают с помощью секвенирования DNA. Конечную конструкцию, которая кодирует протеин FVIII BDD с междоменным (между доменами A1/A2) слиянием XTEN после остатка D345 под контролем промотора CMV человека, обозначают pBC0059 (CET1019-HS-BDD FVIII D345-XTENY36). Введение конструкции pBC0059 в клетки млекопитающих предполагают для экспрессирования протеина FVIII BDD с междоменным слиянием XTEN (BDD FVIII D345-XTEN_Y36).

Пример 20. Построение FVIII с внутридоменной вставкой XTEN.

Построение экспрессирующих векторов FVIII BDD со вставкой XTEN после P598 (в домене A2).

Кодирующие последовательности в случае XTEN_Y36 амплифицируют с использованием способов PCR со следующими праймерами:
5'-GAAGCTGGTACCTCACAGAGAATATACAACGCTTTCTCCCCAATCCAGGTGAAGGT
TCTGGTGAAGG-3' (SEQ ID NO: 1686)
5'-AACTCTGGATCCTCAAGCTGCACTCCAGCTTCGGAACCCTCAGAGCC-3' (SEQ ID NO: 1687).

Продукт 184 bp PCR окружают по бокам сайтами рестрикционных ферментов KpnI и BamHI на каком-либо из концов, и лигируют вектором pBC0027, расщепляемым KpnII/BamHI, который кодирует ген BDD FVIII. Лигированную смесь DNA используют для трансформирования бактериальных клеток DH5a. Трансформанты подвергают скринингу с помощью минипрепаративной DNA, а нужные конструкции подтверждают с помощью секвенирования DNA. Конечную конструкцию, которая содержит последовательности DNA, кодирующие протеин FVIII со слиянием XTEN_Y36 после остатка P598, обозначают pBC0056. Эту стратегию клонирования используют для введения различных форм XTEN в протеин FVIII BDD с помощью изменения матрицы для реакции PCR и изменения праймеров соответственно.

Конструкцию pBC0056 расщепляют NheI /SalI, и лигируют вектором CET1019-HS, расщепляемым NheI/SalI (Millipore). Вектор CET1019-HS содержит промотор CMV человека и последовательность UCOE для облегчения экспрессии гена. Лигированную смесь DNA используют для трансформирования бактериальных клеток DH5a. Трансформанты подвергают скринингу с помощью минипрепаративной DNA, а нужные конструкции подтверждают с помощью секвенирования DNA. Конечную конструкцию, которая кодирует протеин FVIII BDD с внутридоменным (в домене A2) слиянием XTEN под контролем промотора CMV человека, обозначают pBC0057 (CET1019-HS- FVIII P598-XTEN_Y32). Введение конструкции pBC0057 в клетки млекопитающих предполагают для экспрессирования протеина FVIII BDD с внутридоменным слиянием XTEN (FVIII P598-XTENY32).

Построение экспрессирующих векторов FVIII BDD с другими внутридоменными вставками XTEN.

Для введения различных сегментов XTEN в другие внутридоменные сайты в пределах FVIII BDD (например, XTEN из табл. 4 или 13-17), создают праймеры, которые расширяют XTEN с липким концом, которые могут соединяться с BDD FVIII. Кодирующую последовательность FVIII (pMK-BDD FVIII) строят с различными уникальными сайтами рестрикционных ферментов, для того, чтобы достигнуть эти специфические вставки. Уникальные рестрикционные ферменты приведены ниже с их усеченным сайтом: NheI 376, SacI 391, AfiII 700, SpeI 966, PshAI 1417, Acc6512192, KpnI 2192, BamHI 2250, HindIII 2658, PfoI 2960, PflMI 3413, ApaI 3893, Bspl201 3893, SwaI 4265, OliI 4626, XbaI 4644, BstBI 4673,

SalI4756 и XhoI 4762. Сайты NheI и SalI на любом из концов кодирующей последовательности используют для того, чтобы вставить фрагмент DNA в промоторный вектор CMV человека, CET1019-HS (Millipore) для экспрессии в клетках млекопитающих. Эти конструкции экспрессируют протеин FVIII BDD со слиянием XTEN с последовательностями, приведенными в табл. 21.

Пример 21. Построение FVIII со вставками XTEN.

CFXTEN с двумя XTEN.

Для получения CFXTEN с двумя вставками XTEN в различных областях (от N-конца до C-конца: A1-R1, A1-R2, A2-R1, A2-R2, домен B, a3, A3-R1, A3-R2, C-конец), используют конструкции, которые экспрессируют слияния с одно-XTEN вставками, сохраняющими активность FVIII. Кодирующую последовательность FVIII (pBC0114 pcDNA4-FVIII_4-X10-Myc-SPATG-His extra RE) ('SPATG', раскрытый как SEQ ID NO: 1662) создают с различными уникальными сайтами рестрикционных ферментов, для того, стобы достигнуть эти специфические комбинации. Уникальные рестрикционные ферменты приведены в табл. 18 ниже с их относительными сайтами между различными областями: BsiWI (между N-концами и A1-R1), AflII (между A1-R1 и A1-R2), NheI (между A1-R2 и A2-R1), KpnI (между A2-R1 и A2-R2), BamHI (между A2-R2 и домен B), ClaI (между a3 и A3-R1), PflMI (между A3-R1 и A3-R2), XbaI (между A3-R2 и C-конец), AgeI (между C-концами FVIII и стоп-кодоном). Выбирают строительные блоки и рестрикционные ферменты для клонирования библиотек, как приведено в табл. ниже. Выбранные компоненты в каждой области смешивают при молярном соотношении 1:1, и два набора смесей DNA расщепляют уникальными рестрикционными ферментами. Фрагменты DNA отделяют на 1% агарозный гель и очищают с помощью набора для экстракции на основе геля Qiagen. DNA со вставкой XTEN в первой нужной области расценивают в качестве вставки (меньший фрагмент DNA в агарозном геле), в то время как DNA со вставкой XTEN во второй нужной области расценивают в качестве вектора (больший фрагмент DNA в агарозном геле). Вставку и вектор лигируют для того, чтобы ресуспендировать плазмиду. Лигированную смесь DNA используют для трансформирования компетентных клеток-хозяев DH5α E. coli. Трансформанты обследуют с помощью амплификации по типу катящегося кольца (RCA) и секвенирования по Сенгеру, для того, чтобы охватить потенциальный размер библиотеки приблизительно 3-4 раза. Уникальные клоны определяют и минипрепарируют. Затем, для дополнительного подтверждения целостности XTEN, в каждой области используют два различных расщепления рестрикции. Аминокислота и последовательности, кодирующие DNA, в случае получаемых гибридных белков CFXTEN приведены в табл. 21.

CFXTEN с одной или двумя вставками XTEN в пределах домена B/a3 и C конца.

B/домен a3 и C-конец FVIII представляют собой неструктурированные области, которые хорошо переносят вставки XTEN. Домен B/a3 дополнительно содействует взаимодействию с другими кофакторами, которые содержат фактор Виллебранда. Для исследования оптимальных вставок XTEN в домен B/a3, выбранные делеции и мутации области осуществляют посредством способов мутагенеза на основе PCR. Выбранные реакции PCR и векторы расщепляют уникальные рестрикционные ферменты, которые приведены в табл. 18. Фрагменты DNA отделяют с помощью 1% агарозного геля и очищают с помощью набора для экстракции на основе геля Qiagen. DNA со вставкой XTEN в первой нужной области расценивают в качестве вставки (меньший фрагмент DNA в агарозном геле), в то время как DNA со вставкой XTEN во второй нужной области расценивают в качестве вектора (больший фрагмент DNA в агарозном геле). Вставку и вектор лигируют для того, чтобы ресуспендировать плазмид. Лигированную смесь DNA используют для трансформирования компетентных клеток-хозяев DH5α E. coli. Трансформанты обследуют с помощью способа молекулярных колоний и секвенирования по Сенгеру, чтобы охватить приблизительно восьмикратный потенциальный размер библиотеки. Уникальные клоны определяют и минипрепарируют. Для дополнительного подтверждения целостности XTEN в каждой области затем используют расщепление рестрикцией с помощью трех энзимов. Аминокислота и последовательности, кодирующие DNA, получаемых гибридных белков CFXTEN приведены в табл. 21.

Таблица 18

План клонирование в случае библиотек FVIII с двумя вставками XTEN

ID библиотеки	Компоненты вставки (область XTEN)	Компоненты вектора (область XTEN)	Рестрикционные ферменты
LSD0001	pSD0005, pSD0006, pSD0007, pSD0008, pSD0017, pSD0018, pBC0136, pBC0137 (B-домен)	pSD0013 (C-конец)	NheI + ClaI
LSD0002	pSD0005, pSD0006, pSD0007,	pSD0014 (C-конец)	NheI + ClaI

	pSD0008, pSD0017, pSD0018, pBC0136, pBC0137 (B-домен)		
LSD0003	pSD0005, pSD0006, pSD0007, pSD0008, pSD0017, pSD0018, pBC0136, pBC0137 (B-домен)	pSD0019 (C-конец)	NheI + ClaI
LSD0004	pSD0005, pSD0006, pSD0007, pSD0008, pSD0017, pSD0018, pBC0136, pBC0137 (B-домен)	pSD0020 (C-конец)	NheI + ClaI
LSD0005	pSD0045, pSD0046, pSD0048, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	pSD0001 (A2-R1)	BsiWI+AflII
LSD0006	pSD0045, pSD0046, pSD0048, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	pSD0002 (A2-R1)	BsiWI+AflII
LSD0007	pSD0045, pSD0046, pSD0048, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	pSD0003 (A2-R1)	BsiWI+AflII
LSD0008	pSD0045, pSD0046, pSD0048, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	pSD0004 (A2-R1)	BsiWI+AflII
LSD0037	pSD0045, pSD0046, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	pSD0032 (A2-R1)	BsiWI+AflII
LSD0038	pSD0039 (a3)	pSD0045, pSD0046, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	BamHI+ClaI
LSD0039	pSD0039 (a3)	pSD0032, pSD0001, pSD0003 (A2-R1)	BamHI+ClaI
LSD0040	pSD0040, pSD0010, pSD0041 (A3-R1)	pSD0045, pSD0046, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	ClaI+XbaI
LSD0041	pSD0040, pSD0010, pSD0041 (A3-R1)	pSD0032, pSD0001, pSD0003 (A2-R1)	ClaI+XbaI
LSD0042	pSD0062, pSD0063, pSD0043, pSD0044 (A3-R2)	pSD0045, pSD0046, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	ClaI+XbaI
LSD0043	pSD0062, pSD0063, pSD0043, pSD0044 (A3-R2)	pSD0032, pSD0001, pSD0003 (A2-R1)	ClaI+XbaI
LSD0044	pSD0062, pSD0063, pSD0043, pSD0044 (A3-R2)	pSD0040, pSD0010, pSD0041 (A3-R1)	PflMI+XbaI
LSD0045	pSD0039 (a3)	pSD0040, pSD0010, pSD0041 (A3-R1)	BamHI+ClaI
LSD0046	pSD0039 (a3)	pSD0062, pSD0063, pSD0043, pSD0044 (A3-R2)	BamHI+ClaI
LSD0047	pSD0046 (A1-R1)	pSD0001, pSD0003 (A2-R1)	BsiWI+AflII
LSD0048	pSD0045, pSD0051 (A1-R1)	pSD0003 (A2-R1)	BsiWI+AflII
pNL0006	продукт PCR	LSD0003.006 (домен B и C конец)	BamHI+PflMI
pNL0007	продукт PCR	LSD0003.006 (домен B и C конец)	ClaI+PflMI
pNL0008	продукт PCR	LSD0003.009 (домен B и C конец)	ClaI+PflMI
pNL0009	продукт PCR	pSD0039 (домен a3)	BamHI+AscI
pNL0010	LSD0003.006 (домен B и C конец)	pNL0009 (домен a3)	XbaI+AgeI

Пример 22. Построение экспрессирующих векторов FVIII BDD с 3-5 вставками XTEN в пределах сайтов 18/26, 403, 745/1656, 1720, 1900 или 2332.

Слитые с FVIII конструкции со вставками XTEN в пределах сайтов 18/26, 403, 745/1656, 1720, 1900 или 2332 выбирают для рекомбинации и генерирования конструкций с 3, 4, 5 или 6 вставками XTEN.

Построение экспрессирующих векторов FVIII BDD с 3-5 вставками XTEN в пределах сайтов 26, 403, 1656, 1720 или 1900.

Выбранные конструкции с уникальным XTEN в нужных сайтах представляют собой: pSD0050, pSD0001, pSD0039, pSD0010 и pSD0062. Конструкции с двойным XTEN в нужных сайтах содержат LSD0005.002, LSD0038.001, LSD0040.002, LSD0042.013, LSD0039.010, LSD0041.008, LSD0043.008, LSD0045.002, LSD0046.002 и LSD0044.002. Были выбраны строительные блоки и рестрикционные ферменты для клонирования конструкций, которые приведены в табл. 19 ниже. Выбранные компоненты

расщепляют уникальными рестрикционными ферментами. DNA вставок и векторов отделяют с помощью 1% агарозного геля и очищают с помощью набора для экстракции на основе геля Qiagen. Вставку и вектор лигируют, а затем трансформируют в DH5α. E. coli компетентных клеток-хозяев. Четыре колонии для каждой конструкции анализируют с помощью RCA и секвенирования DNA. Клоны с нужными вставками XTEN минипрепарируют. Рестрикционные расщепления затем используют для дополнительного подтверждения целостности XTEN в каждой области. Аминокислота и последовательности, кодирующие DNA, получаемых гибридных белков CFXTEN приведены в табл. 21. Получаемые конструкции нумеруют от pSD0077 до pSD0092.

Построение экспрессирующих векторов FVIII BDD с 4-6 вставками XTEN в пределах сайтов 18, 403, 1656, 1720, 1900 или 2332.

Конструкции от pSD0077 до pSD0092 служат в качестве строительных блоков, для того, чтобы получить конструкции с от 4- до 6- XTEN со вставками в 18, 403, 1656, 1720, 1900 и 2332. Были выбраны конструкции строительного блока и рестрикционные ферменты для клонирования конструкций, которые приведены в табл. 19 ниже. Выбранные компоненты расщепляют уникальными рестрикционными ферментами. DNA вставок и векторов отделяют с помощью 1% агарозного геля и очищают с помощью набора для экстракции на основе геля Qiagen. Вставку и вектор лигируют, а затем трансформируют в DH5α. E. coli компетентных клеток-хозяев. Восемь колоний для каждой из конструкций анализируют с помощью способа молекулярных колоний и секвенирования DNA. Клоны с нужными вставками XTEN минипрепарируют. Рестрикционные расщепления затем используют для дополнительного подтверждения целостности XTEN в каждой области. Аминокислота и последовательности, кодирующие DNA, для получаемых гибридных белков CFXTEN, приведены в табл. 21. Получаемые конструкции нумеруют от pBC0247 до pBC0257, pNL0022, 23, 24, 25 и 30.

Построение экспрессирующих векторов FVIII BDD с 4-6 вставками XTEN в пределах сайтов 18, 403, 745, 1720, 1900 или 2332.

Конструкции от pBC0247 до pBC0252, pBC0255, от pNL0022 до pNL0025 служат в качестве строительных блоков, для того, чтобы получить конструкции с от 4- до 6-XTEN со вставками в 18, 403, 745, 1720, 1900 и 2332. Были выбраны конструкции строительного блока и рестрикционные ферменты для клонирования конструкций, которые приведены в табл. 19 ниже. Выбранные компоненты расщепляют уникальными рестрикционными ферментами. DNA вставок и векторов отделяют с помощью 1% агарозного геля и очищают с помощью набора для экстракции на основе геля Qiagen. Вставку и вектор лигируют, а затем трансформируют в DH5α. E. coli компетентные клетки-хозяева. Восемь колоний для каждой из конструкций анализируют с помощью способа молекулярных колоний и секвенирования DNA. Клоны с нужными вставками XTEN минипрепарируют. Рестрикционные расщепления затем используют для дополнительного подтверждения целостности XTEN в каждой области. Аминокислота и последовательности, кодирующие DNA, для получаемых гибридных белков CFXTEN, приведены в табл. 21. Получаемые конструкции нумеруют от pBC0258 до pBC0268.

Таблица 19
План клонирование в случае библиотек FVIII с 3-5 вставками XTEN
в пределах сайтов 26, 403, 1656, 1720 или 1900

Название конструкции	Компоненты вставки (область XTEN)	Компоненты вектора (область XTEN)	Рестрикционные ферменты
pSD0077	pSD0050 (A1-R1)	LSD0039.010 (A2-R1, a3)	BsiWI+AflII
pSD0078	pSD0010 (A3-R1)	LSD0005.002 (A1-R1, A2-R1)	ClaI+XbaI
pSD0079	pSD0062 (A3-R2)	LSD0005.002 (A1-R1, A2-R1)	ClaI+XbaI
pSD0080	pSD0050 (A1-R1)	LSD0045.002 (a3, A3-R1)	BsiWI+AflII
pSD0081	pSD0050 (A1-R1)	LSD0046.002 (a3, A3-R2)	BsiWI+AflII
pSD0082	pSD0050 (A1-R1)	LSD0044.002 (A3-R1, A3-R2)	BsiWI+AflII
pSD0083	pSD0010 (A3-R1)	LSD0039.010 (A2-R1, a3)	ClaI+XbaI
pSD0084	pSD0062 (A3-R2)	LSD0039.010 (A2-R1, a3)	ClaI+XbaI
pSD0085	pSD0062 (A3-R2)	LSD0041.008 (A2-R1, A3-R1)	PflMI+XbaI
pSD0086	pSD0062 (A3-R2)	LSD0045.002 (a3, A3-R1)	PflMI+XbaI
pSD0087	LSD0039.010 (A2-R1, a3)	LSD0040.002 (A1-R1, A3-R1)	NheI+ClaI
pSD0088	LSD0039.010 (A2-R1, a3)	LSD0042.013 (A1-R1, A3-R2)	NheI+ClaI
pSD0089	LSD0044.002 (A3-R1, A3-R2)	LSD0005.002 (A1-R1, A2-R1)	ClaI+XbaI
pSD0090	LSD0044.002 (A3-R1, A3-R2)	LSD0038.001 (A1-R1, a3)	ClaI+XbaI
pSD0091	LSD0044.002 (A3-R1, A3-R2)	LSD0039.010 (A2-R1, a3)	ClaI+XbaI
pSD0092	LSD0044.002 (A3-R1, A3-R2)	pSD0077 (A1-R1, A2-R1, a3)	ClaI+XbaI
pBC0247	pSD0077	LSD0050.003	NheI+BstBI
pBC0248	pSD0078	LSD0050.003	NheI+BstBI
pBC0249	pSD0079	LSD0050.003	NheI+BstBI
pBC0250	pSD0080	LSD0050.003	NheI+BstBI
pBC0251	pSD0082	LSD0050.003	NheI+BstBI
pBC0252	pSD0080	LSD0050.003	NheI+BstBI

pBC0253	pSD0087	LSD0050.003	NheI+BstBI
pBC0254	pSD0088	LSD0050.003	NheI+BstBI
pBC0255	pSD0089	LSD0050.003	NheI+BstBI
pBC0256	pSD0090	LSD0050.003	NheI+BstBI
pBC0257	pSD0092	LSD0050.003	NheI+BstBI
pNL0022	LSD0003.009	pSD0083	XbaI+AgeI
pNL0023	LSD0003.009	pSD0084	XbaI+AgeI
pNL0024	LSD0003.009	pSD0085	XbaI+AgeI
pNL0025	LSD0003.009	pSD0086	XbaI+AgeI
pNL0030	LSD0003.009	pSD0091	XbaI+AgeI
pBC0258	LSD0003.006	pBC0247	BamHI+ClaI
pBC0259	LSD0003.006	pBC0248	BamHI+ClaI
pBC0260	LSD0003.006	pBC0249	BamHI+ClaI
pBC0261	LSD0003.006	pBC0250	BamHI+ClaI
pBC0262	LSD0003.006	pBC0251	BamHI+ClaI
pBC0263	LSD0003.006	pBC0252	BamHI+ClaI
pBC0264	LSD0003.006	pBC0255	BamHI+ClaI
pBC0265	LSD0003.006	pNL0022	BamHI+ClaI
pBC0266	LSD0003.006	pNL0023	BamHI+ClaI
pBC0267	LSD0003.006	pNL0024	BamHI+ClaI
pBC0268	LSD0003.006	pNL0025	BamHI+ClaI

Пример 23. Построение экспрессирующих векторов CFXTEN с тремя или четырьмя XTEN: первый XTEN в домене B, второй XTEN на C-конце, а третью или четвертая вставка XTEN в пределах доменов A1 или A2 или A3.

Библиотеки гибридных белков CFXTEN строят с тремя вставками XTEN с помощью комбинирования коагулиционноактивных клонов со вставками XTEN в доменах A1, A2 или A3 и клонов с XTEN, вводимых в домене B и на C-конце. Дополнительные библиотеки строят с четвертым XTEN, добавленным в домены A1, A2 или A3, для того, чтобы выбрать членов 3 библиотек XTEN. Строение схемы клонирования суммируют в табл. ниже. DNA получают в случае вставок и векторов с помощью расщепления рестрикционным ферментом и очистка на агарозном геле. После лигирования вставки с соответствующими векторами, лигированную смесь DNA используют для трансформирования DH5a компетентных клеток-хозяев E. coli. Трансформанты обследуют с помощью RCA и секвенирования, чтобы охватить приблизительно 3-4 потенциальных размера библиотеки. Уникальные клоны определяют и минипрепарируют. Затем, для дополнительного подтверждения целостности каждого XTEN, используют три различные рестрикционные расщепления. Аминокислота и последовательности, кодирующие DNA, получаемых гибридных белков CFXTEN приведены в табл. 21.

Таблица 20
План клонирование в случае библиотек FVIII с 3 вставками XTEN в пределах сайтов домена B, C-конца и домена A1/A2/a3

ID библиотеки	Компоненты вставки (область XTEN)	Компоненты вектора (область XTEN)	Рестрикционные ферменты
LSD0049	LSD0003.006 (Домен B и C-конец)	pSD0045, pSD0046, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	BamHI+AgeI
LSD0050	LSD0003.009 (Домен B и C-конец)	pSD0045, pSD0046, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	BamHI+AgeI
LSD0051	LSD0003.006 (Домен B и C-конец)	pSD0032, pSD0001, pSD0003 (A2-R1)	BamHI+AgeI
LSD0052	LSD0003.009 (Домен B и C-конец)	pSD0032, pSD0001, pSD0003 (A2-R1)	BamHI+AgeI
LSD0053	pSD0040, pSD0010, pSD0041 (A3-R1)	LSD0003.006 (домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
LSD0054	pSD0040, pSD0010, pSD0041 (A3-R1)	LSD0003.009 (домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
LSD0055	pSD0062, pSD0063, pSD0043, pSD0044 (A3-R2)	LSD0003.006 (домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
LSD0056	pSD0062, pSD0063, pSD0043, pSD0044 (A3-R2)	LSD0003.009 (домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
LSD0057	pSD0001 (A2-R1)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, домен B и C-конец)	NheI+BamHI
LSD0058	pSD0003 (A2-R1)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, домен B и C-конец)	NheI+BamHI
LSD0059	pNL0005 (A2-R1)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, домен B и C-конец)	NheI+BamHI
LSD0060	pBC0246 (A2-R1)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, домен B и C-конец)	NheI+BamHI
LSD0061	pSD0009 (A3-R1)	LSD0049.021, LSD0049.002,	ClaI+XbaI

		LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, домен B и C-конец)	
LSD0062	pSD0010 (A3-R1)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
LSD0063	pNL0004 (A3-R2)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
LSD0064	pSD0063 (A3-R2)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
LSD0065	pNL0002 (A3-R2)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
LSD0066	pSD0043 (A3-R2)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
LSD0067	pNL0003 (A3-R2)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
LSD0068	pSD0044 (A3-R2)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
LSD0069	pSD0009 (A3-R1)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
LSD0070	pSD0010 (A3-R1)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
LSD0071	pNL0004 (A3-R2)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
LSD0072	pSD0063 (A3-R2)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
LSD0073	pNL0002 (A3-R2)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
LSD0074	pSD0043 (A3-R2)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
LSD0075	pNL0003 (A3-R2)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
LSD0076	pSD0044 (A3-R2)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
pSD0093	pNL0004 (A3-R2)	LSD0053.022 (A3-R1, домен B и C-конец)	PflMI+XbaI
pSD0094	pSD0063 (A3-R2)	LSD0053.022 (A3-R1, домен B и C-конец)	PflMI+XbaI

pSD0095	pNL0002 (A3-R2)	LSD0053.022 (A3-R1, домен B и C-конец)	PflMI+XbaI
pSD0096	pSD0043 (A3-R2)	LSD0053.022 (A3-R1, домен B и C-конец)	PflMI+XbaI
pSD0097	pNL0003 (A3-R2)	LSD0053.022 (A3-R1, домен B и C-конец)	PflMI+XbaI
pSD0098	pSD0044 (A3-R2)	LSD0053.022 (A3-R1, домен B и C-конец)	PflMI+XbaI
pCS0001	pBC0168 (A1)	LSD0055.021 (A3-R1, домен B и C-конец)	BsiWI+BamHI
pCS0002	pBC0134 (A2_R2)	LSD0055.021 (A3-R1, домен B и C-конец)	BsiWI+BamHI
pCS0003	pBC0179 (C1)	LSD0055.021 (A3-R1, домен B и C-конец)	ApaI+XbaI
pCS0004	pBC0143 (C1)	LSD0055.021 (A3-R1, домен B и C-конец)	ApaI+XbaI
pCS0005	pBC0182 (C2)	LSD0055.021 (A3-R1, домен B и C-конец)	ApaI+XbaI
pCS0006	pBC0144 (C2)	LSD0055.021 (A3-R1, домен B и C-конец)	ApaI+XbaI
pBC0269	pBC0165 (A1_R1)	LSD0003.006 (домен B и C-конец)	BsiWI+BamHI
pBC0270	pBC0132 (A2_R1)	LSD0003.006 (домен B и C-конец)	BsiWI+BamHI
pBC0271	pBC0138 (A3_R1)	LSD0003.006 (домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
pBC0272	pBC0176 (A3_R2)	LSD0003.006 (домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
pBC0273	pSD0001 (A2_R1)	LSD0003.006 (домен B и C-конец)	BsiWI+BamHI
pBC0274	pSD0009 (A3_R1)	LSD0003.006 (домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
pBC0275	pNL0004 (A3_R2)	LSD0003.006 (домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
pBC0276	pBC0280 (A1_R1)	LSD0003.006 (домен B и C-конец)	BsiWI+BamHI
pBC0277	pBC0281 (A2_R1)	LSD0003.006 (домен B и C-конец)	BsiWI+BamHI
pBC0278	pBC0282 (A3_R1)	LSD0003.006 (домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
pBC0279	pBC0283 (A3_R2)	LSD0003.006 (домен B и C-конец)	ClaI+XbaI
L09_01	pBC0284 (CT)	pBC0285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293 (домен B и A3_R2)	XbaI+AgeI
L09_01	pSD0014 (CT)	pBC0285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293 (домен B и A3_R2)	XbaI+AgeI
L09_01	pSD0020 (CT)	pBC0285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293 (домен B и A3_R2)	XbaI+AgeI

Таблица 21

Конструкции DNA и аминокислотных последовательностей FVIII-XTEN

Название конструкции	Аминокислотная последовательность, раскрытая как SEQ ID NO:	Последовательность DNA, раскрытая как SEQ ID NO:
pBC0114	595	596
pBC0126	597	598
pBC0127	599	600
pBC0165	601	602
pBC0183	603	604
pBC0184	605	606
pBC0166	607	608
pBC0185	609	610
pBC0167	611	612
pBC0128	613	614
pBC0168	615	616
pBC0129	617	618
pBC0169	619	620
pBC0130	621	622
pBC0131	623	624
pBC0132	625	626
pBC0170	627	628
pBC0133	629	630
pBC0171	631	632
pBC0134	633	634
pBC0172	635	636
pBC0135	637	638
pBC0149	639	640
pBC0136	641	642
pBC0137	643	644
pBC0138	645	646
pBC0139	647	648
pBC0140	649	650
pBC0173	651	652
pBC0174	653	654
pBC0175	655	656
pBC0176	657	658
pBC0177	659	660
pBC0178	661	662
pBC0141	663	664
pBC0179	665	666
pBC0180	667	668
pBC0142	669	670
pBC0143	671	672
pBC0181	673	674
pBC0182	675	676
pBC0144	677	678
pBC0145	679	680
pBC0146	681	682

pSD0001	683	684
pSD0002	685	686
pSD0003	687	688
pSD0004	689	690
pSD0005	691	692
pSD0006	693	694
pSD0007	695	696
pSD0008	697	698
pSD0009	699	700
pSD0010	701	702
pSD0011	703	704
pSD0012	705	706
pSD0013	707	708
pSD0014	709	710
pSD0017	711	712
pSD0018	713	714
pSD0019	715	716
pSD0020	717	718
pSD0015	719	720
pSD0016	721	722
pSD0021	723	724
pSD0022	725	726
pSD0023	727	728
pSD0024	729	730
pSD0025	731	732
pSD0026	733	734
pSD0027	735	736
pSD0028	737	738
pSD0029	739	740
pSD0030	741	742
pSD0031	743	744
pSD0032	745	746
pSD0033	747	748
pSD0034	749	750
pSD0035	751	752
pSD0036	753	754
pSD0037	755	756
pSD0038	757	758
pSD0039	759	760
pSD0040	761	762
pSD0041	763	764
pSD0042	765	766
pSD0043	767	768
pSD0044	769	770
pSD0062	771	772
pSD0063	773	774
pSD0045	775	776
pSD0046	777	778
pSD0047	779	780
pSD0048	781	782

pSD0049	783	784
pSD0050	785	786
pSD0051	787	788
pSD0052	789	790
pSD0053	791	792
pSD0054	793	794
pSD0055	795	796
pSD0056	797	798
pSD0057	799	800
pSD0058	801	802
pSD0059	803	804
pSD0060	805	806
pSD0061	807	808
LSD0001.002	809	810
LSD0001.005	811	812
LSD0001.006	813	814
LSD0001.011	815	816
LSD0001.012	817	818
LSD0001.013	819	820
LSD0001.016	821	822
LSD0001.021	823	824
LSD0002.001	825	826
LSD0002.002	827	828
LSD0002.014	829	830
LSD0003.004	831	832
LSD0003.006	833	834
LSD0003.009	835	836
LSD0003.014	837	838
LSD0004.010	839	840
LSD0004.011	841	842
LSD0004.014	843	844
LSD0004.016	845	846
LSD0004.022	847	848
LSD0003.016	849	850
LSD0005.002	851	852
LSD0005.004	853	854
LSD0005.005	855	856
LSD0005.011	857	858
LSD0005.018	859	860
LSD0006.002	861	862
LSD0006.005	863	864
LSD0006.007	865	866
LSD0006.011	867	868
LSD0007.002	869	870
LSD0007.004	871	872
LSD0007.013	873	874
LSD0008.001	875	876
LSD0008.002	877	878
LSD0008.006	879	880
LSD0008.009	881	882

LSD0008.017	883	884
LSD0002.025	885	886
LSD0002.013	887	888
LSD0003.025	889	890
LSD0004.025	891	892
LSD0003.005	893	894
LSD0007.008	895	896
LSD0044.002	897	898
LSD0044.005	899	900
LSD0044.039	901	902
LSD0044.022	903	904
LSD0044.003	905	906
LSD0044.001	907	908
LSD0038.001	909	910
LSD0038.003	911	912
LSD0038.008	913	914
LSD0038.012	915	916
LSD0038.013	917	918
LSD0038.015	919	920
LSD0039.001	921	922
LSD0039.003	923	924
LSD0039.010	925	926
LSD0045.001	927	928
LSD0045.002	929	930
LSD0042.014	931	932
LSD0042.023	933	934
LSD0042.006	935	936
LSD0042.013	937	938
LSD0042.001	939	940
LSD0042.039	941	942
LSD0042.047	943	944
LSD0042.003	945	946
LSD0042.004	947	948
LSD0042.008	949	950
LSD0042.038	951	952
LSD0042.082	953	954
LSD0042.040	955	956
LSD0037.002	957	958
LSD0037.009	959	960
LSD0037.011	961	962
LSD0047.002	963	964
LSD0047.005	965	966
LSD0048.007	967	968
LSD0046.001	969	970
LSD0046.002	971	972
LSD0046.003	973	974
LSD0040.011	975	976
LSD0040.042	977	978
LSD0040.002	979	980
LSD0040.008	981	982

LSD0040.021	983	984
LSD0040.037	985	986
LSD0040.046	987	988
LSD0040.003	989	990
LSD0040.006	991	992
LSD0040.007	993	994
LSD0040.010	995	996
LSD0040.039	997	998
LSD0040.052	999	1000
LSD0041.001	1001	1002
LSD0041.004	1003	1004
LSD0041.006	1005	1006
LSD0041.008	1007	1008
LSD0041.010	1009	1010
LSD0041.014	1011	1012
LSD0041.016	1013	1014
LSD0041.035	1015	1016
LSD0043.001	1017	1018
LSD0043.002	1019	1020
LSD0043.005	1021	1022
LSD0043.006	1023	1024
LSD0043.007	1025	1026
LSD0043.008	1027	1028
LSD0043.015	1029	1030
LSD0043.029	1031	1032
LSD0043.043	1033	1034
pSD0077	1035	1036
pSD0078	1037	1038
pSD0079	1039	1040
pSD0080	1041	1042
pSD0081	1043	1044
pSD0082	1045	1046
pSD0083	1047	1048
pSD0084	1049	1050
pSD0085	1051	1052
pSD0086	1053	1054
pSD0087	1055	1056
pSD0088	1057	1058
pSD0089	1059	1060
pSD0090	1061	1062
pSD0091	1063	1064
pSD0092	1065	1066
LSD0049.002	1067	1068
LSD0049.008	1069	1070
LSD0049.011	1071	1072
LSD0049.012	1073	1074
LSD0049.020	1075	1076
LSD0049.021	1077	1078
LSD0050.002	1079	1080
LSD0050.003	1081	1082

LSD0050.007	1083	1084
LSD0050.010	1085	1086
LSD0050.012	1087	1088
LSD0050.014	1089	1090
LSD0051.002	1091	1092
LSD0051.003	1093	1094
LSD0052.001	1095	1096
LSD0052.003	1097	1098
LSD0053.021	1099	1100
LSD0053.022	1101	1102
LSD0053.024	1103	1104
LSD0054.021	1105	1106
LSD0054.025	1107	1108
LSD0054.026	1109	1110
LSD0055.021	1111	1112
LSD0055.022	1113	1114
LSD0055.026	1115	1116
LSD0056.021	1117	1118
LSD0056.024	1119	1120
LSD0056.025	1121	1122
pNL0001	1123	1124
pNL0002	1125	1126
pNL0003	1127	1128
pNL0004	1129	1130
pNL0005	1131	1132
pNL0006	1133	1134
pNL0007	1135	1136
pNL0008	1137	1138
pNL0009	1139	1140
pNL0010	1141	1142
pBC0244	1143	1144
pBC0245	1145	1146
pBC0246	1147	1148
pBC0247	1149	1150
pBC0248	1151	1152
pBC0249	1153	1154
pBC0250	1155	1156
pBC0251	1157	1158
pBC0252	1159	1160
pBC0253	1161	1162
pBC0254	1163	1164
pBC0255	1165	1166
pBC0256	1167	1168
pBC0257	1169	1170
pBC0259	1171	1172
pBC0260	1173	1174
pBC0262	1175	1176
pBC0263	1177	1178
pBC0264	1179	1180
pBC0266	1181	1182

pBC0267	1183	1184
pBC0268	1185	1186
pNL0016	1187	1188
pNL0017	1189	1190
pNL0018	1191	1192
pNL0022	1193	1194
pNL0023	1195	1196
pNL0024	1197	1198
pNL0025	1199	1200
pNL0030	1201	1202
LSD0057.001	1203	1204
LSD0057.004	1205	1206
LSD0057.005	1207	1208
LSD0057.010	1209	1210
LSD0058.003	1211	1212
LSD0058.005	1213	1214
LSD0058.006	1215	1216
LSD0059.002	1217	1218
LSD0059.003	1219	1220
LSD0059.005	1221	1222
LSD0059.006	1223	1224
LSD0060.001	1225	1226
LSD0060.003	1227	1228
LSD0060.004	1229	1230
LSD0061.002	1231	1232
LSD0061.007	1233	1234
LSD0061.008	1235	1236
LSD0061.012	1237	1238
LSD0062.001	1239	1240
LSD0062.002	1241	1242
LSD0062.006	1243	1244
LSD0062.007	1245	1246
LSD0063.001	1247	1248
LSD0063.003	1249	1250
LSD0063.011	1251	1252
LSD0064.017	1253	1254
LSD0064.018	1255	1256
LSD0064.020	1257	1258
LSD0064.021	1259	1260
LSD0065.001	1261	1262
LSD0065.007	1263	1264
LSD0065.014	1265	1266
LSD0066.001	1267	1268
LSD0066.002	1269	1270
LSD0066.009	1271	1272
LSD0066.011	1273	1274
LSD0067.004	1275	1276
LSD0067.005	1277	1278
LSD0067.006	1279	1280
LSD0067.008	1281	1282

LSD0068.001	1283	1284
LSD0068.002	1285	1286
LSD0068.005	1287	1288
LSD0068.010	1289	1290
LSD0069.004	1291	1292
LSD0069.008	1293	1294
LSD0070.003	1295	1296
LSD0070.004	1297	1298
LSD0070.005	1299	1300
LSD0071.001	1301	1302
LSD0071.002	1303	1304
LSD0071.008	1305	1306
LSD0072.001	1307	1308
LSD0072.002	1309	1310
LSD0072.003	1311	1312
LSD0073.002	1313	1314
LSD0073.004	1315	1316
LSD0073.006	1317	1318
LSD0074.007	1319	1320
LSD0074.010	1321	1322
LSD0074.011	1323	1324
LSD0075.003	1325	1326
LSD0075.004	1327	1328
LSD0075.007	1329	1330
LSD0076.002	1331	1332
LSD0076.003	1333	1334
pSD0093	1335	1336
pSD0094	1337	1338
pSD0095	1339	1340
pSD0096	1341	1342
pSD0097	1343	1344
pSD0098	1345	1346
pSD0099	1347	1348
pSD0100	1349	1350
pSD0101	1351	1352
pSD0102	1353	1354
pSD0103	1355	1356
pSD0104	1357	1358
pCS0001	1359	1360
pCS0002	1361	1362
pCS0003	1363	1364
pCS0004	1365	1366
pCS0005	1367	1368
pCS0006	1369	1370
pBC0269	1371	1372
pBC0270	1373	1374
pBC0271	1375	1376
pBC0272	1377	1378
pBC0273	1379	1380
pBC0274	1381	1382

pBC0275	1383	1384
pBC0276	1385	1386
pBC0277	1387	1388
pBC0278	1389	1390
pBC0279	1391	1392
pBC0280	1393	1394
pBC0281	1395	1396
pBC0282	1397	1398
pBC0283	1399	1400
pBC0284	1401	1402
pBC0285	1403	1404
pBC0286	1405	1406
pBC0287	1407	1408
pBC0288	1409	1410
pBC0289	1411	1412
pBC0290	1413	1414
pBC0291	1415	1416
pBC0292	1417	1418
pBC0293	1419	1420
pBC0294	1421	1422
pBC0295	1423	1424
pBC0296	1425	1426
pBC0297	1427	1428
pBC0298	1429	1430
pBC0299	1431	1432
pBC0300	1433	1434
pBC0301	1435	1436
pBC0302	1437	1438
pBC0303	1439	1440
pBC0304	1441	1442
pBC0305	1443	1444
pBC0306	1445	1446
pBC0307	1447	1448
pBC0308	1449	1450
pBC0309	1451	1452
pBC0310	1453	1454
pBC0311	1455	1456
pBC0312	1457	1458
pBC0313	1459	1460
pBC0314	1461	1462
pBC0315	1463	1464
pBC0316	1465	1466
pBC0317	1467	1468
pBC0318	1469	1470
pBC0319	1471	1472
pBC0320	1473	1474
pBC0321	1475	1476
PBC0322	1477	1478
PBC0323	1479	1480
pNL0040	1481	1482
pNL0041	1483	1484
pNL0042	1485	1486
pNL0043	1487	1488

Пример 24. Трансфекция клеток млекопитающих, экспрессия FVIII-XTEN и оценка активности FVIII.

Клетки млекопитающих, которые содержат, но без ограничения ими, CHO, BHK, COS, и HEK293, подходят для трансформации с векторами из примеров, приведенными выше, для того, чтобы экспрессировать и восстановливать гибридный белок FVIII-XTEN. Ниже приведены детали способов, используемых для экспрессирования FVIII BDD и конструкций pBC0114, pBC0135, pBC0136, pBC0137, pBC0145, pBC0146, и pBC0149 гибридного белка FVIII-XTEN с помощью временной трансфекции, которая содержит электропорацию и способы химической (PEI) трансфекции.

Адгезивные клетки HEK293, приобретенные от ATCC, восстанавливают в среде по рекомендации производителя и пересевают несколько поколений перед тем, как несколько пробирок замораживают в среде с 5% DMSO. Одну пробирку восстанавливают и пересевают еще раз перед трансфекцией. Клетки HEK293 высевают за 1-2 дня перед трансфекцией при плотности приблизительно 7×10^5 на мл в T175 за трансфекцию, с использованием 35 мл среды. В день трансфекции клетки обрабатывают трипсином, разделяют и пересчитывают, затем промывают в среде до тех пор, пока не достигнут суспензии клеток. Клетки пересчитывают и соответствующий объем клеток (на основе количества клеток выше) транспор-

тируют в 50 мл пробирку для центрифуги, так что они составляют приблизительно 4×10^6 клеток на трансфекцию. Клетки центрифугируют в течение 5 мин при 500 RCF, супернатант удаляют, а клетки ресуспендируют в 10 мл D-PBS.

Электропорация: В случае электропорации, соответствующий объем буфера для ресуспензии добавляют с использованием микропипетки (обеспечиваемый в Neon™ Transfection System 100µl Kit), так что 110 мкл буфера на трансфекцию являются доступными. Разделяют объемы по 110 мкл клеточной суспензии, добавляют к каждой пробирке Eppendorf, которая содержит 11 мкл плазмидной DNA в случае каждой из отдельных конструкций FVIII-XTEN в общей сложности 6 мкг (объем DNA может быть меньше, количества до 11 мкл со стерильной H_2O). Для трансфекции используют Neon™ Transfection Device. Программу устанавливают для электропорации при 1100 вольт при длительности импульса 20 мс, в общей сложности двумя импульсами. Neon™ Tube (обеспечиваемую в Neon™ Transfection System 100 µL Kit) размещают в Neon™ Pipette Station. Объем 3 мл Electrolytic Buffer E2 (обеспечиваемый в Neon™ Transfection System 100 µL Kit) добавляют в Neon™ Tube. Neon™ Pipettes и 100 µL Neon™ Tips используют для электропорации 100 мкл смеси клетки-плазмиды DNA с использованием Neon™ Pipette Station. Выполняют электропорацию, а после завершения, Neon™ Pipettes удаляют из Station и пипетку с трансфицированными клетками используют для транспортирования клеток, с круговым движением, в чашку Петри 100 мм×20 мм, которая содержит 10 мл Opti-MEM I Reduced-Serum Medium (IX, Invitrogen), так что трансфицированные клетки равномерно распределяют в чашке. Для экспрессии клетки в случае каждой трансфекции инкубируют при 37°C. На 3-й день после трансфекции, к каждой культуре клеток добавляют 10% объема солевого раствора из 10 мМ Hepes, 5 мМ $CaCl_2$ и 4М NaCl и аккуратно перемешивают в течение 30 минут. Каждую культуру клеток транспортируют в 50 мл коническую пробирку для центрифуги и центрифугируют при 3000 об./мин в течение 10 минут при 4°C. Супернатанты каждой культуры помещают в новую 50 мл коническую пробирку и затем разделяют на аликвоты по 5×1 мл в Eppendorf и 2×15 мл конические пробирки для анализа или быстро замораживают перед проверкой на экспрессию FVIII-XTEN в ELISA и свойства в анализе активности FVIII, как описано в данном документе.

Химическая трансфекция: Химическую трансфекцию могут осуществлять с использованием стандартных способов, известных в данной области техники. В настоящем примере используют PEI, как описано.

Суспензию клеток 293 высевают за день перед трансфекцией при 7×10^5 клеток/мл в достаточной среде Freestyle 293 (Invitrogen) для обеспечения по меньшей мере 30 мл рабочего объема и инкубируют при 37°C. В день трансфекции аликвоту в 1,5 мл среды для трансфекции выдерживают при комнатной температуре, к которой добавляют 90 мкл 1 мг/мл PEI и недолго перемешивают вихревым способом. Объем 30 мкл DNA, кодирующей конструкцию FVIII-XTEN_AE288, (с концентрацией 1 мг/мл) добавляют к раствору PEI, который перемешивают вихревым способом в течение 30 сек. Смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 5-15 мин. Смесь DNA/PEI добавляют к клеткам HEK293 и суспензию инкубируют при 37°C с использованием заранее установленных условий встряхиваемой колбы. Около 4 ч после добавления смеси DNA/PEI, добавляют 1× объем выдержанной среды и инкубируют клетки при 37°C в течение 5 дней. В день сбора, к культуре клеток добавляют 10% объем солевого раствора 10mM Hepes, 5mM $CaCl_2$ и 4M NaCl и аккуратно перемешивают в течение 30 минут. Культуру клеток транспортируют в 50 мл коническую пробирку для центрифуги и центрифугируют при 4000 об./мин в течение 10 минут при 4°C. Супернатант помещают в новую 50 мл коническую пробирку и затем разделяют на аликвоты 5×1 мл в Eppendorf и 2×15 мл в конические пробирки для анализа или быстро замораживают перед проверкой на экспрессию FVIII-XTEN в ELISA и/или свойства в анализе активности FVIII, как описано в данном документе.

Генерирование стабильных пулов и клеточных линий, которые получают FVIII-XTEN.

Стабильные пулы получают с помощью культивирования трансфицированных клеток в течение 3-5 недель в среде, которая содержит выбор антибиотиков, таких как пиромицин, со сменой среды каждые 2-3 дня. Стабильные клетки могут использоваться для либо получения, либо генерирования стабильных клонов. В случае выбора стабильной клеточной линии во время первичного тестирования, клетки из стабильных пулов, либо из осуществляемого пассирования, либо восстановленные из замороженных пробирок, высевают в 96-луночные планшеты при целевой плотности 0,5 клеток/лунку. Около 1 недели после высевания использованную среду из лунок с одинаковым кластером клеток, как наблюдают под микроскопом, проверяют на экспрессию FVIII с помощью анализа активности или измерения антигена.

В случае дополнительных циклов тестирования, нормализованные количества клеток высевают в мульти-луночных планшетах. Использованную среду собирают и проверяют концентрацию FVIII с помощью ELISA и анализа активности FVIII. Клетки также могут быть собраны с планшетов и пересчитаны с использованием Vi-Cell. Клоны упорядочивают по (1) титрам FVIII в соответствии с ELISA и активностью; (2) отношениям титр/количество клеток ELISA и титр активности/количество клеток; и (3) целостность и гомогенность продуктов, полученных с помощью клонов, как измерено с помощью Вестерн-блоттинга. Количество клонов в случае каждой из конструкций выбирают из первичного тестиро-

вания в случае дополнительных циклов тестирования.

Для второго цикла тестирования, клетки в 96-луночные планшеты для лучших клонов, выбранных из первичного тестирования сначала развивают в колбах T25, а затем высевают в одинаковых 24-луночных планшетах. Использованную среду собирают с планшетов для количественной оценки активности FVIII и антиген, а клетки собирают и пересчитывают с помощью Vi-Cell. Клоны упорядочивают, а затем, выбранные в соответствии с титрами с помощью ELISA и анализа активности, отношения титр/клетка и титр активности/количество клеток в анализе ELISA. Замороженные пробирки получают в случае по меньшей мере 5-10 клонов и снова эти клоны обследуют и сортируют в соответствии с титрами в случае ELISA и анализа активности, и отношения титр/количество клеток и титр активности/количество клеток анализа ELISA, и целостность продукта и гомогенность с помощью вестерн-блоттинга, и 2-3 клона выбирают для оценки продуктивности во встряхиваемых колбах.

Полученные клоны выбирают, основываясь на специфической продуктивности и качестве продукта. Получение FVIII-XTEN, секретируемые в культуральной клеточной среде с помощью суспензионных стабильных клонов 293.

Стабильные клеточные клоны HEK293, выбранные с помощью вышеуказанных способов, высевают во встряхиваемые колбы при 1-2 $\times 10^5$ клеток/мл в экспрессирующей среде. Количество клеток, жизнеспособность клеток, активность FVIII и титры экспрессии антигена контролируют ежедневно. В день, когда активность FVIII, титры антигена и качество продукции являются оптимальными, культуру собирают либо центрифугированием/стерилизующим фильтрованием, либо глубинным фильтрованием/стерилизующим фильтрованием. Фильтрат используют либо непосредственно для обработки с помощью тангенциальной поточной фильтрации (TFF) и очистки, либо хранят в морозильной камере при -80°C для обработки TFF и очистки позже.

Пример 25. Очистка и определение характеристик конструкций CFXTEN.

Иллюстративные способы очистки и определения характеристик конструкций CFXTEN с одним или несколькими XTEN приведены далее.

Очистка FVII-XTEN_AE864 с помощью аффинной хроматографии FVIII.

CFXTEN, который содержит супернатант, фильтруют с использованием фильтра Cuno ZetaPlus Biocap и капсулы Cuno BioAssure и впоследствии концентрируют с помощью тангенциальной поточной фильтрации с использованием картриджа Millipore Pellicon 2 Mini с 30000 Да MWCO. Используя такой же картридж для тангенциальной поточной фильтрации, образец подвергают диафильтрации в 10 мМ гистидина, 20 мМ хлорида кальция, 300 мМ хлорида натрия и 0,02% Tween 80 при pH 7,0. FVIII-селективная смола (GE 17-5450-01) избирательно связывает FVIII или FVIII без домена B с использованием лиганда рекомбинантного протеина 13 кДа в сочетании со смолой для хроматографии. Смолу уравновешивают 10 мМ гистидина, 20 мМ хлорида кальция, 300 мМ хлорида натрия и 0,02% Tween 80 при pH 7,0 и загружают супернатант. Колонку промывают 20 мМ гистидина, 20 мМ хлорида кальция, 300 мМ хлорида натрия и 0,02% Tween 80 при pH 7,0, затем промывают 20 мМ гистидина, 20 мМ хлорида кальция, 1,0 М хлорид натрия и 0,02% Tween 80 при pH 7,0, и элюируют 20 мМ гистидина, 20 мМ хлорида кальция, 1,5 М хлорида натрия и 0,02% Tween 80, растворенными в 50% этиленгликоле при pH 7,0.

Концентрация и замена буфера с помощью тангенциальной поточной фильтрации и диафильтрации.

Серии супернатантов общим объемом по меньшей мере 10 л, от стабильных клеточных линий CHO, экспрессирующих CFXTEN фильтруют с использованием фильтра Cuno ZetaPlus Biocap и капсул Cuno BioAssure. Их впоследствии концентрируют приблизительно в 20 раз с помощью тангенциальной поточной фильтрации с использованием картриджа Millipore Pellicon 2 Mini с 30000 Да MWCO. С использованием такого же картриджа тангенциальной поточной фильтрации, образец подвергают диафильтрации с 10 мМ гистидина, 20 мМ хлорида кальция, 300 мМ хлорида натрия и 0,02% Tween 80 при pH 7,0 10 мМ трис pH 7,5, 1 мМ EDTA с 5 объемами полной замены буфера. Образцы разделяют на 50 мл аликвоты и замораживают при -80°C.

Очистка CFXTEN с помощью анионообменной хроматографии.

С использованием системы Akta FPLC образец очищают с использованием колонки SuperQ-650M. Колонку уравновешивают в буфере (0,02 моль/л имидазола, 0,02 моль/л гидрохлорид этилового эфира глицина, 0,1 5 моль/л, NaCl, 2,5% глицерина, pH 6,9) и загружают образец, образец разбавляют с использованием буфера B (5 ммоль/л гистидина HCl (His/HCl), 1,15 моль/л NaCl, pH 7,0). Хроматограмму 215 нмоль используют для того, чтобы контролировать профиль элюции. Элюированные фракции анализируют на FVIII с помощью ELISA, SDS-PAGE или анализа активности. Пиковые фракции собирают и хранят или непосредственно подвергают активации тромбина (O'Brien et al., Blood (1990) 75:1664-1672). Фракции анализируют на активность FVIII с использованием анализа фактора на основе aPTT. Способ Бредфорда осуществляют для определения общего количества протеина во фракциях загрузки и элюата.

Очистка CFXTEN с помощью хроматографии с гидрофобным взаимодействием.

Образцы CFXTEN в буфере A (50 ммоль/л гистидина, 1 ммоль/л CaCl 2, 1 M NaCl и 0,2 г/л Tween 80®, pH 7,0) загружают в эфирную смолу toyopearl 650M уравновешенную в буфере A. Колонку промы-

вают буфером А 10-кратным объемом колонки для удаления DNA, неправильно свернутых форм и FVIII, и других загрязняющих белков. CFXTEN элюируют буфером В (25 ммоль/л гистидина, 0,5 ммоль/л CaCl 2 и 0,4 моль/л NaCl, pH 7,0) в качестве отдельного этапа элюирования (патент США 6005082). Фракции анализируют на активность FVIII с использованием анализа фактора на основе aPTT. Способ Бредфорда осуществляют для определения общего количества протеина во фракциях загрузки и элюата.

Удаление агрегированного белка из мономерного CFXTEN анионообменной хроматографией.

С использованием системы Akta FPLC образец очищают с использованием колонки macrocap Q. Колонку уравновешивают в буфере (20 мМ MES, 1 мМ $CaCl_2$, pH 7,0) и загружают образец. Образец разбавляют с использованием линейного градиент от 30% до 80% буфера В (20 мМ MES, 1 мМ $CaCl_2$, pH 7,0 + 500 мМ NaCl) за 20 объемов колонки. Хроматограмму 215 нм используют для того, чтобы контролировать профиль элюции. Фракции, соответствующие начальной части элюции, содержат, в первую очередь, мономерный белок, в то время как в последней части элюции содержатся, в первую очередь, агрегированные виды. Фракции из колонки macrocapQ анализируют посредством гель-проникающей хроматографии с колонкой 60 см BioSep G4000 для определения, который из пулов создает неагрегированный образец.

Активация FVIII с помощью тромбина.

Очищенный FVIII в 5 ммоль/л гистидина HCl (His/HCl), 1,15 моль/л NaCl, pH 7,0 обрабатывают тромбином при отношении 1:4 единиц тромбина человека к единицам FVIII, и образец инкубируют при 37°C в течение до 2 ч. Для того, чтобы контролировать способ активации, затем отбирают аликвоты этого образца, а ацетон осаждают с помощью добавления 4,5 объемов очень холодного ацетона. Образец инкубируют на льду в течение 10 минут, и осадок собирают с помощью центрифугирования при 13000 g в микроцентрифуге в течение 3 минут. Ацетон удаляют, и осадок ресуспендируют в 30 мкл SDS-PAGE, уменьшая буфер для образца, и кипятят в течение 2 минут. Образцы затем анализируют с помощью SDS-PAGE или вестерн-блоттинга. Превращение FVIII в FVIIIa проверяют путем поиска превращения тяжелой цепи во фрагменты с 40 и 50 кДа и превращения легкой цепи во фрагмент 70 кДа (O'Brien et al., Blood (1990) 75:1664-1672).

SEC анализ CFXTEN.

FVII-XTEN, очищенный с помощью аффинной и анионообменной хроматографии, анализируют с помощью гель-проникающей хроматографии с колонкой 60 см BioSep G4000. Монодисперсная популяция с гидродинамическим радиусом ~10 нмоль/кажущаяся ММ ~1,7 МДа (слитый XTEN-288) или ~12 нмоль/кажущаяся ММ 5,3 МДа (слитый XTEN-864) является свидетельством образца без агрегации. Предполагают, что CFXTEN имеет коэффициент средней молекулярной массы до или около 8 (в случае слияния XTEN-288 с FVIII) или до или около ~15 (в случае слияния XTEN-864 с FVIII).

Определение концентрации CFXTEN на основе ELISA.

Количественное определение концентраций фактора VIII/антигена CFXTEN с использованием энзима, связанного с иммуносорбентным способом исследования двойных антител (ELISA), осуществляют с использованием апробированных связываний антител (набор антигенов FVIII от VisuLize™, Affinity Biologicals, Онтарио, Канада). Полосообразные лунки предварительно покрывают поликлональным антителом овцы к FVIII человека. Образцы плазмы разбавляют и используют в лунках. Присутствующий антиген FVIII связан с нанесенным антителом. После вымывания несвязанного материала, меченое пероксидазой идентифицирующее овцу антитело используют и позволяют связываться с захваченным FVIII. Лунки снова промывают и используют раствор TMB (пероксидазо-специфический тетраметилбензидин) и позволяют реагировать в течение фиксированного периода времени. Развивается синий цвет, который изменяется на желтый при гашении реакции кислотой. Образованный цвет измеряют спектрофотометрически в планшете-ридере при 450 нм. Поглощение при 450 нм непосредственно пропорционально количеству антигена FVII,I захваченным в лунке. Анализ калибруют с использованием либо калибратора плазмы, входящего в комплект, либо путем замены стандартного CFXTEN в соответствующей матрице.

Оценка активность CFXTEN посредством тестирования с помощью хромогенного субстрата, связанного с FXa.

С использованием Chromogenix Coamatic Factor VIII (Chromogenix, cat# 82258563) активность FVIII или CFXTEN, который содержит FVIII, оценивают следующим образом. В присутствии ионов кальция и фосфолипидов, фактор X активируют до фактора Xa с помощью фактора IXa. Эту активацию значительно стимулируют с помощью фактора VIII, который оказывает действие в качестве кофактора в этой реакции. С помощью использования оптимального количества Ca^{2+}, фосфолипида, фактора IXa и избытка фактора X, скорость активации фактора X линейно связана с количеством фактора VIII. Фактор Xa гидролизует хромогенный субстрат S-2765, таким образом высвобождая хромофорную группу, pNA. Цвет затем считывают спектрофотометрически при 405 нм. Получают фактор Xa и, таким образом, интенсивность цвета является пропорциональной активности фактора VIII в образце. Гидролиз S-2765 под действием образованного тромбина предотвращают добавлением синтетического ингибитора тромбина I-2581 вместе с субстратом. Активность неизвестного образца определяют с помощью сравнения окончательного A405 этого образца со стандартной кривой, построенной из известных количеств фактора FVIII. Также

по определению количества антигена FVIII, присутствующего в образцах (посредством A280 или ELISA), определяют специфическую активность образца, чтобы понять специфическую активность конкретного получения FVIII. Это позволяет оценить на активность и классифицировать относительную эффективность различных стратегий выделения или структур конструкций слияний CFXTEN.

Анализы на основе aPTT для определения активности CFXTEN.

CFXTEN действует для замены FVIII во внутреннем или контактном пути активации свертывания крови. Активность этого пути свертывания оценивают с использованием анализа активированного частичного тромбопластинового времени (aPTT). Активность FVIII, в частности, измеряют следующим образом: стандартную кривую получают с помощью разбавления нормального контроля плазмы (Pacific Hemostasis cat# 100595) в два раза плазмой с дефицитом FVIII (cat# 100800), а затем проведения 6, 4-кратных серийных разбавлений снова плазмой с дефицитом фактора VIII. Это создает стандартную кривую с точками в 500, 130, 31, 7,8, 2,0, 0,5 и 0,1 МЕ/мл активности, где одна единица активности определяется как количество активности FVIIIC в 1 мл нормальной человеческой плазмы. Для определения фонового уровня активности в исходной плазме охватывают также FVIII-дефицитную плазму. Образец получают с помощью добавления CFXTEN к плазме с дефицитом FVIII в отношении 1:10 по объему. Образцы проверяют с использованием анализа aPTT следующим образом. Образцы инкубируют при 37 С в спектрофотометре для прочтения планшетов Molecular Devices в течение 2 минут, в точке, в которой добавляют эквивалентный объем реагента aPTT (Pacific Hemostasis cat# 100402) и осуществляют 3 минуты дополнительного инкубирования при 37°C. После инкубирования анализ активируют с помощью добавления одного объема хлорида кальция (Pacific Hemostasis cat# 100304). Мутность измеряют при 450 нм в течение 5 минут для создания профилей реакции. Время aPTT или время для начала активности свертывания определяют в качестве первого времени, где OD405 нм увеличена на 0,06, по сравнению с исходным. Log - линейную стандартную кривую создают с log активности, линейно связанной со временем aPTT. Из этого определяют активность образца в лунке планшета, а затем активность в образце определяют с помощью умножения на 11 для учета разбавления в плазме с дефицитом FVIII. Также с помощью определения количества антигена FVIII, присутствующего в образцах (посредством A280 или ELISA), специфическая активность образца может быть определена для понимания относительной специфической активности конкретного получения FVIII. Это делает возможным классификацию относительной эффективности различных стратегий выделения или конструкций структуры в случае слияний CFXTEN.

Вестерн-блоттинг анализ экспрессированных протеинов FVIII/FVIII-XTEN.

Образцы помещают на 8% гомогенный гель SDS и впоследствии транспортируют на мембрану PVDF. Образцы на дорожках 1-15 представляют собой: стандарты ММ, FVIII(42,5 нг), pBC0100B, pBC0114A, pBC0100, pBC0114, pBC0126, pBC0127 (8/5/11; #9), pBC0128, pBC0135, pBC0136, pBC0137, pBC0145, pBC0149 и pBC0146 соответственно. Мембрану сначала блокируют 5% молоком, затем метят анти-FVIII моноклональным антителом, GMA-012, специфическим к домену A2 тяжелой цепи (Ansong C, Miles SM, Fay PJ.J Thromb Haemost. 2006 Apr;4(4):842-7). Вставку XTEN288 в B-домен наблюдают в случае pBC0136 (дорожка 8, фиг. 22) и pBC0137 (дорожка 9, фиг. 22), в то время как вставку XTEN288 на C-конце наблюдают в случае pBC0146 (дорожка 12, фиг. 22). Все проанализированные протеины FVIII-XTEN демонстрируют присутствие одноцепочечного протеина с молекулярной массой на по меньшей мере 21 кДа больше, чем в случае основной конструкции pBC0114 или стандарта FVIII. Кроме того, вставку AE42 наблюдают в случае pBC0135 (дорожка 7, фиг. 22) и pBC0149 (дорожка 11, фиг. 22) с одной цепочкой имеет на ~5 кДа больше, чем в случае основного протеина pBC0114 и тяжелая цепь имеет на ~5 кДа больше, чем 90 кДа бэнд основного протеина.

Анализ экспрессированного FVIII с помощью ELISA.

Для проверки и количественной оценки экспрессии гибридных белков FVIII-XTEN конструкции с помощью культуры клеток осуществляют анализ ELISA. Иммобилизованные антитела, либо SAF8C-AP (Affinity Biologicals), либо GMA-8002 (Green Mountain Antibodies), либо антитела GMA011 (Green Mountain Antibodies) в случае FVIII-LC ELISA), либо с помощью антитела GMA016 иммобилизируют в лунках планшета ELISA. Лунки затем инкубируют с блокирующим буфером (1× PBS/3% BSA) для предотвращения неспецифического связывания других протеинов с анти-FVIII антителом. Разбавления стандарта FVIII (диапазон ~50 нг-0,024 нг), контроли качества и образцы среды для культивирования клеток затем инкубируют в течение 1,5 ч в лунках, для того, чтобы позволить связывание экспрессированного протеина FVIII с нанесенным антителом. Лунки затем тщательно промывают, а связанный протеин инкубируют с анти-FVIII идентифицирующим антителом, SAF8C-Biotinylated (Affinity Biologicals). Затем стрептавидин-HRP, который связывает биотин, конъюгированный с FVIII-идентифицирующим антителом, добавляют в лунку и инкубируют в течение 1 ч. Наконец, субстрат OPD добавляют в лунки и его гидролиз с помощью энзима HRP контролируют планшет-ридером при длине волны 490 нм. Концентрации образцов, содержащих FVIII, затем рассчитывают с помощью сравнения колориметрического ответа на каждое разведение культуры со стандартной кривой. Результаты в табл. 22 ниже демонстрируют, что различные конструкции FVIII-XTEN экспрессируют при 0,4 - 1 мкг/мл в среде для выращивания культур клеток. Результаты, полученные с помощью ELISA, и данные активности указывают, что гибридные белки FVIII-XTEN были очень хорошо экспрессированы с использованием описанных способов транс-

фекции. Кроме того, в условиях эксперимента, результаты демонстрируют, что значения специфической активности протеинов FVIII-XTEN являются аналогичными или выше, чем в случае основной конструкции pBC0114 (экспрессирование BDD FVIII) и поддержки, которую приводит вставка XTEN в С-конец или В-домен FVIII в сохранение функции протеина FVIII.

Хромогенный анализ активности гибридного белка CFXTEN.

BDD FVIII и конструкции pBC0114, pBC0135, pBC0136, pBC0137, pBC0145, pBC0146 и pBC0149 гибридного белка CFXTEN в различных конформациях, которые содержат XTEN AE288 и AG288, вводимые на С-конце последовательности FVIII BDD и гибридные белки FVIII-XTEN с AE42 и AE288, вводимыми после остатка 745 (или остатком 743) и перед остатком 1640 (или остатком 1638) В-домена (который содержит конструкции с сайтом процессинга P1648, мутировавшим в аланин), экспрессируют во временно трансфицированные клетки Freestyle 293, как описано выше, и проверяют на прокоагулянтную активность. Прокоагулянтная активность каждого из протеинов FVIII-XTEN, представленных в среде для выращивания культур клеток оценивают с использованием анализа фактора VIII Chromogenix Coamatic®, анализа, в котором активация фактора X линейно связана с количеством фактора VIII в образце. Анализ осуществляют в соответствии с инструкциями производителя, используя способ конечных пунктов, которые определяют спектрофотометрически при OD405 нм. Стандартную кривую создают с использованием очищенного протеина FVIII при концентрациях 250, 200, 150, 100, 75, 50, 37,5, 25, 12,5, 6,25, 3,125 и 1,56 мЕд./мл. Разбавления стандарта фактора VIII, контроли качества и образцы получают с буфером анализа и среды для культивирования PEI для учета влияния среды при выполнении анализа. Положительные контроли состоят из очищенного протеина фактора VIII в концентрациях 20, 40 и 80 мЕд./мл и среды для выращивания культур клеток основной конструкции pBC0114 FVIII, испытывающей недостаток вставок XTEN. Отрицательные контроли состоят отдельно из буфера анализа или среды для культивирования PEL Среда для выращивания культур клеток конструкций FVIII-XTEN получают как описано выше и проверяют в повторах при разбавлении 1:50, 1:150 и 1:450 и активность каждого рассчитывают в ед./мл. Каждая конструкция FVIII-XTEN демонстрирует прокоагулянтную активность, которая по меньшей мере аналогична, а в отдельных случаях выше, чем в случае положительного контроля основной конструкции, и поддержку, которая в условиях экспериментов, связывания XTEN, который содержит AE288 или AG288, на С-конце FVIII, или вставку XTEN, которая содержит AE42 или AE288 в пределах В-домена, приводит к сохранению или даже повышению прокоагулянтной активности FVIII.

Таблица 22

Результаты ELISA и хромогенных анализов активности FVIII

Конструкция FVIII-XTEN	Активность (МЕ/мл)	Концентрация (мкг/мл)	Специфическая активность (МЕ/мг)	Описание конструкции
pBC0114	3,0	0,6	5000	основная конструкция BDD FVIII, используемая для вставок XTEN
pBC0146	7,4	0,6	12759	конструкция FVIII с AG288 XTEN, вводимой на С-конце FVIII
pBC0145	3,1	0,6	4844	конструкция FVIII с AE288 XTEN, вводимой на С-конце FVIII
pBC0135	4,0	1,0	4124	конструкция FVIII с AE42 XTEN, вводимой между остатками 745 и 1640
pBC0149	4,9	0,9	5581	конструкция FVIII с AE42 XTEN, вводимой между остатками 745 и 1640 и с мутацией Arg1648 в Ala
pBC0136	2,7	0,4	7670	конструкция FVIII с AE288 XTEN, вводимой между остатками 745 и 1640
pBC0137	1,9	0,3	6013	FVIII конструкция с AE288 XTEN, вводимой между остатками 745 и 1640 и с мутацией Arg1648 в Ala

Анализ Coatest в случае анализа активности образца культуры клеток, который содержит гибридный белок CFXTEN.

С использованием анализа Coatest, активность FVIII или CFXTEN, который содержит FVIII, оценивают следующим образом.

Анализ матрицы: все лунки в таком же планшете регулируют до такого же процента среды для контроля за эффектами матрицы. Образцы для испытания разбавляют так, что показания при OD405 будет падать в пределах линейного диапазона стандарта. Диапазон концентраций в случае стандарта FVIII составляет от 100 мЕд./мл до 0,78 мЕд./мл, полученных с помощью четырехкратного серийного разбавления стандарта FVIII в 1X буфере Coatest (DiaPharma) плюс заранее определенный процент культуральной среды.

Набор реагентов Coatest SP FVIII (DiaPharma) содержит 10× исходный раствор буфера Coatest, фактор IXa + фактор X, фосфолипид, $CaCl_2$ и субстрат. 1× раствор Coatest получают с помощью добавления 9X объема холодной ddH_2O к 1X объему смеси. Среду для выращивания культур клеток затем добавляют для получения 1X раствора при заранее определенном отношении для нормализации процента матрицы во всех тестовых лунках. Фактор IXa + фактор X, фосфолипид и субстрат перерастворяют в соответствии с рекомендациями производителя.

Методика анализа Coatest.

Анализ вещества получают и держат на льду, пока не понадобится. 25 мкл разбавленных образцов для испытания и стандарты добавляют в 96-луночный планшет в двух экземплярах. 50 мкл фосфолипида/фактора IXa/фактора X добавляют к каждой лунке и смешивают, слегка нажав на сторону пластины. Планшеты инкубируют при 37°C в течение 5 мин на пластинчатом нагревателе 37°C. 25 мкл $CaCl_2$ добавляют к каждой лунка и смешивают. Планшеты инкубируют при 37°C в течение 5 мин в пластинчатом нагревателе. Затем к каждой лунке добавляют 50 мкл субстрата, смешивают, а планшеты инкубируют при 37°C в течение дополнительных 5-10 мин, пока верхнее значение стандарта при OD405 достигает показания около 1,5. Для остановки реакции к каждой лунке при перемешивании добавляют 25 мкл 20% уксусной кислоты, а лунки читают при OD405 с использованием спектрофотометра SpectraMAX® plus (Molecular Devices). Анализ данных осуществляют с использованием программы SoftMax (версия 5.2). LLOQ в анализе изменяется, но в целом составляет 0,0039 МЕ/мл.

Результаты. данные представлены в табл. 23-26. Табл. 23 представляет результаты для гибридных белков CFXTEN с XTEN, вводимым в уникальные сайты, подбираются на основании критериев, описанных в данном документе, в том числе в примере 34. Положительный контроль pBC00114 FVIII демонстрирует хорошую экспрессию и активность FVIII. Из проанализированных 106 гибридных белков с одним XTEN, 68% сохраняют измеряемую активность FVIII, с 30%, которые в анализе коагулирующей активности демонстрируют активность от 3+ до 4+. Тридцать один процент анализированных слитых белков имеют результаты ниже пределов количественного определения (которое может быть из-за плохой экспрессии, отраженной в соответствующих результатах экспрессии ELISA). Все четыре конструкции вставки в B-домен демонстрируют хорошую активность, так же как и конструкции, связанные с C-концом, указывают на то, что эти участки, вероятно, являются благоприятными инсерционными сайтами.

Результаты данных отдельного инсерционного сайта служат причиной создания конструкций XTEN с 2 вставками XTEN, результаты которых представлены в табл. 24. В целом, процент положительных результатов анализа составляет 67%, с 31% гибридных белков, которые в анализе коагулирующей активности демонстрируют активность от 3+ до 4+.

Результаты вышеприведенных данных служат причиной создания конструкций XTEN с 3 вставками XTEN, результаты которых представлены в табл. 25. В целом, 92% образцов имеют измеряемую активность FVIII, с полными 79%, которые в анализе коагулирующей активности демонстрируют активность от 3+ до 4+.

Ограниченное количество конструкций с 4 XTEN, вводимыми в домены A1, A2 и A3, создают и анализируют, с 4 из 5, демонстрирующими активность FVIII (табл. 26), предполагая, что вставка нескольких XTEN не ставит под угрозу способность получаемых гибридные белки сохранять активность FVIII.

Выводы: В условиях экспериментов результаты подтверждают, что критерии для выбора места вставки XTEN являются пригодными, что вставка одного или нескольких XTEN в выбранные сайты FVIII является более предпочтительной, чем для того, чтобы привести к сохранению прокоагулянтной активности получаемой молекулы CFXTEN, и что вставка трех XTEN, по-видимому, приводит к более высокой пропорции гибридных белков, сохраняя высокие уровни прокоагулянтной активности FVIII, по сравнению с конструкциями одинарных или двойных вставок XTEN.

Таблица 23
Результаты анализов активности при свертывании в случае CFXTEN, который содержит один XTEN

Инсерционный сайт	Домен	Конструкция	Активность	Экспрессия ELISA
pBC0114			+++	+++
3	A1	pBC0126	LLOQ*	LLOQ
3	A1	pBC0127	+	+
18	A1	pBC0165	++	++
22	A1	pBC0183	+++	++
26	A1	pBC0184	++	++
40	A1	pBC0166	++	++
60	A1	pBC0185	LLOQ	LLOQ
116	A1	pBC0167	LLOQ	LLOQ
130	A1	pBC0128	LLOQ	LLOQ
188	A1	pBC0168	++	++
216	A1	pBC0129	++	++
230	A1	pBC0169	LLOQ	LLOQ
333	A1	pBC0130	++	++
375	A2	pBC0131	LLOQ	+++
403	A2	pBC0132	++	++
442	A2	pBC0170	++	++
490	A2	pBC0133	+	++
518	A2	pBC0171	LLOQ	+
599	A2	pBC0134	++	++
713	A2	pBC0172	+	+++
745	B	pBC0135	+++	+++
745	B	pBC0149	+++	+++
745	B	pBC0136	++	++
745	B	pBC0137	+++	+++
1720	A3	pBC0138	+++	+++
1796	A3	pBC0139	+	++
1802	A3	pBC0140	+	++
1827	A3	pBC0173	LLOQ	LLOQ
1861	A3	pBC0174	LLOQ	LLOQ
1896	A3	pBC0175	LLOQ	LLOQ
1900	A3	pBC0176	+++	+++
1904	A3	pBC0177	+	+
1937	A3	pBC0178	LLOQ	LLOQ
2019	A3	pBC0141	LLOQ	+
2068	C1	pBC0179	++	++
2111	C1	pBC0180	LLOQ	LLOQ
2120	C1	pBC0142	LLOQ	+
2171	C2	pBC0143	++	+++
2188	C2	pBC0181	LLOQ	LLOQ
2227	C2	pBC0182	++	+++
2277	C2	pBC0144	++	++
2332	CT	pBC0145	+++	+++
2332	CT	pBC0146	+++	+++
403	A2	pSD0001	+++	+++
599	A2	pSD0002	+	+
403	A2	pSD0003	+++	+++
599	A2	pSD0004	+	+
745	B	pSD0005	+++	++
745	B	pSD0006	+++	+++
745	B	pSD0007	+++	++
745	B	pSD0008	+++	+++
1720	A3	pSD0009	+	+
1720	A3	pSD0010	++	++
2171	C2	pSD0011	+	++
2171	C2	pSD0012	+	++
2332	CT	pSD0013	+++	++
2332	CT	pSD0014	+++	+++
745	B	pSD0017	+++	+++

745	B	pSD0018	+++	+++
2332	CT	pSD0019	+++	+++
2332	CT	pSD0020	+++	+++
2332	CT	pSD0015	++	++
2332	CT	pSD0016	+++	+++
0	N-term	pSD0021	+	+
32	A1	pSD0022	+++	+++
65	A1	pSD0023	LLOQ	LLOQ
81	A1	pSD0024	LLOQ	LLOQ
119	A1	pSD0025	LLOQ	LLOQ
211	A1	pSD0026	+	+
220	A1	pSD0027	+	+
224	A1	pSD0028	+	+
336	A1	pSD0029	++	+++
339	A1	pSD0030	++	+++
378	A2	pSD0031	LLOQ	++
399	A2	pSD0032	++	++
409	A2	pSD0033	++	++
416	A2	pSD0034	+	+
487	A2	pSD0035	LLOQ	+
494	A2	pSD0036	LLOQ	+
500	A2	pSD0037	LLOQ	+
603	A2	pSD0038	+	+
1656	A3	pSD0039	+++	+++
1656	A3	pNL009**	++++	ND
1711	A3	pSD0040	++	+
1725	A3	pSD0041	LLOQ	++
1749	A3	pSD0042	LLOQ	LLOQ
1905	A3	pSD0043	++	++
1910	A3	pSD0044	+	+
1900	A3	pSD0062	++	++
1900	A3	pSD0063	+++	++
18	A1	pSD0045	+++	+++
18	A1	pSD0046	+++	+++
22	A1	pSD0047	LLOQ	LLOQ
22	A1	pSD0048	LLOQ	LLOQ
26	A1	pSD0049	+++	+++
26	A1	pSD0050	+++	+++
40	A1	pSD0051	+++	+++
40	A1	pSD0052	+++	+++
216	A1	pSD0053	LLOQ	LLOQ
216	A1	pSD0054	LLOQ	LLOQ
375	A2	pSD0055	LLOQ	+
442	A2	pSD0056	LLOQ	LLOQ
442	A2	pSD0057	LLOQ	LLOQ
1796	A3	pSD0058	LLOQ	LLOQ
1796	A3	pSD0059	+	+
1802	A3	pSD0060	+	+
1802	A3	pSD0061	LLOQ	LLOQ

* LLOQ: ниже пределов количественного определения.

** pNL009 содержит делецию 745-1656.

Таблица 24

Результаты анализов активности при свертывании в случае CFXTEN, который содержит два XTEN

Вставка 1		Вставка 2			
Инсерционный сайт	Домен	Инсерционный сайт	Домен	Конструкция	Активность
745	B	2332	CT	LSD0001.002	+++
745	B	2332	CT	LSD0001.005	+++
745	B	2332	CT	LSD0001.006	+++
745	B	2332	CT	LSD0001.011	+++
745	B	2332	CT	LSD0001.012	+++
745	B	2332	CT	LSD0001.013	+++
745	B	2332	CT	LSD0001.016	+++
745	B	2332	CT	LSD0001.021	+++
745	B	2332	CT	LSD0002.001	+++
745	B	2332	CT	LSD0002.002	+++
745	B	2332	CT	LSD0002.014	+++
745	B	2332	CT	LSD0003.004	+++
745	B	2332	CT	LSD0003.006	+++
745	B	2332	CT	LSD0003.009	+++
745	B	2332	CT	LSD0003.014	+
745	B	2332	CT	LSD0004.010	+++
745	B	2332	CT	LSD0004.011	LLOQ
745	B	2332	CT	LSD0004.014	+++
745	B	2332	CT	LSD0004.016	+++
745	B	2332	CT	LSD0004.022	+++
745	B	2332	CT	LSD0003.016	+++
0745	B	2332	CT	pNL006	+++
0745	B	2332	CT	pNL007	+++
0745	B	2332	CT	pNL008	++
1656	a3	2332	CT	pNL010	+++
26	A1	403	A2	LSD0005.002	++
26	A1	403	A2	LSD0005.004	++
40	A1	403	A2	LSD0005.005	++
40	A1	403	A2	LSD0005.011	++
18	A1	403	A2	LSD0005.018	++
26	A1	599	A2	LSD0006.002	+
40	A1	599	A2	LSD0006.005	++
40	A1	599	A2	LSD0006.007	++
40	A1	599	A2	LSD0006.011	+++
40	A1	403	A2	LSD0007.002	+
40	A1	403	A2	LSD0007.004	+

26	A1	403	A2	LSD0007.013	++
26	A1	599	A2	LSD0008.001	++
40	A1	599	A2	LSD0008.002	++
26	A1	599	A2	LSD0008.006	+
18	A1	599	A2	LSD0008.009	++
40	A1	599	A2	LSD0008.017	+
745	B	2332	CT	LSD0002.025	+++
745	B	2332	CT	LSD0002.013	+++
745	B	2332	CT	LSD0003.025	+++
745	B	2332	CT	LSD0004.025	+++
745	B	2332	CT	LSD0003.005	++
26	A1	403	A2	LSD0007.008	++
1720	A3	1900	A3	LSD0044.002	LLOQ
1725	A3	1900	A3	LSD0044.005	LLOQ
1720	A3	1900	A3	LSD0044.039	LLOQ
1711	A3	1905	A3	LSD0044.022	LLOQ
1720	A3	1905	A3	LSD0044.003	LLOQ
1725	A3	1905	A3	LSD0044.001	LLOQ
1656	A3	26	A1	LSD0038.001	++
1656	A3	18	A1	LSD0038.003	++
1656	A3	18	A1	LSD0038.008	+++
1656	A3	40	A1	LSD0038.012	++
1656	A3	40	A1	LSD0038.013	++
1656	A3	26	A1	LSD0038.015	++
1656	A3	399	A2	LSD0039.001	+
1656	A3	403	A2	LSD0039.003	++
1656	A3	403	A2	LSD0039.010	++
1656	A3	1725	A3	LSD0045.001	+
1656	A3	1720	A3	LSD0045.002	++
1900	A3	18	A1	LSD0042.014	+
1900	A3	18	A1	LSD0042.023	+
1900	A3	26	A1	LSD0042.006	+
1900	A3	26	A1	LSD0042.013	++
1900	A3	40	A1	LSD0042.001	+
1900	A3	40	A1	LSD0042.039	+
1900	A3	26	A1	LSD0042.047	+
1905	A3	18	A1	LSD0042.003	+
1905	A3	40	A1	LSD0042.004	LLOQ
1905	A3	26	A1	LSD0042.008	LLOQ
1905	A3	26	A1	LSD0042.038	LLOQ
1905	A3	40	A1	LSD0042.082	LLOQ
1910	A3	26	A1	LSD0042.040	LLOQ
18	A1	399	A2	LSD0037.002	++
26	A1	399	A2	LSD0037.009	+
40	A1	399	A2	LSD0037.011	++
18	A1	403	A2	LSD0047.002	++
18	A1	403	A2	LSD0047.005	+

18	A1	403	A2	LSD0048.007	+
1656	A3	1900	A3	LSD0046.001	++
1656	A3	1900	A3	LSD0046.002	+
1656	A3	1905	A3	LSD0046.003	+
1711	A3	40	A1	LSD0040.011	LLOQ
1711	A3	26	A1	LSD0040.042	LLOQ
1720	A3	26	A1	LSD0040.002	+
1720	A3	40	A1	LSD0040.008	+
1720	A3	18	A1	LSD0040.021	+
1720	A3	26	A1	LSD0040.037	LLOQ
1720	A3	18	A1	LSD0040.046	+
1725	A3	26	A1	LSD0040.003	LLOQ
1725	A3	40	A1	LSD0040.006	LLOQ
1725	A3	26	A1	LSD0040.007	LLOQ
1725	A3	18	A1	LSD0040.010	LLOQ
1725	A3	40	A1	LSD0040.039	LLOQ
1725	A3	18	A1	LSD0040.052	+
1720	A3	403	A2	LSD0041.001	+
1720	A3	399	A2	LSD0041.004	LLOQ
1711	A3	403	A2	LSD0041.006	LLOQ
1720	A3	403	A2	LSD0041.008	LLOQ
1725	A3	403	A2	LSD0041.010	LLOQ
1725	A3	403	A2	LSD0041.014	LLOQ
1725	A3	399	A2	LSD0041.016	LLOQ
1711	A3	403	A2	LSD0041.035	LLOQ
1900	A3	399	A2	LSD0043.001	LLOQ
1900	A3	403	A2	LSD0043.002	LLOQ
1905	A3	403	A2	LSD0043.005	LLOQ
1900	A3	399	A2	LSD0043.006	LLOQ
1900	A3	403	A2	LSD0043.007	LLOQ
1900	A3	403	A2	LSD0043.008	LLOQ
1905	A3	399	A2	LSD0043.015	LLOQ
1905	A3	403	A2	LSD0043.029	LLOQ
1910	A3	403	A2	LSD0043.043	LLOQ

Таблица 25
Результаты анализов активности при свертывании в случае CFXTEN, который содержит три XTEN

Вставка 1		Вставка 2		Вставка 3			
Инсерционный сайт	Домен	Инсерционный сайт	Домен	Инсерционный сайт	Домен	Конструкция	Активность
26	A1	403	A2	1656	A3	pSD0077	+++
26	A1	403	A2	1720	A3	pSD0078	++
26	A1	403	A2	1900	A3	pSD0079	++
26	A1	1656	A3	1720	A3	pSD0080	+++
26	A1	1656	A3	1900	A3	pSD0081	LLOQ
26	A1	1720	A3	1900	A3	pSD0082	+
403	A2	1656	A3	1720	A3	pSD0083	+++
403	A2	1656	A3	1900	A3	pSD0084	+++
403	A2	1720	A3	1900	A3	pSD0085	+
1656	A3	1720	A3	1900	A3	pSD0086	+++
18	A1	745	B	2332	CT	LSD0049.002	+++
26	A1	745	B	2332	CT	LSD0049.008	+++
26	A1	745	B	2332	CT	LSD0049.011	+++
40	A1	745	B	2332	CT	LSD0049.012	+++
40	A1	745	B	2332	CT	LSD0049.020	+++
18	A1	745	B	2332	CT	LSD0049.021	+++
40	A1	745	B	2332	CT	LSD0050.002	+++
18	A1	745	B	2332	CT	LSD0050.003	+++
26	A1	745	B	2332	CT	LSD0050.007	LLOQ
18	A1	745	B	2332	CT	LSD0050.010	+++
26	A1	745	B	2332	CT	LSD0050.012	+++
40	A1	745	B	2332	CT	LSD0050.014	+++
403	A2	745	B	2332	CT	LSD0051.002	+++
399	A2	745	B	2332	CT	LSD0051.003	+++
403	A2	745	B	2332	CT	LSD0052.001	+++
399	A2	745	B	2332	CT	LSD0052.003	+++
1725	A3	745	B	2332	CT	LSD0053.021	LLOQ
1720	A3	745	B	2332	CT	LSD0053.022	+++
1711	A3	745	B	2332	CT	LSD0053.024	+++
1720	A3	745	B	2332	CT	LSD0054.021	+++
1711	A3	745	B	2332	CT	LSD0054.025	++
1725	A3	745	B	2332	CT	LSD0054.026	+++

1900	A3	745	B	2332	CT	LSD0055.021	+++
1905	A3	745	B	2332	CT	LSD0055.022	+++
1900	A3	745	B	2332	CT	LSD0055.026	+++
1900	A3	745	B	2332	CT	LSD0056.021	+++
1900	A3	745	B	2332	CT	LSD0056.024	+++
1910	A3	745	B	2332	CT	LSD0056.025	+++
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0294*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0295*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0296*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0297*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0298*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0299*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0300*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0301*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0302*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0303*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0304*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0305*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0306*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0307*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0308*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0309*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0310*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0311*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0312*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0313*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0314*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0315*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0316*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0317*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0318*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0319*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0320*	
0018	A1	0745	B	2332	CT	pBC0269*	
0403	A2	0745	B	2332	CT	pBC0270*	
1720	A3	0745	B	2332	CT	pBC0271*	
1900	A3	0745	B	2332	CT	pBC0272*	
0403	A2	0745	B	2332	CT	pBC0273*	
1720	A3	0745	B	2332	CT	pBC0274*	
1900	A3	0745	B	2332	CT	pBC0275*	
0018	A1	0745	B	2332	CT	pBC0276*	
0403	A2	0745	B	2332	CT	pBC0277*	
1720	A3	0745	B	2332	CT	pBC0278*	
1900	A3	0745	B	2332	CT	pBC0279*	

* Конструкция с мутацией R1648A.

Таблица 26
Результаты анализов активности при свертывании в случае CFXTEN, который содержит четыре XTEN

XTEN Вставка 1	XTEN Вставка 2	XTEN Вставка 3	XTEN Вставка 4	XTEN Вставка 5	XTEN Вставка 6	Конструкция ID	Активность
26	403	1656	1720	-	-	pSD0087	+++
26	403	1656	1900	-	-	pSD0088	+++
26	403	1720	1900	-	-	pSD0089	LLOQ
26	1656	1720	1900	-	-	pSD0090	++
403	1656	1720	1900	-	-	pSD0091	++
0040	0403	745	2332	-	-	LSD0058.006*	++
0018	0409	745	2332	-	-	LSD0059.002*	+
0040	0409	745	2332	-	-	LSD0059.006*	+
0040	0409	745	2332	-	-	LSD0060.001*	+
0018	0409	745	2332	-	-	LSD0060.003*	+
0040	1720	745	2332	-	-	LSD0061.002*	+
0026	1720	745	2332	-	-	LSD0061.007*	++
0018	1720	745	2332	-	-	LSD0061.008*	++
0018	1720	745	2332	-	-	LSD0061.012*	++
0018	1720	745	2332	-	-	LSD0062.001*	++
0026	1720	745	2332	-	-	LSD0062.002*	++
0018	1720	745	2332	-	-	LSD0062.006*	++
0018	1900	745	2332	-	-	LSD0063.001*	++
0018	1900	745	2332	-	-	LSD0064.017*	++
0026	1900	745	2332	-	-	LSD0064.020*	++
0040	1900	745	2332	-	-	LSD0064.021*	++
0040	1905	745	2332	-	-	LSD0065.001*	+
0018	1905	745	2332	-	-	LSD0065.014*	+
0040	1905	745	2332	-	-	LSD0066.001*	+
0026	1905	745	2332	-	-	LSD0066.002*	+
0018	1905	745	2332	-	-	LSD0066.009*	++
0018	1905	745	2332	-	-	LSD0066.011*	++
0018	1910	745	2332	-	-	LSD0067.004*	++
0018	1910	745	2332	-	-	LSD0067.005*	+
0040	1910	745	2332	-	-	LSD0067.006*	+
0026	1910	745	2332	-	-	LSD0067.008*	+
0018	1910	745	2332	-	-	LSD0068.001*	+
0026	1910	745	2332	-	-	LSD0068.002*	+

0040	1910	745	2332	-	-	LSD0068.005*	+
0018	1910	745	2332	-	-	LSD0068.010*	++
0409	1720	745	2332	-	-	LSD0069.004*	+
0403	1720	745	2332	-	-	LSD0069.008*	+
0409	1720	745	2332	-	-	LSD0070.003*	+
0403	1720	745	2332	-	-	LSD0070.004*	++
0403	1720	745	2332	-	-	LSD0070.005*	++
0403	1900	745	2332	-	-	LSD0071.001*	++
0403	1900	745	2332	-	-	LSD0071.002*	+
0409	1900	745	2332	-	-	LSD0071.008*	++
0403	1900	745	2332	-	-	LSD0072.001*	++
0403	1900	745	2332	-	-	LSD0072.002*	+
0409	1900	745	2332	-	-	LSD0072.003*	+
0409	1905	745	2332	-	-	LSD0073.002*	+
0403	1905	745	2332	-	-	LSD0073.004*	+
0403	1905	745	2332	-	-	LSD0073.006*	+
0403	1905	745	2332	-	-	LSD0074.007*	++
0409	1905	745	2332	-	-	LSD0074.010*	+
0403	1905	745	2332	-	-	LSD0074.011*	+
0409	1910	745	2332	-	-	LSD0075.004*	+
0403	1910	745	2332	-	-	LSD0075.007*	+
0403	1910	745	2332	-	-	LSD0076.002*	+
0403	1910	745	2332	-	-	LSD0076.003*	+
0403	1910	745	2332	-	-	pSD0093*	+
1720	1900	745	2332	-	-	pSD0094*	++
1720	1905	745	2332	-	-	pSD0095*	+
1720	1910	745	2332	-	-	pSD0097*	+
1720	1910	745	2332	-	-	pSD0098*	+
0403	1656	1720	2332	-	-	pNL0022	+
0403	1656	1900	2332	-	-	pNL0023	+
0403	1720	1900	2332	-	-	pNL0024	LLOQ
1656	1720	1900	2332	-	-	pNL0025	+
0018	0403	1656	2332	-	-	pBC0247	++
0018	0403	1720	2332	-	-	pBC0248	+
0018	0403	1900	2332	-	-	pBC0249	+
0018	1656	1720	2332	-	-	pBC0250	+
0018	1656	1900	2332	-	-	pBC0251	++
0018	1720	1900	2332	-	-	pBC0252	LLOQ
0018	0403	0745	2332	-	-	LSD57.005	++
0018	0745	1720	2332	-	-	LSD62.001	++

0018	0745	1900	2332	-	-	pBC0262	++
0403	0745	1720	2332	-	-	LSD70.004	+
0403	0745	1900	2332	-	-	pBC0266	+
0745	1720	1900	2332	-	-	pBC0268	+
0188	1900	0745	2332	-	-	pCS0001*	ND
0599	1900	0745	2332	-	-	pCS0002*	ND
2068	1900	0745	2332	-	-	pCS0003*	ND
2171	1900	0745	2332	-	-	pCS0004*	ND
2227	1900	0745	2332	-	-	pCS0005*	ND
2277	1900	0745	2332	-	-	pCS0006*	ND
0403	1656	1720	1900	2332	-	pNL0030	LLOQ
0018	0403	1656	1720	2332	-	pBC0253	+
0018	0403	1656	1900	2332	-	pBC0254	+
0018	0403	1720	1900	2332	-	pBC0255	LLOQ
0018	1656	1720	1900	2332	-	pBC0256	+
0018	0403	0745	1720	2332	-	pBC0259*	+
0018	0403	0745	1900	2332	-	pBC0260*	+
0018	0745	1720	1900	2332	-	pBC0263	+
0403	0745	1720	1900	2332	-	pBC0267	LLOQ
0018	0403	1656	1720	1900	2332	pBC0257	LLOQ
0018	0403	0745	1720	1900	2332	pBC0264	LLOQ

* Конструкция с мутацией R1648A.

Пример 26. Определение радиусов XTEN и соответствующих параметров.

Для того, чтобы количественно определить гидродинамические радиусы компонентов XTEN гибридных белков CFXTEN и как изменяется величина нескольких XTEN, в зависимости от уникального XTEN, создают ряд формул, основываясь на эмпирически-полученных данных из анализов гель-проникающей хроматографии различных гибридных белков, которые содержат один или несколько XTEN. Считается, что включение нескольких XTEN в CFXTEN обеспечивает больший общий гидродинамический радиус компонента XTEN, по сравнению с CFXTEN с меньшим XTEN, который имеет приблизительно такой же общее количество аминокислот XTEN. Максимальный радиус отдельного полипептида XTEN рассчитывают (в дальнейшем "радиус XTEN") в соответствии с формулой, приведенной в уравнении II:

$$\text{Радиус XTEN} = (\sqrt{\text{длина XTEN}}\ 0{,}2037) + 3{,}4627 \qquad \text{II}$$

Сумма максимальных радиусов XTEN всех сегментов XTEN в CFXTEN рассчитывают (в дальнейшем "Сумма радиусов XTEN") в соответствии с формулой, приведенной в уравнении III:

$$\text{Сумма радиусов XTEN} = \sum_{i=1}^{n} \text{Радиус}_i\ \text{XTEN} \qquad \text{III}$$

где n = количество сегментов XTEN и

i представляет собой итератор.

Отношение суммы радиусов XTEN CFXTEN, который содержит несколько XTEN, для которых рассчитывают радиус XTEN в случае уникального XTEN эквивалентной длины (в общем с CFXTEN количестве аминокислотных остатков) (в дальнейшем, "Отношение радиусов XTEN") в соответствии с формулой, приведенной в уравнении IV:

$$\text{Отношение радиусов XTEN} = \frac{\sum_{i=1}^{n} \text{Радиус}_i\ \text{XTEN}}{\left(\sqrt{\sum_{i=1}^{n} \text{Длина}_i\ \text{XTEN}} * 0.2037\right) + 3.4627} \qquad \text{IV}$$

где n = количество сегментов XTEN и

i представляет собой итератор.

Результаты. Уравнение II применяют к XTEN с длинами 144, 288, 576 и 864. Результаты представлены в табл. 27. Уравнение IV применяют к различным гибридным белкам CFXTEN, описанным в данном документе, с двумя, тремя или четырьмя XTEN. Отношение радиусов XTEN имеет величину 1 для всех CFXTEN, которые содержат уникальный XTEN. Отношение радиусов XTEN представлено в табл. 28. Отношение радиусов XTEN в случае pSD0092, который содержит 5 вставок XTEN, имеет величину 3,31. В совокупности, результаты указывают на то, что включение нескольких XTEN увеличивает отношение радиусов XTEN до значений выше 2, в случае четырех вставок это приводит к большим значениям, чем в случае трех вставок.

Таблица 27

Результаты расчетов радиусов в случае CFXTEN, который содержит XTEN

Длина XEN	Радиус XTEN
42	4,8
144	5,9
288	6,9
576	8,4
864	9,5

Таблица 28

Результаты расчетов радиусов в случае CFXTEN, который содержит XTEN

Вставка 1		Вставка 2		Вставка 3		Вставка 4			
Сайт вставки	Домен	Сайт вставки	Домен	Сайт вставки	Домен	Сайт вставки	Домен	Конструкция	Отношение радиусов XTEN
40	A1							pBC0166	1,00
745	B	2332	CT					LSD0001.002	1,67
745	B	2332	CT					LSD0001.005	1,71
745	B	2332	CT					LSD0001.006	1,71
745	B	2332	CT					LSD0001.011	1,71
745	B	2332	CT					LSD0001.012	1,71
745	B	2332	CT					LSD0001.013	1,67
745	B	2332	CT					LSD0001.016	1,67
745	B	2332	CT					LSD0001.021	1,67
745	B	2332	CT					LSD0002.001	1,67
745	B	2332	CT					LSD0002.002	1,67
745	B	2332	CT					LSD0002.004	1,71
745	B	2332	CT					LSD0002.008	1,67
745	B	2332	CT					LSD0002.014	1,67
745	B	2332	CT					LSD0003.001	1,67
745	B	2332	CT					LSD0003.004	1,66
745	B	2332	CT					LSD0003.006	1,67
745	B	2332	CT					LSD0003.009	1,67
745	B	2332	CT					LSD0003.014	1,66
745	B	2332	CT					LSD0003.018	1,67
745	B	2332	CT					LSD0004.010	1,66
745	B	2332	CT					LSD0004.011	1,67
745	B	2332	CT					LSD0004.014	1,66
745	B	2332	CT					LSD0004.016	1,66
745	B	2332	CT					LSD0004.022	1,66
745	B	2332	CT					LSD0003.016	1,67
26	A1	403	A2					LSD0005.002	1,71
26	A1	403	A2					LSD0005.004	1,71
40	A1	403	A2					LSD0005.005	1,71
40	A1	403	A2					LSD0005.011	1,71
18	A1	403	A2					LSD0005.018	1,71
26	A1	599	A2					LSD0006.002	1,71
40	A1	599	A2					LSD0006.005	1,71
40	A1	599	A2					LSD0006.007	1,71
40	A1	599	A2					LSD0006.011	1,71
40	A1	403	A2					LSD0007.002	1,71
40	A1	403	A2					LSD0007.004	1,71
26	A1	403	A2					LSD0007.013	1,71
26	A1	599	A2					LSD0008.001	1,71
40	A1	599	A2					LSD0008.002	1,71
26	A1	599	A2					LSD0008.006	1,71
18	A1	599	A2					LSD0008.009	1,71
40	A1	599	A2					LSD0008.017	1,71

745	B	2332	CT					LSD0002.025	1,71
745	B	2332	CT					LSD0002.013	1,67
745	B	2332	CT					LSD0003.025	1,67
745	B	2332	CT					LSD0004.025	1,67
745	B	2332	CT					LSD0003.005	1,66
26	A1	403	A2					LSD0007.008	1,71
1720	A3	1900	A3					LSD0044.002	1,71
1725	A3	1900	A3					LSD0044.005	1,71
1720	A3	1900	A3					LSD0044.039	1,71
1711	A3	1905	A3					LSD0044.022	1,71
1720	A3	1905	A3					LSD0044.003	1,71
1725	A3	1905	A3					LSD0044.001	1,71
1656	A3	26	A1					LSD0038.001	1,71
1656	A3	18	A1					LSD0038.003	1,71
1656	A3	18	A1					LSD0038.008	1,71
1656	A3	40	A1					LSD0038.012	1,71
1656	A3	40	A1					LSD0038.013	1,71
1656	A3	26	A1					LSD0038.015	1,71
1656	A3	399	A2					LSD0039.001	1,71
1656	A3	403	A2					LSD0039.003	1,71
1656	A3	403	A2					LSD0039.010	1,71
1656	A3	1725	A3					LSD0045.001	1,71
1656	A3	1720	A3					LSD0045.002	1,71
1900	A3	18	A1					LSD0042.014	1,71
1900	A3	18	A1					LSD0042.023	1,71
1900	A3	26	A1					LSD0042.006	1,71
1900	A3	26	A1					LSD0042.013	1,71
1900	A3	40	A1					LSD0042.001	1,71
1900	A3	40	A1					LSD0042.039	1,71
1900	A3	26	A1					LSD0042.047	1,71
1905	A3	18	A1					LSD0042.003	1,71
1905	A3	40	A1					LSD0042.004	1,71
1905	A3	26	A1					LSD0042.008	1,71
1905	A3	26	A1					LSD0042.038	1,71
1905	A3	40	A1					LSD0042.082	1,71
1910	A3	26	A1					LSD0042.040	1,71
18	A1	399	A2					LSD0037.002	1,71
26	A1	399	A2					LSD0037.009	1,71
40	A1	399	A2					LSD0037.011	1,71
18	A1	403	A2					LSD0047.002	1,71
18	A1	403	A2					LSD0047.005	1,71
18	A1	403	A2					LSD0048.007	1,71
1656	A3	1900	A3					LSD0046.001	1,71
1656	A3	1900	A3					LSD0046.002	1,71
1656	A3	1905	A3					LSD0046.003	1,71

1711	A3	40	A1					LSD0040.011	1,71
1711	A3	26	A1					LSD0040.042	1,71
1720	A3	26	A1					LSD0040.002	1,71
1720	A3	40	A1					LSD0040.008	1,71
1720	A3	18	A1					LSD0040.021	1,71
1720	A3	26	A1					LSD0040.037	1,71
1720	A3	18	A1					LSD0040.046	1,71
1725	A3	26	A1					LSD0040.003	1,71
1725	A3	40	A1					LSD0040.006	1,71
1725	A3	26	A1					LSD0040.007	1,71
1725	A3	18	A1					LSD0040.010	1,71
1725	A3	40	A1					LSD0040.039	1,71
1725	A3	18	A1					LSD0040.052	1,71
1720	A3	403	A2					LSD0041.001	1,71
1720	A3	399	A2					LSD0041.004	1,71
1711	A3	403	A2					LSD0041.006	1,71
1720	A3	403	A2					LSD0041.008	1,71
1725	A3	403	A2					LSD0041.010	1,71
1725	A3	403	A2					LSD0041.014	1,71
1725	A3	399	A2					LSD0041.016	1,71
1711	A3	403	A2					LSD0041.035	1,71
1900	A3	399	A2					LSD0043.001	1,71
1900	A3	403	A2					LSD0043.002	1,71
1905	A3	403	A2					LSD0043.005	1,71
1900	A3	399	A2					LSD0043.006	1,71
1900	A3	403	A2					LSD0043.007	1,71
1900	A3	403	A2					LSD0043.008	1,71
1905	A3	399	A2					LSD0043.015	1,71
1905	A3	403	A2					LSD0043.029	1,71
1910	A3	403	A2					LSD0043.043	1,71
26	A1	403	A2	1656	A3			pSD0077	2,30
26	A1	403	A2	1720	A3			pSD0078	2,30
26	A1	403	A2	1900	A3			pSD0079	2,30
26	A1	1656	A3	1720	A3			pSD0080	2,30
26	A1	1656	A3	1900	A3			pSD0081	2,30
26	A1	1720	A3	1900	A3			pSD0082	2,30
403	A2	1656	A3	1720	A3			pSD0083	2,30
403	A2	1656	A3	1900	A3			pSD0084	2,30
403	A2	1720	A3	1900	A3			pSD0085	2,30
1656	A3	1720	A3	1900	A3			pSD0086	2,30
26	A1	403	A2	1656	A3	1720	A3	pSD0087	2,83
26	A1	403	A2	1656	A3	1900	A3	pSD0088	2,83
26	A1	403	A2	1720	A3	1900	A3	pSD0089	2,83
26	A1	1656	A3	1720	A3	1900	A3	pSD0090	2,83
403	A2	1656	A3	1720	A3	1900	A3	pSD0091	2,83

26	A1	403	A2	1656	A3	1720	A3	pSD0092	2,83
18	A1	745	B	2332	CT			LSD0049.002	2,24
26	A1	745	B	2332	CT			LSD0049.008	2,24
26	A1	745	B	2332	CT			LSD0049.011	2,24
40	A1	745	B	2332	CT			LSD0049.012	2,24
40	A1	745	B	2332	CT			LSD0049.020	2,24
18	A1	745	B	2332	CT			LSD0049.021	2,24
40	A1	745	B	2332	CT			LSD0050.002	2,24
18	A1	745	B	2332	CT			LSD0050.003	2,24
26	A1	745	B	2332	CT			LSD0050.007	2,24
18	A1	745	B	2332	CT			LSD0050.010	2,24
26	A1	745	B	2332	CT			LSD0050.012	2,24
40	A1	745	B	2332	CT			LSD0050.014	2,24
403	A2	745	B	2332	CT			LSD0051.002	2,24
399	A2	745	B	2332	CT			LSD0051.003	2,24
403	A2	745	B	2332	CT			LSD0052.001	2,24
399	A2	745	B	2332	CT			LSD0052.003	2,24
1725	A3	745	B	2332	CT			LSD0053.021	2,24
1720	A3	745	B	2332	CT			LSD0053.022	2,24
1711	A3	745	B	2332	CT			LSD0053.024	2,24
1720	A3	745	B	2332	CT			LSD0054.021	2,24
1711	A3	745	B	2332	CT			LSD0054.025	2,24
1725	A3	745	B	2332	CT			LSD0054.026	2,24
1900	A3	745	B	2332	CT			LSD0055.021	2,24
1905	A3	745	B	2332	CT			LSD0055.022	2,24
1900	A3	745	B	2332	CT			LSD0055.026	2,24
1900	A3	745	B	2332	CT			LSD0056.021	2,24
1900	A3	745	B	2332	CT			LSD0056.024	2,24
1910	A3	745	B	2332	CT			LSD0056.025	2,24

Пример 27. Связывание нарушения FVIII-XTEN с анти-FVIII антителом.

Способность XTEN, вводимого в различных локализациях гибридных белков CFXTEN, влиять на связывание анти-FVIII антител определяют с помощью сендвич анализов ELISA. Два анти-FVIII антитела; напр. GMA-8021 (Green Mountain Antibodies, Burlington, VT) и ESH8 (American Diagnostica Inc., Stamford, CT), которые связываются с доменами A2 и C2, соответственно, используют в качестве иммобилизованных антител. Несодержащий XTEN протеин FVIII-His-Myc используют в качестве калибровочного стандарта и положительного контроля для всех ELISA. Создают десять гибридных белков CFXTEN с одиночными вставками XTEN в либо A1, A2, либо домене A3, которые дополнительно содержат аффинные метки His и Myc. Концентрации протеина каждого образца для испытаний нормализуют к 100%, основываясь на использовании детектирования ELISA анти-His- иммобилизованного анти-Myc одновременно на таком же планшете, как ELISA, для детектирования анти-FVIII антитела- иммобилизованного анти-Myc.

Если коротко, соответствующие лунки в 96-луночном планшете покрывают GMA-8021, ESH8 или анти-His антителом в течение ночи при 4°C, затем промывают и блокируют BSA. Эквивалентные объемы соответствующего контроля или гибридных белков вводят в одинаковые лунки и позволяют взаимодействовать с нанесенным GMA-8021, ESH8 или анти-His антителом в течение 2 ч при комнатной температуре. После инкубирования, несвязанный материал вымывают и добавляют анти-Myc идентифицирующее антитело кролика и инкубируют в течение дополнительного 1 ч при комнатной температуре. Планшет затем промывают, вводят конъюгированное с пероксидазой антикроличье вторичное антитело осла и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет снова промывают, с последующим добавлением субстрата TMB и дают реакции возможность протекать в течение 5-20 мин. Для остановки реакции вводят H_2SO_4 и поглощение читают с помощью спектрофотометра при 450 нм.

Результаты. Результаты представлены в табл. 29. В совокупности эти результаты показывают, что два антитела против слитых белков CFXTEN с XTEN, вводимых в домен A2, демонстрируют сниженное связывание FVIII, по сравнению с CFXTEN с XTEN, вводимым в A1 или домен A3, если анти-FVIII иммобилизованное антитело представляет собой GMA-8021 (с аффинностью связывания к домену A2). В противоположность этому не было никакого заметного ингибирования или повышения связывания с помощью любого CFXTEN, когда анти-FVIII иммобилизованное антитело представляет собой ESH8, с аффинностью связывания к домену C2.

Таблица 29
Связывание нарушения FVIII-XTEN с анти-FVIII антителом

Проверяемый образец	Вставка XTEN (домен, сайт, XTEN)	Концентрация на aFVIII/Myc ÷ концентрация на aHis/Myc		
		His/Myc	GMA-8021/Myc (домен A2)	ESH8/Myc (домен C2)
FVIII-His-Myc	None	100%	92%	104%
FVIII-XTEN-His-Myc	A2, 403, AE144	100%	103% ± 1%	141% ± 24%
	A2, 403, AG144	100%	104% ± 6%	129% ± 12%
	A2, 399, AE144	100%	100% ± 8%	140% ± 18%
	A3, 1656, AG144	100%	153%	158%
	A1, 18, AE144	100%	129%	130%
	A1, 18, AG144	100%	150%	131%
	A1, 26, AE144	100%	155%	87%
	A1, 26, AG144	100%	157%	147%
	A1, 40, AE144	100%	137%	147%
	A1, 40, AG144	100%	164% ± 0%	153% ± 18%

aFVIII/Myc = заболевание с GMA-8021/Myc или ESH8/Myc антитела; aHis/Myc = заболевание анти-His/Myc антитела.

Пример 28. Анализ активности гибридных белков CFXTEN в присутствии ингибиторов FVIII.

Способ тестирования ингибитора титрованием.

Выбранные антитела, ингибирующие прокоагулянтную активность FVIII приобретают из коммерческих источников. Антитела нацеливаются на выбранные домены FVIII (например, A2, A3, C1, C2) и ингибируют FVIII-зависимую прокоагулянтную активность. Для того, чтобы установить оптимальную концентрацию ингибиторов FVIII для использования в анализе, первоначальный эксперимент титрования осуществляют с использованием различных количеств каждого ингибирующего антитела, инкубированного при 37°C в течение 2 ч с основным вектором экспрессирования FVIII дикого типа с двойной меткой His/Myc, и второй образец с антителом и по меньшей мере одним гибридным белком CFXTEN. Образцы затем используют в анализе коагулирующей активности для определения активности FVIII. Активность измеряют с помощью методики количественного анализа Coatest, описанного в данном документе. Концентрацию, которая приводит к оптимальному ингибированию активности FVIII, определяют для каждого антитела индивидуально.

Способ тестирования ингибитора.

Антитела ингибитора FVIII затем используют в их оптимальной концентрации для анализа образцов для испытания. CFXTEN и образцы положительного контроля индивидуально инкубируют с каждым антителом при 37°C в течение 2 ч, образцы затем собирают и используют в анализе активности Coatest, наряду с необработанными аликвотами CFXTEN и положительным контролем. В отдельных случаях, конструкции CFXTEN с мутацией R1648A проверяют для определения влияния этой мутации, если таковая имеется, на устойчивость к ингибиторам, как измерено с помощью сохранения активности FVIII.

Результаты.

Результаты эксперимента титрования проиллюстрированы на фиг. 26. Данные указывают на сдвиг вправо на порядок величин приблизительно 0,7 в количестве антитела, необходимого для ингибирования прокоагулянтной активности LSD0049.002 CFXTEN до уровня 50%, по сравнению с положительным контролем FVIII, указывающим на то, что CFXTEN с тремя вставками XTEN (в точках вставки, соответствующих аминокислотному остатку BDD-FVIII 18, 745 и 2332) имеет более низкое связывание с антителом, по сравнению с FVIII, отраженное в сохранении активности свертывания.

Результаты анализов Coatest представлены в табл. 30 и 31, в случае антител ингибитора FVIII GMA8008 и GMA8021 соответственно. Все необработанные проверенные конструкции гибридного белка CFXTEN демонстрируют прокоагулянтную активность, как и положительный контроль pBC00114 FVIII. Образец положительного контроля предварительно инкубируют с антителами ингибитора FVIII, что приводит к резкому снижению измеряемой активности свертывания до 0,05-0,15 (5-15%), по отношению к необработанному образцу, как и большая часть конструкций CFXTEN, обработанных антителом GMA8008 к домену C2. Несмотря на это, три гибридных белка CFXTEN сохраняют по меньшей мере удвоенную относительную оставшуюся активность, по сравнению с контролем FVIII; LSD0049.020, LSD0053.024 и LSD0056,025, каждый с тремя вставками XTEN.

Образцы CFXTEN демонстрируют более низкую степень ингибирования антителом GMA8021 к домену A2, по сравнению с необработанными образцами, которая была дополнительно снижена с помощью дополнительного количества вставок XTEN (табличные данные представлены в табл. 30). Фиг. 29 иллюстрирует график средних значений отношения для контроля за сохраненной активностью, который демонстрирует линейную зависимость между количеством вводимых XTEN и сниженным ингибированием с антителом GMA8021 по отношению к ингибированием контроля FVIII. Аналогичным образом,

значения + С.О. по отношению к значениям контроля составляет 2,26+0,12 в случае 1 XTEN, 3,48+0,26 в случае 2 XTEN и 5,70+0,29 в случае 3 вставок XTEN. CFTXEN с по меньшей мере тремя вставками XTEN, обработанными антителом GMA8021 имеет по меньшей мере в от 4,5 до 9,2 раза более высокое сохранение активности FVIII, по сравнению с контролем FVIII. Кроме того, в тех CFXTEN с тремя вставками XTEN, конструкции с более высокой степенью разделения (количество аминокислотных остатков) между любыми двумя вставками приводит к более высокой степени прокоагулянтной активности и, следовательно, меньшему связыванию антителом ингибитора FVIII, по сравнению со вставками, сгруппированными более плотно; например, на С-концевых сторонах В-домена. Результаты анализа конструкций с мутацией R1648A оказались сопоставимыми с теми, которые без мутаций.

Выводы: результаты обеспечивают то, что, в условиях экспериментов, вставка XTEN в FVIII приводит к защите от связывания ингибиторами FVIII, с сохранением прокоагулянтной активности, и к тому, что включение нескольких вставок XTEN увеличивает устойчивость к, в частности, антителу ингибитора домена А2. Наконец, по-видимому, существует влияние, которое имеет пространственное разделение между вставками XTEN.

Таблица 30

Результаты анализа коагулирующей активности с CFXTEN, обработанных антителом GMA8008 к домену С2

Название конструкции	**Относительная остаточная активность**	**Отношение к контролю**	**Вставка 1XTEN**	**Вставка 2 XTEN**	**Вставка 3 XTEN**	**Мутации**
pBC0114 CT	0,05-0,15	1				
pBC0149	0,1	0,8	0745_AE42_1			
pSD0045	0,3	1,1	0018_AE144_5A			
pSD0046	0,3	1,0	0018_AG144_F			
pSD0050	0,2	0,9	0026_AG144_F			
pSD0051	0,3	1,3	0040_AE144_5A			
pSD0052	0,2	1,0	0040_AG144_F			
pSD0001	0,2	0,9	0403_AE144_2A			
pBC0136	0,2	1,2	0745_AE288_1			
pBC0137	0,2	1,1	0745_AE288_1			R1648A
pSD0013	0,1	0,9	2332_AE144_6B			
pSD0014	0,1	0,8	2332_AG144_1			
pBC0145	0,1	0,6	2332_AE288_1			
pSD0019	0,1	0,5	2332_AE288_1			
pBC0146	0,1	0,7	2332_AG288_1			
pSD0015	0,1	0,8	2332_AE864			
LSD0038.008	0,1	0,9	0018_AG144_F	1656_AG144_C		
LSD0038.013	0,1	0,6	0040_AG144_F	1656_AG144_C		
LSD003.09	0,1	0,9	0745_AE144_3B	2332_AE288_1		
LSD003.06	0,0	0,8	0745_AE144_3B	2332_AE288_1		R1648A
LSD0046.001	0,0	0,6	1656_AG144_C	1900_AG144_C		
PSD077	0,1	1,0	0026_AG144_F	0403_AE144_2A	1656_AG144_C	
PSD080	0,1	1,0	0026_AG144_F	1656_AG144_C	1720_AG144_C	
PSD083	0,1	0,8	0403_AE144_2A	1656_AG144_C	1720_AG144_C	
PSD084	0,1	0,9	0403_AE144_2	1656_AG1	1900_AE1	

			A	44_C	44_4A	
LSD0050.010	0,1	0,7	0018_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0049.021	0,0	0,6	0018_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049.002	0,1	0,9	0018_AG144_F	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049.008	0,1	0,9	0026_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049.011	0,1	0,9	0026_AG144_F	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049.020	0,2	2,6	0040_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0050.002	0,0	0,2	0040_AG144_F	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0053.024	0,2	2,5	1711_AE144_4A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0054.021	0,2	1,5	1720_AG144_C	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0055.021	0,2	1,6	1900_AE144_4A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0056.021	0,2	1,6	1900_AG144_C	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0056,025	0,3	2,0	1910_AG144_C	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	

доля активности, оставшейся по отношению к соответствующему необработанному образцу;

отношение относительной остаточной активности (по отношению к его собственному контролю), по сравнению с положительным контролем pBC0114 FVIII.

Таблица 31

Результаты анализа коагулирующей активности с CFXTEN, обработанным антителом GMA8021 к домену A2

Название конструкции	**Относительная остаточная активность**	**Отношение к контролю**	**Вставка 1 XTEN**	**Вставка 2 XTEN**	**Вставка 3 XTEN**	**Мутации**
pBC0114	0,05-0,15	1				
pBC0149	0,2	1,3	0745_AE42_1			
pSD0045	0,3	2,7	0018_AE144_5A			
pSD0046	0,2	2,1	0018_AG144_F			
pSD0050	0,2	2,4	0026_AG144_F			
pSD0051	0,3	3,1	0040_AE144_5A			
pSD0052	0,3	2,7	0040_AG144_F			
pSD0001	0,2	1,6	0403_AE144_2A			
pBC0136	0,3	2,4	0745_AE288_1			
pBC0137	0,3	2,4	0745_AE288_1			R1648A

pSD0013	0,2	1,8	2332_AE144_6B			
pSD0014	0,2	2,1	2332_AG144_1			
pBC0145	0,3	2,1	2332_AE288_1			
pSD0019	0,3	2,3	2332_AE288_1			
pBC0146	0,3	2,1	2332_AG288_1			
pSD0015	0,3	2,8	2332_AE864			
LSD0038.008	0,4	3,0	0018_AG144_F	1656_AG144_C		
LSD0038.013	0,4	3,0	0040_AG144_F	1656_AG144_C		
LSD003.09	0,3	3,6	0745_AE144_3B	2332_AE288_1		
LSD003.06	0,3	3,4	0745_AE144_3B	2332_AE288_1		R1648A
LSD0046.001	0,2	4,4	1656_AG144_C	1900_AG144_C		
PSD077	0,4	5,8	0026_AG144_F	0403_AE144_2A	1656_AG144_C	
PSD080	0,4	5,7	0026_AG144_F	1656_AG144_C	1720_AG144_C	
PSD083	0,3	5,0	0403_AE144_2A	1656_AG144_C	1720_AG144_C	
PSD084	0,3	4,5	0403_AE144_2A	1656_AG144_C	1900_AE144_4A	
LSD0050.010	0,4	6,7	0018_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0049.021	0,4	6,7	0018_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049.002	0,5	9,2	0018_AG144_F	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049.008	0,4	5,9	0026_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049.011	0,4	5,6	0026_AG144_F	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049.020	0,3	5,0	0040_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0050.002	0,3	6,2	0040_AG144_F	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0053.024	0,3	4,5	1711_AE144_4A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0054.021	0,5	5,2	1720_AG144_C	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0055.021	0,5	5,4	1900_AE144_4A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0056.021	0,5	5,1	1900_AG144_C	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0056.025	0,5	4,8	1910_AG144_C	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	

доля активности, оставшейся по отношению к соответствующему необработанному образцу;

отношение относительной остаточной активности (по отношению к его собственному контролю), по сравнению с положительным контролем pBC0114 FVIII.

Пример 29. Очистка протеина гибридных белков pBC0145 и pBC0146 CFXTEN.

Две конструкции CFXTEN с С-концевым XTEN используют для установления способа очистки. Для обоих pBC0145, с С-концевым XTEN из 288 аминокислот семейства AE (см. последовательность в табл. 21), и pBC0146 с С-концевым XTEN из 288 аминокислот семейства AG (см. последовательность в табл. 21), этап тангенциальной поточной фильтрации (TFF) используют для замены буфера осветленной кондиционированной среды из культуры клеток. Продукты затем получают с использованием сильной анионообменной смолы для хроматографии, а затем дополнительно очищают с использованием VIII-селективной аффинной хроматографии (GE Healthcare). Дополнительно гель-проникающую хроматографию (GE Healthcare) применяют к FVIII-pBC0146 в качестве третьего этапа обработки для удаления видов с высокой молекулярной массой. Чистоту обоих гибридных белков признают приемлемой после HPLC-SEC и дополнительно подтверждают с помощью анализа SDS-PAGE двух конструкций CFXTEN,

которые демонстрируют продукты CFXTEN в ожидаемых размерах. Специфическая активность обоих молекул является аналогичной FVIII без B-доменов, что измерено с помощью анализа коагулирующей активности aPTT и определения концентрации FVIII с помощью ELISA.

Пример 30. Фармакокинетические свойства гибридных белков CFXTEN pBC0145 и pBC0146 у мышей HemA и FVIII/VWF DKO.

Самцов FVIII нокаутных (HemA) мышей или дважды нокаутных (DKO) мышей FVIII/VWF, 8-12 недель отроду, обрабатывают одним внутривенным введением либо рекомбинантного BDD-FVIII, pBC0145CFXTEN, либо слитых очищенных белков pBC0146 (из примера 23) при 200 МЕ/кг дозы (n=4/момент времени). В выбранные моменты времени, образцы крови собирают посредством забора из полой вены. У мышей HemA образцы крови собирают через 5 мин, 1, 4, 8, 16, 20, 24, 32 и 48 ч после введения дозы rBDD-FVIII, и через 5 мин, 8, 16, 24, 32, 48, 55 и 72 ч после введения дозы гибридных белков pBC0145 и pBC0146. У мышей FVIII/VWF DKO образцы крови собирают через 5 мин, 30 мин и 1 час после введения дозы rBDD-FVIII, и через 5 мин, 4, 8, 16 и 24 ч после введения дозы гибридных белков pBC0145 и pBC0146. Активность FVIII в плазме измеряют с помощью хромогенного анализа FVIII и профиль PK анализируют с помощью программы WinNonlin.

Результаты. Как демонстрируют в табл. 32 и фиг. 24, CFXTEN со вставкой AE на C-конце XTEN (pBC0145) демонстрирует 1,6 и 14,1-кратное увеличение времени полужизни FVIII (T1/2), по сравнению с rBDD FVIII у мышей HemA и мышей FVIII/VWF DKO соответственно. CFXTEN со вставкой AG на C-конце XTEN (pBC0146) имеет 1,4 и 14,4-кратное увеличение времени полужизни, по сравнению с rBDD-FVIII у мышей HemA и мышей FVIII/VWF DKO соответственно. Масштаб увеличения времени полужизни FVIII, обеспеченный с помощью вставки XTEN, является гораздо более выраженным у мышей FVIII/VWF DKO, по сравнению с мышами HemA, что продемонстрировано с помощью в 1,4 раза более продолжительного времени полужизни FVIII и FVIII-AE-XTEN, и FVIII-AG-XTEN, по сравнению с rBDD-FVIII. Кроме того, по сравнению с rBDD-FVIII, FVIII с C-концевой вставкой AE или AG-XTEN также имеют значительно улучшенное восстановление FVIII в 5 мин интервале, сниженное выведение, объем распределения и увеличенный AUC у мышей DKO. В условиях эксперимента, CFXTEN с C-концевыми вставками XTEN демонстрирует большой потенциал в увеличении времени полужизни FVIII, и, в сочетании с другими внутридоменными вставками FVIII может потенциально дополнительно расширять время полужизни FVIII.

Таблица 32

Фармакокинетические параметры CFXTEN у мышей HemA и FVIII/VWF DKO

Штамм мышей	Обработка	Восстановление 5 мин (%)	$T_{1/2}$ (ч)	MRT (ч)	Cl (мл/ч/кг)	Vss (мл/кг)	AUC_D (чкгм МЕ/мл/мМЕ)	Прирост $T_{1/2}$	Штамм мышей
HemA	pBC0145	73	11,88	16,47	3,81	62,74	0,26	1,6	HemA
	pBC0146	64	10,54	13,31	5,66	75,34	0,18	1,4	
	rBDD-FVIII	89	7,58	11,02	4,33	47,68	0,23		
FVIII/VWF DKO	pBC0145	74	3,38	3,76	13,06	63,68	0,0765	13,9	FVIII/VWF DKO
	pBC0146	61	3,45	3,61	17,40	86,63	0,0575	14,2	
	rBDD-FVIII	23	0,24	0,24	460,62	161,51	0,0022		

по сравнению с rBDD-FVIII.

Пример 31. Культура клеток и концентрация среды для выращивания культур клеток в случае гибридных белков CFXTEN pSD0050 и pSD0062.

Варианты pSD0050 конструкции CFXTEN с внутридоменным AG XTEN из 144 аминокислот, вводимых после аминокислотного остатка 26 BDD FVIII, pSD0062 с внутридоменным AE XTEN из 144 аминокислот, вводимых после остатка 1900 FVIII BDD (Примечание: аминокислоту нумеруют на основании всей длины FVIII), а также конструкцию, кодирующую rBDD-FVIII, трансфицируют в клетки HEK293F (Invitrogen, Карлсбад, CA) с использованием полиэтиленимина (PEI, Polysciences Inc. Warrington, PA). Временно трансфицированные клетки выращивают в среде 293 Free Style (Invitrogen, Карлсбад, CA) в течение 4 дней и 50-100 мл среды для выращивания культур клеток затем концентрируют в 10-20 раз с помощью Centricon Spin Column (пороговое значение MM 100 кДа) для того, чтобы достигнуть активности FVIII 10-30 МЕ/мл. Концентрированные материалы затем быстро замораживают и хранят при -80°C для дальнейшего in vitro анализа и in vivo фармакокинетических исследований.

Пример 32. Фармакокинетические свойства гибридных белков pSD0050 и pSD0062 CFXTEN у мышей HemA и FVIII/VWF DKO.

Самцов HemA или FVIII/VWF дважды нокаутных (DKO) мышей, 8-12 недель отроду, обрабатывают однократным внутривенным введением концентратов культуры клеток из примера 31, которые со-

держат либо рекомбинантный BDD-FVIII, CFXTEN pBD0050, либо pBD062 при 100-300 МЕ/кг (n=3/группа). В выбранные моменты времени, образцы крови собирают посредством отбора из ретроорбитального синуса из такого же набора мышей. У мышей HemA, образцы крови собирают через 5 мин, 24 ч и 48 ч после введения дозы, в то время как у мышей FVIII/VWF DKO образцы крови собирают через 5 мин, 8 ч и 16 ч. Активность FVIII образцов плазмы и концентратов культуры клеток анализируют с помощью хромогенного анализа FVIII, профиля PK rBDD FVIII и варианты FVIII-XTEN анализируют с использованием программы WinNonlin.

Результаты. профили PK двух вариантов внутридоменной вставки CFXTEN pSD0050 и pSD0062 и rBDD-FVIII у мышей HemA и мышей FVIII/VWF DKO проиллюстрированы на фиг. 25 и в табл. 33. У мышей HemA, аналогичное первоначальное восстановление в интервале 5 мин наблюдают для трех тестовых молекул FVIII. Оба гибридных белка CFXTEN демонстрируют в два раза более продолжительное время полужизни, по сравнению с BDD-FVIII дикого типа. У мышей FVIII-VWF DKO, ввиду потери защиты VWF, rBDD-FVIII имеет только 15 мин времени полужизни в плазме. В случае двух CFXTEN, несмотря на это, время полужизни увеличивают до 3,15 ч и 3,83 ч, соответственно; значения, которые являются аналогичными CFXTEN с 288 С-концевыми вставками XTEN (пример 24), предполагают, что дополнительное увеличение длины XTEN в данной точке вставки может быть не обязательным. В условиях эксперимента, результаты исследования наглядно демонстрируют, что внутридоменная вставка XTEN с 144 аминокислотными остатками не только сохраняет активность FVIII, но также обеспечивает схожее преимущество времени полужизни FVIII, как и в случае вариантов С-концевой вставки 288 аминокислот в XTEN, предполагая, что комбинирование внутридоменных и С-концевых вставок FVIII может позволить дополнительное увеличение времени полужизни FVIII.

Таблица 33

Фармакокинетические параметры CFXTEN у мышей HemA и FVIII/VWF DKO

Штамм мышей	Обработка	Восстановление 5 мин (%)	$T_{1/2}$ (ч)	MRT (ч)	Cl (мл/ч/кг)	Vss (мл/кг)	AUC_D (чкгмМЕ/мл/мМЕ)	$T_{1/2}$ Прирост
HemA	pSD0050	40	14,12	14,25	5,27	75,03	0,19	2,3
	pSD0062	43	12,96	14,79	4,24	62,67	0,24	2,1
	rBDD-FVIII	47	6,19	2,62	6,35	16,62	0,16	
FVIII/VWF DKO	pSD0050	34	3,15	2,59	21,73	56,28	0,05	~12
	pSD0062	35	3,83	3,71	18,51	68,69	0,05	~15
	rBDD-FVIII	23	~0,25					

по сравнению с rBDD-FVIII.

Пример 33. Фармакокинетический анализ слитых полипептидов CFXTEN у крыс.

Фармакокинетические свойства различных гибридных белков CFXTEN, по сравнению с отдельным FVIII, проверяют у крыс Sprague-Dawley. CFXTEN и FVIII вводят самкам крыс Sprague-Dawley (n=3) IV через катетер в яремную вену при 3-10 мкг/крыса. Образцы крови (0,2 мл) собирают в предварительно охлажденной гепаринизированные перед введением дозы пробирки в моменты времени 0,08, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 ч и перерабатывают в плазме. Количественное определение тестируемых веществ осуществляют с помощью анализа ELISA с использованием анти-FVIII антитела и для иммобилизации, и для детектирования. Некомпартментный анализ осуществляют в WinNonLin со всеми моментами времени, которые содержатся в наборе для определения параметров PK. Результаты, как ожидается, показывают увеличение конечного времени полужизни и площади под кривой, сниженный объем распределения в случае CFXEN, по сравнению с отдельным FVIII, а результаты используют в сочетании с результатами свертывания и фармакодинамических анализов, для того, чтобы выбрать конформации гибридного белка с нужными свойствами.

Пример 34. Анализ FVIII на инсерционные сайты XTEN.

Выбор инсерционных сайтов XTEN в пределах молекулы фактора VIII осуществляют с помощью прогнозирования локализаций пермиссивных сайтов в пределах петлеобразных структур или, в других случаях, конформационно-лабильной поверхности располагающихся структурных элементов. Для этих анализов используют атомные координаты двух независимо определенных кристаллографических структур FVIII, полученных с помощью рентгеноструктурного анализа (Shen BW, et al. The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII. Blood. (2008) Feb 1; 111(3): 1240-1247; Ngo JC, et al. Crystal structure of human factor VIII: implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex. Structure (2008)16(4):597-606), а также фактор VIII и фактор VIIIa, полученные из симуляция молекуляр-

ной динамики (MDS) (Venkateswarlu, D. Structural investigation of zymogenic and activated forms of human blood coagulation factor VIII: a computational molecular dynamics study. BMC Struct Biol. (2010) 10:7). Атомные координаты в формате Protein Data Bank (PDB) анализируют для идентификации областей FVIII/FVIIIa, предполагаемых для того, чтобы иметь площадь поверхности с высокой степенью доступности для растворителя с использованием алгоритмов ASAView (Ahmad S, et al. ASAView: database and tool for solvent accessibility representation in proteins. BMC Bioinformatics (2004) 5:51) и GetArea (Rychkov G, Petukhov M. Joint neighbors approximation of macromolecular solvent accessible surface area. J Comput Chem (2007) 28(12): 1974-1989). Получаемый набор сайтов затем дополнительно приоритезируют на основании высокой флуктуации прогнозируемых положений атомов, основываясь на базисе опубликованных результатов исследования MDS. Сайты в пределах кислой пептидной области фланкируют домены A1, A2 и A3, а также деприоритизируют те, которые появились путем визуального осмотра, существующие в других областях, а не на поверхности располагающихся петель. Получаемые набор потенциальных сайтов оценивают на основании консервативности межвидовой последовательности, с теми сайтами в областях с высокой консервативностью последовательности среди 20 видов позвоночных, которые занимают более предпочтительное положение при оценке. Дополнительно, предполагаемые связывающие сайты рецептора выведения, сайты взаимодействия FVIII с другими молекулами (такими как vWF, FIX), домен и границы экзона также рассматривают в выборе сайта слияния. Наконец, сайты в непосредственной близости от мутаций причастны гемофилии A, приведенной в базе данных Haemophilia A Mutation, Search, Test and Resource Site (HAMSTeRS) устраняют (Kemball-Cook G, et al. The factor VIII Structure and Mutation Resource Site: HAMSTeRS version 4. Nucleic Acids Res. (1998) 26(1):216-219). Основываясь на этом критерии, в случае вставок XTEN предлагают построение 42 вариантов FVIII-XTEN. Из них три представляют вставки XTEN в пределах последовательности остаточного домена B, два представляют собой расширения молекулы фактора VIII на C-конце, и 37 представляют собой вставки XTEN в пределах структурно определенных между- и внутридоменных структурных элементов; т.е. остатков 3, 18, 22, 26, 40, 60, 116, 130, 188, 216, 230, 333, 375, 403, 442, 490, 518, 599, 713, 745, 1720, 1796, 1802, 1827, 1861, 1896, 1900, 1904, 1937, 2019, 2068, 2111, 2120, 2171, 2188, 2227, 2277 и 2332.

Пример 35. Функциональный анализ конструкций FVIII-XTEN.

Два гибридных белка FVIII-XTEN, FVIII-AE288 (F8X-40) и FVIII-AG288 (F8X-41), содержат AE288_1 XTEN или AG288_1 XTEN, соответственно, слитый на C-конце домена C2 FVIII. Для определения, сохраняется ли активность FVIII после слияния XTEN, клетки HEK293 трансфицируют по отдельности с этими двумя слитыми конструкциями FVIII-XTEN с помощью использования полиэтиленимина (PEI) в бессывороточной среде. Через 3 или 5 дней после трансфекции, супернатант культуры клеток проверяют на активность FVIII с помощью двухэтапного хромогенного анализа. Очищенный рекомбинантный FVIII, калиброванный против международного стандарта WHO, используют для создания стандартной кривой в хромогенном анализе. Продукты гибридного белка обоих конструкций, и F8X-40 и F8X-41, экспрессируют на уровнях, аналогичных таковым конструкций BDD-FVIII дикого типа (табл. 34).

Таблица 34

Титр FVIII гибридных белков FVIII-XTEN в культуре клеток временной трансфекции

Молекулы FVIII		FVIII 066[a]	pBC 0114[a]	F8X-40	F8X-41
Активность FVIII (МЕ/мл)	Образец A	6,42	6,68	7,47	3,32[b]
	Образец B	7,13	7,61	8,25	Не сделано

[a] И FVIII 066, и pBC 0114 содержат FVIII без B-доменов без слияния XTEN.

[b] Образец F8X-41 был из 3-дневной трансфекции, в то время как другие образцы были из 5-дневной временной трансфекции.

Пример 36. Функциональный анализ конструкций FVIII-XTEN: активность FVIII и свойства PK.

Потенциал увеличения времени полужизни конструкций F8X-40 и F8X-41 оценивают у мышей с двумя нокаутированными генами, FVIII и фактора фон Виллебранда, с помощью гидродинамической плазмидной инъекции DNA, с конструкцией DNA FVIIIFc, служащей в качестве положительного контроля. Мышей случайным образом разделяют на 3 группы с 4 мышами в группе. Плазмидная DNA кодирует гибридный белок BDD FVIIIFc, F8X-40 или F8X-41, все распространяет такой же остов вектора DNA, который вводят мышам в соответствующих группах. Приблизительно 100 микрограмм соответствующей плазмидной DNA вводят каждой мыши посредством гидродинамической инъекции, а образцы плазмы крови собирают через 24 и 48 ч после инъекции. Активность FVIII в плазме измеряют с помощью двухэтапного хромогенного анализа с использованием калиброванного рекомбинантного FVIII в качестве стандарта. Как показано на фиг. 23, образцы из групп F8X-40 и F8X-41 демонстрируют большие титры FVIII в плазме, чем те, которые из BDD FVIIIFc, предполагая, что слияние FVIII с XTEN продлевает время полужизни FVIII in vivo. Взятые вместе, эти данные обеспечивают вывод, что гибридные белки FVIII-XTEN сохраняют активность FVIII во временной трансфекции и в животной модели демонстрируют пролонгированное время полужизни в кровотоке.

Пример 37. Фармакодинамическая оценка CFXTEN в животных моделях.

Фармакологическую активность гибридных белков CFXTEN in vivo оценивают с использованием ряда преклинических моделей кровотечения, которые содержат, но без ограничения ими, гемофилию, операцию, травму, тромбоцитопению/дисфункцию тромбоцита, кровотечение, вызванное клопидогрелем/гепарином и гидродинамическую инъекцию. Эти модели развивают у нескольких видов, которые содержат мышей, крыс, кроликов, и собак с использованием способов, эквивалентных используемым и опубликованных в случае других подходов FVIII. Композиции CFXTEN обеспечивают в водном буфере совместимые с in vivo введением (например: фосфатно-солевой буфер или ТРИС-буферизированный физиологический раствор). Композиции вводят при соответствующих дозах, частоте дозирования, режиме дозирования и пути введения, которые оптимизируют для конкретной модели. Определения эффективности содержат измерение активности FVIII, одноэтапный анализ коагулирующей активности, хромогенный анализ FVIII, время образования и активности протромбина (aPTT), время кровотечения, время свертывания цельной крови (WBCT), тромбоэластографию (TEG или ROTEM), среди прочих.

В одном из примеров модель PD, CFXTEN и FVIII вводят генетически-дефицитным или экспериментально-индуцированным мышам HemA. В различные моменты времени после введения, уровни FVIII и CFXTEN измеряют с помощью ELISA, активность FVIII и CFXTEN измеряют с помощью коммерчески-доступных наборов активности FVIII и время свертывания измеряют с помощью анализа aPTTa. В целом, результаты могут указывать на то, что конструкции CFXTEN могут быть более эффективными при ингибировании кровотечения, по сравнению с FVIII и/или эквивалентными в специфической активности с аналогичной дозировкой FVIII с менее частыми или более удобными интервалами дозирования.

В случае кровотечения у мыши CFXTEN модели PD и FVIII вводят генетически-дефицитным или экспериментально-индуцированным мышам HemA и измеряют влияние на гемостатическую проблему. Гемостатическая проблема может содержать проблему с усечением хвоста, проблему в случае гемартроза, суставное кровотечение или проблему с подкожной веной, среди прочих. В различные моменты времени после введения, уровни FVIII и CFXTEN измеряют с помощью ELISA, активность FVIII и CFXTEN измеряют с помощью коммерчески доступного набора активности FVIII, время кровотечения и время свертывания измеряют с помощью анализа aPTT. В целом, результаты, как ожидается, показывают, что конструкции CFXTEN являются более эффективными при ингибировании кровотечения, по сравнению с FVIII и/или эквивалентным в специфической активности при аналогичной дозировке FVIII с менее частыми или более удобными интервалами дозирования, а результаты используют в сочетании с результатами свертывания и другими анализами, для того, чтобы выбрать конформации гибридного белка с нужными свойствами.

В собачей модели PD, CFXTEN и FVIII вводят генетически-дефицитным собакам с гемофилией. В различные моменты времени после введения, уровни FVIII и CFXTEN измеряют с помощью ELISA, активность FVIII и CFXTEN измеряют с помощью коммерчески доступного набора активности FVIII и время свертывания измеряют с помощью анализа aPTT. В целом результаты обозначают, что конструкции CFXTEN могут быть более эффективными при ингибировании кровотечения, по сравнению с FVIII и/или эквивалентными в специфической активности при аналогичной дозировке FVIII с менее частым или более удобным дозированием, а результаты используют в сочетании с результатами свертывания и другими анализами, для того, чтобы выбрать конформации гибридного белка с нужными свойствами.

В случае кровотечения у собаки PD модель CFXTEN и FVIII вводят генетически дефицитным собакам с гемофилией и измеряют влияние в гемостатической проблеме. Гемостатическая проблема содержит, среди прочих, время кровотечения в кутикуле. В различные моменты времени после введения уровни FVIII и CFXTEN измеряют с помощью ELISA, активность FVIII и CFXTEN измеряют с помощью коммерчески доступного набора активности FVIII, измеряют время кровотечения, а время свертывания измеряют с помощью анализа aPTT. В целом, результаты указывают, что конструкции CFXTEN могут быть более эффективными при ингибировании кровотечения, по сравнению с FVIII и/или эквивалентными в специфической активности при аналогичной дозировке FVIII с менее частыми или более удобными интервалами дозирования, и результаты используют в сочетании с результатами свертывания и другими анализами для того, чтобы выбрать конформации гибридного белка с нужными свойствами.

Дополнительные преклинические модели кровотечения содержат, но без ограничения ими, гемофилию, операцию, травму, тромбоцитопению/дисфункцию тромбоцитов, кровотечение, индуцированное клопидогрелем/гепарином и гидродинамическую инъекцию. Эти модели могут разрабатывать у нескольких видов, которые содержат мышей, крыс, кроликов и собак с использованием способов, эквивалентных используемым и опубликованным в случае других подходов FVIII. В целом результаты указывают, что конструкции CFXTEN могут быть более эффективными при ингибировании кровотечения, по сравнению с FVIII и/или эквивалентными в специфической активности при аналогичной дозировке FVIII с менее частыми или более удобными интервалами дозирования, а результаты используют в сочетании с результатами свертывания и другими анализами для того, чтобы выбрать конформации гибридного белка с нужными свойствами.

Пример 38. CFXTEN с расщепленными последовательностями.

С-концевой XTEN, секретируемый FXIa.

Гибридный белок CFXTEN, состоящий из протеина XTEN, слитого с С-концом FVIII, создают с по-

следовательностью расщепления сайта секретирования XTEN, размещенной между FVIII и компонентами XTEN, как проиллюстрировано на фиг. 12. Иллюстративные последовательности приведены в табл. 51. В данном случае, последовательность расщепления сайта секретирования встраивают в CFXTEN, который содержит аминокислотную последовательность, которую распознают и расщепляют с помощью протеазы FXIa (EC 3.4.21.27, Uniprot P03951). В частности, аминокислотную последовательность KLTRAET (SEQ ID NO: 1688) обрезают после аргинина последовательности с помощью протеазы FXIa. FXI представляет собой прокоагулирующую протеазу, расположенную непосредственно перед FVIII во внутреннем или внутреннем пути активации свертывания крови. Активную FXIa получают из FXI с помощью протеолитического расщепления зимогена с помощью FXIIa. Получение FXIa жестко контролируется и происходит только при коагуляции, необходимой для правильного гемостаза. Таким образом, с помощью включения последовательности расщепления KLTRAET (SEQ ID NO: 1688), домен XTEN удаляют только из FVIII, одновременно с активацией внутреннего пути свертывания и если свертывание является необходимым физиологически. Это создает ситуацию, когда гибридный белок CFXTEN обрабатывают дополнительным способом во время активации внутреннего пути.

С-концевой XTEN, секретируемый с помощью FIIa (тромбин).

Гибридный белок CFXTEN, состоящий из протеина XTEN, слитого с С-концом FVIII, создают с последовательностью расщепления сайта секретирования XTEN, размещенной между FVIII и компонентами XTEN, как проиллюстрировано на фиг. 12. В данном случае, сайт секретирования содержит аминокислотную последовательность, которую распознают и расщепляют с помощью протеазы FIIa (EC 3.4.21.5, Uniprot P00734). В частности, последовательность LTPRSLLV (SEQ ID NO: 1618) [Rawlings N.D., et al. (2008) Nucleic Acids Res., 36: D320] обрезают после аргинина в положении 4 в последовательности. Активный FIIa получают с помощью расщепления FII с помощью FXa в присутствии фосфолипидов и кальция и далее в процессе от фактора IX в пути свертывания. После активации ее естественную роль заключается в коагуляции для расщепления фибриногена (фиг. 2), который затем, в свою очередь, начинает образование тромба. Активность FIIa жестко контролируют и происходит только при коагуляции, необходимой для правильного гемостаза. Таким образом, с помощью включения последовательности LTPRSLLV (SEQ ID NO: 1618), домен XTEN удаляют только из FVIII, одновременно с активацией либо внешнего, либо внутреннего путей свертывания, и если свертывание является необходимым физиологически. Это создает ситуацию, когда слияние CFXTEN обрабатывают отдельным дополнительным путем во время активации свертывания.

С-концевой XTEN, секретируемый с помощью эластазы-2.

Гибридный белок CFXTEN, состоящий из протеина XTEN, слитого с С-концом FVIII, создают с последовательностью расщепления сайта секретирования XTEN, размещенной между FVIII и компонентами XTEN, как проиллюстрировано на фиг. 12. Иллюстративные последовательности обеспечивают в табл. 51. В данном случае сайт секретирования содержит аминокислотную последовательность, которую распознают и расщепляют с помощью эластазы-2, протеазы (EC 3.4.21.37, Uniprot P08246). В частности, последовательность LGPVSGVP (SEQ ID NO: 1689) [Rawlings N.D., et al. (2008) Nucleic Acids Res., 36: D320], обрезают после положения 4 в последовательности. Эластазу конститутивно экспрессируют с помощью нейтрофилов и она присутствует в кровообращении в любое время. Ее активность жестко контролируют с помощью серпинов и, следовательно, она минимально активна большую часть времени. Таким образом, пока циркулирует долгоживущий CFXTEN, его фракцию расщепляют, а создание пула короткоживущего FVIII будет использоваться в свертывании. В желательном признаке патентоспособной композиции, это создает циркулирующее депо пролекарственного препарата, которое постоянно высвобождает профилактическое количество FVIII.

С-концевой XTEN, секретируемый с помощью MMP-12.

Гибридный белок CFXTEN, состоящий из протеина XTEN, слитого с С-концом FVIII, создают с последовательностью расщепления сайта секретирования XTEN, размещенной между FVIII и компонентами XTEN, как проиллюстрировано на фиг. 12. Иллюстративные последовательности обеспечивают в табл. 51. В данном случае, сайт секретирования содержит аминокислотную последовательность, которую распознают и расщепляют с помощью протеазы MMP-12 (EC 3.4.24.65, Uniprot P39900). В частности, последовательность GPAGLGGA (SEQ ID NO: 1690) [Rawlings N.D., et al. (2008) Nucleic Acids Res., 36: D320], обрезают после положения 4 последовательности. MMP-12 конститутивно экспрессируют в цельную кровь. Таким образом, пока циркулирует долгоживущий CFXTEN, его фракцию расщепляют, а создание пула короткоживущего FVIII будет использоваться в свертывании. В желательном признаке патентоспособной композиции, это создает циркулирующее депо пролекарственного препарата, которое постоянно высвобождает профилактическое количество FVIII.

С-концевой XTEN секретируемый с помощью MMP-13.

Гибридный белок CFXTEN, состоящий из протеина XTEN, слитого с С-концом FVIII, создают с последовательностью расщепления сайта секретирования XTEN, размещенной между FVIII и компонентами XTEN, как проиллюстрировано на фиг. 12. Иллюстративные последовательности обеспечивают в табл. 51. В данном случае, сайт секретирования содержит аминокислотную последовательность, которую распознают и расщепляют с помощью протеазы MMP-13 (EC 3.4.24.-, Uniprot P45452). В частности, по-

следовательность GPAGLRGA (SEQ ID NO: 1691) [Rawlings N.D., et al. (2008) Nucleic Acids Res., 36: D320], обрезают после положения 4. MMP-13 конститутивно экспрессируют в цельную кровь. Таким образом, пока циркулирует долгоживущий CFXTEN, его фракцию расщепляют, а создание пула короткоживущего FVIII будет использоваться в свертывании. В желательном признаке патентоспособной композиции, это создает циркулирующее депо пролекарственного препарата, которое постоянно высвобождает профилактическое количество FVIII.

С-концевой XTEN, секретируемый с помощью MMP-17.

Гибридный белок CFXTEN, состоящий из протеина XTEN, слитого с С-концом FVIII, создают с последовательностью расщепления сайта секретирования XTEN, размещенной между FVIII и компонентами XTEN, как проиллюстрировано на фиг. 12. Иллюстративные последовательности обеспечивают в табл. 51. В данном случае, сайт секретирования содержит аминокислотную последовательность, которую распознают и расщепляют с помощью протеазы MMP-20 (EC.3.4.24.-, Uniprot Q9ULZ9). В частности, последовательность APLGLRLR (SEQ ID NO: 1692) [Rawlings N.D., et al. (2008) Nucleic Acids Res., 36: D320], обрезают после положения 4 в последовательности. MMP-17 конститутивно экспрессируют в цельную кровь. Таким образом, пока циркулирует долгоживущий CFXTEN, его фракцию расщепляют, а создание пула короткоживущего FVIII будет использоваться в свертывании. В желательном признаке патентоспособной композиции, это создает циркулирующее депо пролекарственного препарата, которое постоянно высвобождает профилактическое количество FVIII.

С-концевой XTEN, секретируемый с помощью MMP-20.

Гибридный белок CFXTEN, состоящий из протеина XTEN, слитого с С-концом FVIII, создают с последовательностью расщепления сайта секретирования XTEN, размещенной между FVIII и компонентами XTEN, как проиллюстрировано на фиг. 12. Иллюстративные последовательности обеспечивают в табл. 51. В данном случае, сайт секретирования содержит аминокислотную последовательность, которую распознают и расщепляют с помощью протеазы MMP-20 (EC.3.4.24.-, Uniprot 060882). В частности, последовательность PALPLVAQ (SEQ ID NO: 1693) [Rawlings N.D., et al. (2008) Nucleic Acids Res., 36: D320], обрезают после положения 4 (изображен стрелкой). MMP-20 конститутивно экспрессируют в цельную кровь. Таким образом, пока циркулирует долгоживущий CFXTEN, его фракцию расщепляют, создание пула короткоживущего FVIII будет использоваться в свертывании. В желательном признаке патентоспособной композиции, это создает циркулирующее депо пролекарственного препарата, которое постоянно высвобождает профилактическое количество FVIII.

Оптимизирование скорости секретирования XTEN.

Могут быть созданы варианты вышеуказанных примеров, в которых изменяют скорость секретирования XTEN, встроенного на С-конце, N-конце, или внутри XTEN. Так как скорость секретирования XTEN с помощью протеазы секретирования XTEN зависит от последовательности сайта секретирования XTEN, с помощью изменения аминокислотной последовательности в сайте секретирования XTEN можно контролировать скорость секретирования XTEN. Специфичность последовательности многих протеаз широко известна в данной области техники, и описана в некоторых базах данных. В данном случае, специфичность аминокислоты протеаз отображают с использованием комбинаторных библиотек субстратов [Harris, J. L., et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA, 97: 7754] или с помощью следующего расщепления смеси субстратов, как показано у [Schellenberger, V., et al. (1993) Biochemistry, 32: 4344]. Альтернативой является выявление оптимальных последовательностей для расщепления протеазой с помощью фагового отображения [Matthews, D., et al. (1993) Science, 260: 1113]. Конструкции создают с различными последовательностями и анализируют на секретирование XTEN с использованием стандартных анализов для детектирования полипептидов XTEN.

Пример 39. Структуры клинических испытаний человека для оценки CFXTEN, который содержит FVIII.

Kogenate® FS представляет собой рекомбинантный фактор свертывания VIII человека, предназначенный для промотирования гемостаза у субъектов с гемофилией А. Благодаря своему короткому времени полужизни, Kogenate дозируют внутривенно через день в течение профилактики и 8 каждые 12 ч при лечении кровотечений до достижения гемостаза. Считается, что слияние одного или нескольких XTEN с FVIII улучшает время полужизни протеина, что позволяет снизить дозирование частоты использования таких композиций CFXTEN, содержащих гибридный белок.

Клинические испытания создают так, что эффективность и преимущества CFXTEN, по отношению к Kogenate или другим коммерчески доступным составам FVIII, может быть проверена на людях. Подобные исследования содержат три этапа. Первый, Этап I исследования безопасности и фармакокинетических свойств у взрослых пациентов проводят для определения максимальной переносимой дозы, фармакокинетических свойств и фармакодинамических свойств у людей (либо нормальных субъектов, либо пациентов с гемофилией), а также для определения потенциальных токсических эффектов и побочных эффектов, которые необходимо отслеживать в дальнейших исследованиях. Проводят исследования Этапа I, в которых однократные возрастающие дозы композиций CFXTEN вводят путем (например, подкожно, внутримышечно или внутривенно) и биохимические, PK и клинические параметры измеряют в определенных интервалах. Это позволяет определить минимальную действующую дозу, максимальную перено-

симую дозу и установить пороговую и максимальную концентрации в дозировке и циркулирующее лекарственное средство, которое представляют собой терапевтическое окно для соответствующих компонентов, а также биодоступность при введении внутримышечным или подкожным путем. Исходя из этой информации, получают дозу и режим дозирования, которые позволяют менее частое введение композиций CFXTEN, при этом сохраняя фармакологический ответ. После этого, клинические испытания проводят у пациентов с заболеванием, проверяя эффективность композиций CFXTEN в условиях дозы, которая может быть проведена, по сравнению с положительным контролем, таким как Kogenate, для установления улучшенных свойств композиций CFXTEN.

Клинические испытания II и III этапа проводят у пациентов, страдающих от любого заболевания, в случае которого фактор VIII, как ожидается, может обеспечить клинический эффект. Например, CFXTEN используют в клинических испытаниях при лечении показаний, одобренных для использования фактора VIII; подобные показания содержат случаи кровотечения у пациентов с гемофилией A, пациентов с ингибиторами фактора VIII, предупреждение кровотечения при хирургических вмешательствах или инвазивных способов у пациентов с гемофилией A с ингибиторами к фактору VIII, случаев лечения кровотечений у пациентов с врожденным дефицитом фактора VIII, и предупреждения кровотечения при хирургических вмешательствах или инвазивных способов у пациентов с врожденным дефицитом фактора VIII. CFXTEN также может быть указан для использования в дополнительных группах пациентов. Исследование дозирования на этапе II проводят у пациентов с гемофилией, где фармакодинамическое свойство, свертывание, кровотечение и другие параметры, физиологические, PK, безопасности и клинические, и клинические результаты, подходящие для испытаний, оцениваются как функцию дозирования композиций гибридных белков, с получением информации об определении оптимальной дозы о дозах, которые являются подходящими для исследования на следующем этапе III, в дополнение к сбору данных о безопасности, связанных с побочными эффектами. Параметры PK коррелируют с данными о физиологических, клинических параметрах и параметрах безопасности, устанавливающих терапевтическое окно и терапевтический режим дозирования в случае композиции CFXTEN, что позволяет врачу установить соответствующие диапазоны доз для композиции. В отдельном исследовании, пациенты с гемофилией A с ингибиторами фактора VIII могут быть оценены для того, чтобы установить дозы и режим дозирования фармацевтической композиции CFXTEN, которые приводят к достижению и поддержанию гемостаза и профилактике или ослаблению случаев кровотечения. Наконец, проводят исследование эффективности на этапе III, при том, что пациентам вводят фармацевтическую композицию CFXTEN и вводят положительный контроль (такой как коммерчески-доступный Kogenate) с использованием режима дозирования, который будет считаться соответствующим данным фармакокинетическим и фармакодинамическим свойствам соответствующих композиций, основанных на полученных результатах Этапа II, со всеми средствами, вводимыми в течение соответствующего длительного периода времени для достижения ожидаемых результатов исследования. Параметры, которые являются контролируемыми, содержат анализ aPTT, одно- или двухэтапные анализы коагулирующей активности, контроль случаев кровотечения или возникновение спонтанных случаев кровотечения; параметры, которые отслеживают по отношению к плацебо или группам положительного контроля. Результаты эффективности определяют с использованием стандартных статистических способов. Токсичность и маркеры неблагоприятных явлений также будут отслеживаться в этом исследовании, чтобы проверить, что соединение является безопасным при использовании по описанному способу. В дополнительном исследование Этапа III, пациенты с гемофилией A с ингибиторами фактора VIII могут быть оценены для установления эффективности фармацевтических композиций CFXTEN в достижении и поддержании гемостаза и профилактике или ослаблении случаев кровотечения.

Пример 40. Аналитическая гель-проникающая хроматография гибридных белков XTEN с различными полезными нагрузками.

Анализы с помощью гель-проникающей хроматографии выполняют на гибридные белки, который содержат различные терапевтические протеины и неструктурированные рекомбинантные протеины увеличенной длины. Иллюстративный анализ использует колонку TSKGel-G4000 SWXL (7,8 мм×30 см), в которой 40 мкг гибридного белка очищенного глюкагона при концентрации 1 мг/мл отделяют при скорости потока 0,6 мл/мин в 20 мМ фосфата pH 6,8, 114 мМ NaCl. Профили хроматограммы контролируют с использованием OD214hm и OD280hm. Калибровку колонки для всех анализов осуществляют с использованием эксклюзионного калибровочного стандарта от BioRad; маркеры содержат тироглобулин (670 кДа), бычий гамма-глобулин (158 кДа), куриный овальбумин (44 кДа), конский миоглобулин (17 кДа) и витамин B12 (1,35 кДа). Репрезентативные хроматографические профили глюкагона-Y288, глюкагона-Y144, глюкагона-Y72, глюкагона-Y36 проиллюстрированы в виде наложения на фиг. 21. Данные демонстрируют то, что кажущаяся молекулярная масса каждого соединения пропорциональна длине связанной последовательности XTEN. Несмотря на это, данные также демонстрируют то, что кажущаяся молекулярная масса каждой конструкции значительно больше ожидаемой в случае глобулярного белка (как показано в сравнении с использованием стандартных протеинов в том же анализе). Основываясь на анализах SEC для всех оцененных конструкций, которые содержат композицию CFXTEN, средние молекулярные массы, коэффициент средней молекулярной массы (выраженной как отношение кажущейся молеку-

лярной массы к расчетной молекулярной массе) и гидродинамический радиус (R_H в нм) показаны в табл. 35. Результаты указывают, что введение различных XTEN из 576 или более аминокислот придает кажущуюся молекулярную масса, в случае гибридного белка, приблизительно от 339 до 760 кДа, и что XTEN из 864 или более аминокислот придает кажущуюся молекулярную массу выше приблизительно 800 кДа. Результаты пропорционального увеличения кажущейся молекулярной массы к фактической молекулярной массой соответствует гибридным белкам, созданным с XTEN из некоторых различных семейств мотивов; т.е. AD, AE, AF, AG, и AM, с увеличением по меньшей мере в четыре раза и отношениями вплоть до около 17. Дополнительно, включение слитых партнеров XTEN с 576 или более аминокислотами в гибридных белках с различными полезными нагрузками (и 288 остатков в случае глюкагона, слитого с Y288) приводит к гидродинамическому радиусу 7 нмоль или больше, далеко от размера клубочковых пор приблизительно в 3-5 нм. Соответственно, ожидается, что гибридные белки, которые содержат рост и XTEN, снижают почечный клиренс, что способствует увеличенному конечному времени полужизни и улучшению терапевтического или биологического эффекта по отношению к соответствующему неслитому протеину, несущему биологическую нагрузку.

Таблица 35

Анализ SEC различных полипептидов

Название конструкции	**XTEN или слитый партнер**	**Лечебный белок**	**Актуальная ММ (кДА)**	**Кажущаяся ММ (кДА)**	**Коэффициент кажущейся молекулярной массы**	**R_H (нм)**
AC14	Y288	Глюкагон	28,7	370	12,9	7,0
AC28	Y144	Глюкагон	16,1	117	7,3	5,0
AC34	Y72	Глюкагон	9,9	58,6	5,9	3,8
AC33	Y36	Глюкагон	6,8	29,4	4,3	2,6
AC89	AF120	Глюкагон	14,1	76,4	5,4	4,3
AC88	AF108	Глюкагон	13,1	61,2	4,7	3,9
AC73	AF144	Глюкагон	16,3	95,2	5,8	4,7
AC53	AG576	GFP	74,9	339	4,5	7,0
AC39	AD576	GFP	76,4	546	7,1	7,7
AC41	AE576	GFP	80,4	760	9,5	8,3
AC52	AF576	GFP	78,3	526	6,7	7,6
AC398	AE288	FVII	76,3	650	8,5	8,2
AC404	AE864	FVII	129	1900	14,7	10,1
AC85	AE864	Эксендин-4	83,6	938	11,2	8,9
AC114	AM875	Эксендин-4	82,4	1344	16,3	9,4
AC143	AM875	hGH	100,6	846	8,4	8,7
AC227	AM875	IL-1ra	95,4	1103	11,6	9,2
AC228	AM1318	IL-1ra	134,8	2286	17,0	10,5

Пример 41. Фармакокинетические свойства расширенных полипептидов, слитых с GFP у яванских макак.

Фармакокинетические свойства GFP-L288, GFP-L576, GFP-XTEN_AF576, GFP-XTEN_Y576 и XTEN_AD836-GFP проверяют на яванских макаках для определения влияния композиций и длины неструктурированных полипептидов на параметры PK. Образцы крови анализируют в различные моменты времени после инъекции и концентрацию GFP в плазме измеряют с помощью ELISA с использованием поликлонального антитела против GFP для захвата и биотинилированного получения такого же поликлонального антитела для детектирования. Результаты проиллюстрированы на фиг. 19. Они демонстрируют неожиданное повышение времени полужизни с возрастанием длины последовательности XTEN. Например, время полужизни 10 ч определяют в случае GFP-XTEN_L288 (с 288 аминокислотными остатками в XTEN). Удвоение длины неструктурированного полипептидного партнера слияния до 576 аминокислот увеличивает время полужизни до 20-22 ч в случае нескольких конструкций гибридного белка; т.е. GFP-XTEN_L576, GFP-XTEN_AF576, GFP-XTENY576. Дополнительные повышения длины неструктурированного полипептидного партнера слияния до 836 остатков приводит ко времени полужизни 72-75 ч в случае XTEN_AD836-GFP. Таким образом, возрастание длины полимера на 288 остатка, от 288 до 576 остатков, увеличивает in vivo время полужизни на около 10 ч. Несмотря на это, возрастание длины полипептида на 260 остатков, от 576 остатков до 836 остатков, увеличивает время полужизни на более чем 50 ч. Эти результаты демонстрируют, что существует неожиданный порог длины неструктурированного полипептида, что приводит к более значительному, чем пропорциональное увеличение времени полу-

жизни in vivo. Таким образом, гибридные белки, которые содержат расширенные, неструктурированные полипептиды, как ожидается, обладают улучшенными фармакокинетическими свойствами, по сравнению с полипептидами с более короткими длинами.

Пример 42. Стабильность XTEN в сыворотке.

Гибридный белок, который содержит XTEN_AE864, слитый с N-концом GFP, инкубируют в плазме обезьяны и лизате почек крыс в течение до 7 дней при 37°C. Образцы отбирают в момент времени 0, День 1 и День 7 и анализируют с помощью SDS PAGE с последующим детектированием с использованием Вестерн-блоттинга и детектирования антителами против GFP, как проиллюстрировано на фиг. 20. Последовательность XTEN_AE864 демонстрирует незначительные признаки деградации через 7 дней в плазме. Несмотря на это, XTEN_AE864 быстро деградирует в лизате почек крыс за 3 дня. In vivo стабильность гибридного белка проверяют в образцах плазмы, при том, что GFPAE864 иммунопреципитируют и анализируют с помощью SDS PAGE, как описано выше. Образцы, которые берут до истечения 7 дней после инъекции, демонстрируют очень мало признаков деградации. Результаты демонстрируют устойчивость CFXTEN к деградации из-за протеаз в сыворотке; фактор повышения фармакокинетических свойств гибридного белка CFXTEN.

Пример 43. Возрастание растворимости и стабильности полезной нагрузки пептида с помощью связывая с XTEN.

Для того, чтобы оценить способность XTEN в повышении физико-химических свойств растворимости и стабильности, получают и оценивают гибридные белки глюкагона плюс XTEN более короткой длины. Испытуемые вещества получают в ТРИС-буферизированном физиологическом растворе при нейтральном pH и характеристику раствора Gcg-XTEN осуществляют с помощью обращенно-фазовой HPLC и гель-проникающей хроматографии для подтверждения того, что протеин был однородным и неагрегированным в растворе. Данные представлены в табл. 36. С целью сравнения, предел растворимости немодифицированного глюкагона в таком же буфере измеряют при 60 мкмоль (0,2 мг/мл), и результат показывает, что для всех длин добавляемого XTEN, достигают существенного повышения растворимости. Важно отметить, что в большинстве случаев глюкагон-гибридные белки XTEN получают для достижения целевых концентраций и не оценивают для определения максимальных пределов растворимости в случае данной конструкции. Несмотря на это, в случае глюкагона, связанного с AF-144 XTEN, определяют предел растворимости, что в итоге достигают 60-кратного повышения растворимости, по сравнению с глюкагоном, не связанным с XTEN. Кроме того, CFXTEN глюкагон-AF144 оценивают на стабильность, и было установлено, что является стабильной в жидкой композиции в течение по меньшей мере 6 месяцев в условиях охлаждения и в течение приблизительно одного месяца при 37°C (данные не приведены).

Данные обеспечивают вывод, что связывание короткомерных полипептидов XTEN с биологически активным протеином, таким как глюкагон, могут заметно повышать свойства растворимости протеина с помощью получаемого гибридного белка, а также придавать стабильности при больших концентрациях протеина.

Таблица 36

Растворимость конструкций глюкагон-XTEN

Исследуемый препарат	**Растворимость**
Глюкагон	60 мкМ
Глюкагон-Y36	>370 мкМ
Глюкагон-Y72	>293 мкМ
Глюкагон-AF108	>145 мкМ
Глюкагон-AF120	>160 мкМ
Глюкагон-Y144	>497 мкМ
Глюкагон-AE144	>467 мкМ
Глюкагон-AF144	>3600 мкМ
Глюкагон-Y288	>163 мкМ

Пример 44. Анализ последовательностей на вторичные структуры с помощью алгоритмов прогнозирования.

Аминокислотные последовательности могут оценивать на вторичную структуру посредством определенных компьютерных программ или алгоритмов, таких как широко известный алгоритм Chou-Fasman (Chou, P. Y., et al. (1974) Biochemistry, 13: 222-45) и Garnier-Osguthorpe-Robson, или способ "GOR" (Gamier J, Gibrat JF, Robson B. (1996). GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. Способы Enzymol 266:540-553). В случае данной последовательности, алгоритмы могут предсказать, существует ли или нет некоторая вторичная структура вообще, выраженная в целом и/или в проценте остатков последовательности, которые образуют, например, альфа-спирали или бета-листы, или процент остатков последовательности, который, как предполагают, приводит к образованию случайной

спирали.

Некоторые репрезентативные последовательности из "семейства" XTEN могут быть оценены с использованием двух способов на основе алгоритма в случае способов Chou-Fasman и GOR для оценки степени вторичной структуры в этих последовательностей. Способ Chou-Fasman обеспечен William R. Pearson и University of Virginia, на интернет-сайте "Biosupport", URL, расположенном в интернете на fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=misc1 по состоянию на 19 июня 2009. Способ GOR обеспечен Pole Informatique Lyonnais на интернет-сайте Network Protein Sequence Analysis, URL, расположенном в интернете на npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gor4.pl, по состоянию на 19 июня 2008.

В качестве первого этапа анализов, уникальную последовательность XTEN анализируют с помощью двух алгоритмов. Композиция AE864 представляет собой XTEN с 864 аминокислотными остатками, созданными из нескольких копий четырех 12-аминокислотных мотивов последовательностей, состоящих из аминокислот G, S, T, E, P, и A. Мотивы последовательности характеризуются тем, что существует ограниченная повторяемость в пределах мотивов, а в пределах последовательности вообще, тем, что последовательность любых двух последовательных аминокислот не повторяется более двух раз в любом 12-аминокислотном мотиве, и что три смежные аминокислоты непроцессированного XTEN не являются идентичными. Постепенно более длинные участки последовательности AF 864 с N-конца анализируют с помощью алгоритмов Chou-Fasman и GOR (последний требует минимальную длину 17 аминокислот). Последовательности анализируют с помощью введения последовательностей формата FASTA в инструменты прогнозирования и выполняя анализ. Результаты анализа представлены в табл. 37.

Результаты указывают, что, с помощью расчетов Chou-Fasman, короткий XTEN семейств AE и AG, до по меньшей мере 288 аминокислотных остатков, не имеет альфа-спиралей или бета-листов, но величины прогнозируемого процента случайной спирали по алгоритму GOR может изменяться от 78 до 99%. С возрастанием длин XTEN из от 504 до более 1300 остатков, XTEN, проанализированный с помощью алгоритма Chou-Fasman, имеет прогнозируемые проценты альфа-спиралей или бета-листов от 0 до около 2%, в то время как расчетные проценты случайной спирали увеличены до от 94 до 99%. XTEN с альфа-спиралями или бета-листами представляют собой последовательности с одним или несколькими случаями трех смежных остатков серина, что приводит к прогнозируемому образованию бета-листа. Несмотря на это, даже эти последовательности все еще имеют приблизительно 99% образования случайной спирали.

Данные, которые обеспечивают в данном документе, предполагает, что 1) XTEN, созданный из нескольких мотивов последовательности G, S, T, E, P, и A, которые имеют ограниченную повторяемость, как в случае смежных аминокислот, которые, согласно прогнозам, имеют очень низкие количества альфа-спиралей и бета-листов; 2) возрастание длины XTEN заметно не повышает вероятность образования альфа-спирали или бета-листа; и 3) постепенное возрастание длины последовательности XTEN с помощью добавления неповторяющийся 12-меров, состоящих из аминокислот G, S, T, E, P и A, приводит к увеличенному проценту образования случайной спирали. Результаты дополнительно указывают, что последовательности XTEN, определенные в данном документе (которые содержат например, XTEN, созданный из мотивов последовательности G, S, T, E, P, и A) имеют ограниченную повторяемость (в том числе не более чем с двумя одинаковыми смежными аминокислотами в одном мотиве), как ожидается, имеют очень ограниченный вторичную структуру. Любой порядок или комбинация мотивов последовательности из табл. 3 могут быть использованы для создания полипептида XTEN, что приведет к последовательности XTEN, которая является по существу лишенной вторичной структуры, при том, что три смежных серины не являются предпочтительными. Неблагоприятное свойство трех смежных рядом, несмотря на это, может быть смягчено с помощью возрастания длины XTEN. Подобные последовательности, как предполагается, имеют характеристики, описанные в вариантах осуществления CFXTEN, раскрытых в данном документе.

Таблица 37

Прогнозные расчеты последовательностей полипептида CHOU-FASMAN и GOR

НАЗВАНИЕ ПОСЛ.	SEQ ID NO:	№ остатков	Расчет Chou-Fasman	Расчет GOR
AE36: LCW0402_002	1489	36	Общее количество остатков: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	94,44%
AE36: LCW0402_003	1490	36	Общее количество остатков: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	94,44%
AG36: LCW0404_001	1491	36	Общее количество остатков: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	77,78%
AG36: LCW0404_003	1492	36	Общее количество остатков: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	83,33 %
AE42_1	1493	42	Общее количество остатков: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	90,48%
AE42_1	1494	42	Общее количество остатков: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	90,48%
AG42_1	1495	42	Общее количество остатков: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	88,10%
AG42_2	1496	42	Общее количество остатков: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	88,10%
AE144	1497	144	Общее количество остатков: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	98,61%
AG144_1	1498	144	Общее количество остатков: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	91,67%
AE288	1499	288	Общее количество остатков: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	99,31%
AG288_2	1500	288	Общее количество остатков: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	92,71

AF504	1501	504	Общее количество остатков: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	94,44%
AD 576	1502	576	Общее количество остатков: H: 7 E: 0 процент: H: 1,2 E: 0,0	99,65%
AE576	1503	576	Общее количество остатков: H: 2 E: 0 процент: H: 0,4 E: 0,0	99,65%
AG576	1504	576	Общее количество остатков: H: 0 E: 3 процент: H: 0,4 E: 0,5	99,31%
AF540	1505	540	Общее количество остатков: H: 2 E: 0 процент: H: 0,4 E: 0,0	99,65
AD836	1506	836	Общее количество остатков: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	98,44%
AE864	1507	864	Общее количество остатков: H: 2 E: 3 процент: H: 0,2 E: 0,4	99,77%
AF864	1508	875	Общее количество остатков: H: 2 E: 0 процент: H: 0,2 E: 0,0	95,20%
AG864	1509	864	Общее количество остатков: H: 0 E: 0 процент: H: 0,0 E: 0,0	94,91%
AM875	1510	875	Общее количество остатков: H: 7 E: 3 процент: H: 0,8 E: 0,3	98,63%
AM1318	1511	1318	Общее количество остатков: H: 7 E: 0 процент: H: 0,7 E: 0,0	99,17%
AM923	1512	924	Общее количество остатков: H: 4 E: 3 процент: H: 0,4 E: 0,3	98,70%
AE912	1513	913	Общее количество остатков: H: 8 E: 3 процент: H: 0,9 E: 0,3	99,45%
BC 864	1514		Общее количество остатков: H: 0 E: 0 процент: H: 0 E: 0	99,77%

H: альфа-спираль E: бета-лист.

Пример 45. Анализ полипептидных последовательностей на повторяемость.

В этом примере, различные полипептиды, которые содержат некоторые последовательности XTEN, оценивают на повторяемость в аминокислотной последовательности. Аминокислотные последовательности полипептида могут оценивать на повторяемость с помощью количественной оценки количества случаев, когда более короткая подпоследовательность встречается в пределах всего полипептида. Например, полипептид с длиной в 200 аминокислотных остатка имеет в общем 165 перекрывающихся 36-аминокислотных "блоков" (или "36-меров") и 198 3-мерных "подпоследовательностей", но количество уникальных 3-мерных подпоследовательностей будет зависеть от количества повторяемостей в пределах последовательности. В случае анализов, различные полипептидные последовательности оценивают на повторяемость с помощью определения количества подпоследовательностей, полученных с применением следующего уравнения:

$$\text{Количество подпоследовательностей} = \frac{\sum_{i=1}^{m} \text{Кол-во}_i}{m} \qquad \text{I}$$

где m = (длина полипептид в аминокислотах) - (длина подпоследовательности в аминокислотах) + 1; и Кол-во_i = совокупное количество совпадений каждой уникальной подпоследовательности в пределах последовательности.

В анализах данного примера, количество подпоследовательностей в случае полипептидов из табл. 38 определяют с использованием предыдущего уравнения в компьютерной программе с использованием алгоритма, проиллюстрированного на фиг. 27, при том, что длину подпоследовательностей устанавливают в 3 аминокислоты. Получаемое количество подпоследовательностей представляет собой отражение

степени повторяемости в пределах полипептид.

Результаты, представленные в табл. 38, указывают, что неструктурированные полипептиды, состоящие из 2 или 3 типов аминокислот, имеют высокие результаты подпоследовательности, в то время как состоящие из 12-аминокислотных мотивов из шести аминокислот G, S, T, E, P, и A с низкой степенью внутренней повторяемости, имеют результаты подпоследовательности менее 10, а в отдельных случаях, менее 5. Например, последовательность L288 имеет два типа аминокислот и имеет короткие, часто повторяющиеся последовательности, что приводит к количеству подпоследовательностей равному 50,0. Полипептид J288 имеет три типа аминокислот, но также имеет короткие, повторяющиеся последовательности, что приводит к количеству подпоследовательностей равному 33,3. Y576 также имеет три типа аминокислот, но созданных не из внутренних повторений, отраженных в количестве подпоследовательностей равном 15,7 для первых 200 аминокислот. W576 состоит из четырех типов аминокислот, но имеет большую степень внутренней повторяемости, например, "GGSG" (SEQ ID NO: 1694)", что приводит к количеству подпоследовательностей равному 23,4. AD576 состоит из четырех типов 12-аминокислотных мотивов, каждый из которых состоит из четырех типов аминокислот. Ввиду низкой степени внутренней повторяемости отдельных мотивов, в целом количество подпоследовательностей для первых 200 аминокислот составляет 13,6. В противоположность этому, XTEN состоит из четырех мотивов, содержащих шесть типов аминокислот, каждый из которых с низкой степенью внутренней повторяемости, имеет более низкие результаты подпоследовательности; т.е. AE864 (6,1), AF864 (7,5) и AM875 (4,5), в то время как XTEN, состоящий из четырех мотивов, которые содержат пять типов аминокислот, является промежуточным; т.е. AE864, с результатом 7,2.

Выводы: результаты указывают, что комбинирование 12-аминокислотных подмотивов последовательности, каждый из которых состоит из от четырех до шести типов аминокислот, которые являются неповторяющимися, в более длинном полипептиде XTEN, в целом, приводят к последовательности, которая является по существу неповторяющейся, как указывается общей оценкой результатов подпоследовательности менее 10 и, во многих случаях, менее 5. Это не смотря на тот факт, что каждый мотив подпоследовательности могут использовать несколько раз по всей последовательности. В противоположность этому, полимеры, созданные из более малых количеств типов аминокислот, приводят к большим результатам подпоследовательности, с полипептидами, которые состоят из двух типов аминокислот, имеют более высокие результаты, чем те, которые состоят из трех типов аминокислот.

Таблица 38

Расчеты результата подпоследовательностей полипептидных последовательностей

Название посл.	SEQ ID NO:	Результат
J288	1515	33,3
K288	1516	46,9
L288	1517	50,0
Y288	1518	26,8
Q576	1519	18,5
U576	1520	18,1
W576	1521	23,4
Y576	1522	15,7
AE288	1523	6,0
AG288_1	1524	6,9
AD576	1525	13,6
AE576	1526	6,1
AF540	1527	8,8
AF504	1528	7,0
AE864	1529	6,1
AF864	1530	7,5
AG864	1531	7,2
AG868	1532	7,5
AM875	1533	4,5
AE912	1534	4,5
AM923	1535	4,5
AM1296	1536	4,5

Пример 46. Расчет результатов TEPITOPE.

Результаты TEPITOPE для 9-мерной пептидной последовательности может быть рассчитан с помощью сложения потенциалов кармана, как описано Sturniolo [Sturniolo, T., et al. (1999) Nat Biotechnol, 17: 555]. В настоящем примере, отдельные результаты TEPITOPE рассчитывают для отдельных аллелей

HLA. Табл. 39 иллюстрирует в качестве примера потенциалов кармана в случае HLA0101B, который часто наблюдается у населения Кавказа. Для расчета результата TEPITOPE пептида с последовательностью P1-P2-P3-P4-P5-P6-P7-P8-P9, складывают соответствующие отдельные потенциалы кармана из табл. 39. Результат HLA0101B для 9-мерного пептида с последовательностью FDKLPRTSG (SEQ ID NO: 1695) представляет собой сумму 0, -1,3, 0, 0,9, 0, -1,8, 0,09, 0, 0.

Для того, чтобы оценить результаты TEPITOPE в случае длинных пептидов, можно повторить способ для всех 9-мерных подпоследовательностей последовательностей. Этот способ может быть повторен для протеинов, кодируемых другими аллелями HLA. Табл. 40-43 дают потенциалы кармана в случае продуктов протеина аллелей HLA, которые часто наблюдается у населения Кавказа.

Результаты TEPITOPE, рассчитанные с помощью этого способа изменяются в диапазоне от около -10 до +10. Несмотря на это, 9-мерные пептиды, которые не имеют гидрофобной аминокислоты (FKLMVWY (SEQ ID NO: 1696)) в положении P1 рассчитывают результаты TEPITOPE в пределах от -1009 до -989. Эта величина является биологически бессмысленной и отражает тот факт, что гидрофобная аминокислота служит в качестве якорного остатка для связывания HLA и пептиды испытывают недостаток гидрофобного остатка в P1, считаются не связующими с HLA. Поскольку большинство последовательностей XTEN не имеют гидрофобные остатки, все комбинации 9-мерных подпоследовательностей будут иметь результаты TEPITOPE в диапазоне от -1009 до -989. Этот способ подтверждает, что полипептиды XTEN могут иметь немного или вообще не иметь прогнозируемые Т-клеточные эпитопы.

Таблица 39

Потенциал кармана в случае аллели HLA0101B

Аминокислота	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1,3	-1,3	-2,4	-	-2,7	-2	-	-1,9
E	-999	0,1	-1,2	-0,4	-	-2,4	-0,6	-	-1,9
F	0	0,8	0,8	0,08	-	-2,1	0,3	-	-0,4
G	-999	0,5	0,2	-0,7	-	-0,3	-1,1	-	-0,8
H	-999	0,8	0,2	-0,7	-	-2,2	0,1	-	-1,1
I	-1	1,1	1,5	0,5	-	-1,9	0,6	-	0,7
K	-999	1,1	0	-2,1	-	-2	-0,2	-	-1,7
L	-1	1	1	0,9	-	-2	0,3	-	0,5
M	-1	1,1	1,4	0,8	-	-1,8	0,09	-	0,08
N	-999	0,8	0,5	0,04	-	-1,1	0,1	-	-1,2
P	-999	-0,5	0,3	-1,9	-	-0,2	0,07	-	-1,1
Q	-999	1,2	0	0,1	-	-1,8	0,2	-	-1,6
R	-999	2,2	0,7	-2,1	-	-1,8	0,09	-	-1
S	-999	-0,3	0,2	-0,7	-	-0,6	-0,2	-	-0,3
T	-999	0	0	-1	-	-1,2	0,09	-	-0,2
V	-1	2,1	0,5	-0,1	-	-1,1	0,7	-	0,3
W	0	-0,1	0	-1,8	-	-2,4	-0,1	-	-1,4
Y	0	0,9	0,8	-1,1	-	-2	0,5	-	-0,9

Таблица 40

Потенциал кармана в случае аллели HLA0301B

Аминокислота	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1,3	-1,3	2,3	-	-2,4	-0,6	-	-0,6
E	-999	0,1	-1,2	-1	-	-1,4	-0,2	-	-0,3
F	-1	0,8	0,8	-1	-	-1,4	0,5	-	0,9
G	-999	0,5	0,2	0,5	-	-0,7	0,1	-	0,4
H	-999	0,8	0,2	0	-	-0,1	-0,8	-	-0,5
I	0	1,1	1,5	0,5	-	0,7	0,4	-	0,6
K	-999	1,1	0	-1	-	1,3	-0,9	-	-0,2
L	0	1	1	0	-	0,2	0,2	-	-0
M	0	1,1	1,4	0	-	-0,9	1,1	-	1,1
N	-999	0,8	0,5	0,2	-	-0,6	-0,1	-	-0,6
P	-999	-0,5	0,3	-1	-	0,5	0,7	-	-0,3
Q	-999	1,2	0	0	-	-0,3	-0,1	-	-0,2
R	-999	2,2	0,7	-1	-	1	-0,9	-	0,5
S	-999	-0,3	0,2	0,7	-	-0,1	0,07	-	1,1
T	-999	0	0	-1	-	0,8	-0,1	-	-0,5
V	0	2,1	0,5	0	-	1,2	0,2	-	0,3
W	-1	-0,1	0	-1	-	-1,4	-0,6	-	-1
Y	-1	0,9	0,8	-1	-	-1,4	-0,1	-	0,3

Таблица 41

Потенциал кармана в случае аллели HLA0401B

Аминокислота	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1,3	-1,3	1,4	-	-1,1	-0,3	-	-1,7
E	-999	0,1	-1,2	1,5	-	-2,4	0,2	-	-1,7
F	0	0,8	0,8	-0,9	-	-1,1	-1	-	-1
G	-999	0,5	0,2	-1,6	-	-1,5	-1,3	-	-1
H	-999	0,8	0,2	1,1	-	-1,4	0	-	0,08
I	-1	1,1	1,5	0,8	-	-0,1	0,08	-	-0,3
K	-999	1,1	0	-1,7	-	-2,4	-0,3	-	-0,3
L	-1	1	1	0,8	-	-1,1	0,7	-	-1
M	-1	1,1	1,4	0,9	-	-1,1	0,8	-	-0,4
N	-999	0,8	0,5	0,9	-	1,3	0,6	-	-1,4
P	-999	-0,5	0,3	-1,6	-	0	-0,7	-	-1,3
Q	-999	1,2	0	0,8	-	-1,5	0	-	0,5
R	-999	2,2	0,7	-1,9	-	-2,4	-1,2	-	-1
S	-999	-0,3	0,2	0,8	-	1	-0,2	-	0,7
T	-999	0	0	0,7	-	1,9	-0,1	-	-1,2
V	-1	2,1	0,5	-0,9	-	0,9	0,08	-	-0,7
W	0	-0,1	0	-1,2	-	-1	-1,4	-	-1
Y	0	0,9	0,8	-1,6	-	-1,5	-1,2	-	-1

Таблица 42

Потенциал кармана в случае аллели HLA0701B

Аминокислота	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1,3	-1,3	-1,6	-	-2,5	-1,3	-	-1,2
E	-999	0,1	-1,2	-1,4	-	-2,5	0,9	-	-0,3
F	0	0,8	0,8	0,2	-	-0,8	2,1	-	2,1
G	-999	0,5	0,2	-1,1	-	-0,6	0	-	-0,6
H	-999	0,8	0,2	0,1	-	-0,8	0,9	-	-0,2
I	-1	1,1	1,5	1,1	-	-0,5	2,4	-	3,4
K	-999	1,1	0	-1,3	-	-1,1	0,5	-	-1,1
L	-1	1	1	-0,8	-	-0,9	2,2	-	3,4
M	-1	1,1	1,4	-0,4	-	-0,8	1,8	-	2
N	-999	0,8	0,5	-1,1	-	-0,6	1,4	-	-0,5
P	-999	-0,5	0,3	-1,2	-	-0,5	-0,2	-	-0,6
Q	-999	1,2	0	-1,5	-	-1,1	1,1	-	-0,9
R	-999	2,2	0,7	-1,1	-	-1,1	0,7	-	-0,8
S	-999	-0,3	0,2	1,5	-	0,6	0,4	-	-0,3
T	-999	0	0	1,4	-	-0,1	0,9	-	0,4
V	-1	2,1	0,5	0,9	-	0,1	1,6	-	2
W	0	-0,1	0	-1,1	-	-0,9	1,4	-	0,8
Y	0	0,9	0,8	-0,9	-	-1	1,7	-	1,1

Таблица 43

Потенциал кармана в случае аллели HLA1501B

Аминокислота	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1,3	-1,3	-0,4	-	-0,4	-0,7	-	-1,9
E	-999	0,1	-1,2	-0,6	-	-1	-0,7	-	-1,9
F	-1	0,8	0,8	2,4	-	-0,3	1,4	-	-0,4
G	-999	0,5	0,2	0	-	0,5	0	-	-0,8
H	-999	0,8	0,2	1,1	-	-0,5	0,6	-	-1,1
I	0	1,1	1,5	0,6	-	0,05	1,5	-	0,7
K	-999	1,1	0	-0,7	-	-0,3	-0,3	-	-1,7
L	0	1	1	0,5	-	0,2	1,9	-	0,5
M	0	1,1	1,4	1	-	0,1	1,7	-	0,08
N	-999	0,8	0,5	-0,2	-	0,7	0,7	-	-1,2
P	-999	-0,5	0,3	-0,3	-	-0,2	0,3	-	-1,1
Q	-999	1,2	0	-0,8	-	-0,8	-0,3	-	-1,6
R	-999	2,2	0,7	0,2	-	1	-0,5	-	-1
S	-999	-0,3	0,2	-0,3	-	0,6	0,3	-	-0,3
T	-999	0	0	-0,3	-	-0	0,2	-	-0,2
V	0	2,1	0,5	0,2	-	-0,3	0,3	-	0,3
W	-1	-0,1	0	0,4	-	-0,4	0,6	-	-1,4
Y	-1	0,9	0,8	2,5	-	0,4	0,7	-	-0,9

Пример 46. Оценка вставки XTEN в петлю, доступную для встраивания.

Вставка AE42-4 XTEN.

Построение и экспрессия FVIII со вставками AE42 XTEN описывают в примере 17 и 24. Таким образом, когда остаток X обозначает сайт вставки, а остаток Z обозначает следующий остаток в природной полипептидной последовательности FVIII, полипептид, получаемый из вставки AE42 XTEN, может содержать последовательность:

X-GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS-Z (SEQ ID NO: 1697)

В случае вставки AE42 XTEN выбирают 16 различных сайтов в последовательностях FVIII, и они образуют Серию 1. Дополнительные 21 сайта, выбранные для вставки AE42 XTEN, образуют Серию 2. В совокупности, сайты Серии 1 и Серии 2 представляют 12 сайтов в домене A1, 7 сайтов в домене A2, 10 сайтов в домене A3, 4 сайтов в домене C1 и 3 сайта в домене C2. Локализации сайтов Серии 1 и 2 в 3-D структуре FVIII иллюстрируют на фиг. 32.

Расположение этих инсерционных сайтов серии 1 и серии 2 приводят к 37 конструкциям, обозначенным pSD0001- pSD0004, pSD0009- pSD0012, pSD0023- pSD0032, pSD0034- pSD0063 [вышеизложенные диапазоны также содержат все промежуточные номера], последовательности которого приведены в табл. 21 и сайты вставок, которые приведены в табл. 23.

Анализы in vitro.

Для оценки переносимости FVIII к вставке AE42-4 XTEN, активность FVIII в образцах культуральной среды из культур клеток FVIII-XTEN анализируют с использованием хромогенного анализа FVIII. Уровни экспрессии антигена анализируют с помощью ELISA FVIII-HC (тяжелая цепь FVIII) и FVIII-LC (легкая цепь FVIII).

Измерение активности FVIII с помощью хромогенного анализа.

Активность FVIII измеряют с использованием набор COATEST® SP FVIII от DiaPharma (lot# N089019) и все инкубирования выполняют при 37°C в пластинчатом нагревателе при встряхивании. Сборы культуры клеток из среды временной трансфекции вариантов AE42-4 FVIII-XTEN из 6-луночных планшетов разбавляют до нужного диапазона активности FVIII с использованием буфера 1× FVIII COATEST®. Стандарты FVIII получают в буфере 1× FVIII COATEST®, который содержит мнимую среду трансфекции с соответствующей концентрацией культуральной среды в качестве испытуемого образца. Диапазон стандарта рекомбинантного фактора VIII (rFVIII) составляет от 100 мМЕ/мл до 0,78 мМЕ/мл. Стандарты, разбавленные образцы культуры клеток и добавляют объединенный контроль для анализа плазмы нормального человека в 96-луночные планшеты Immulon® 2HB в двух экземплярах (25 мкл/лунка).

Свежеприготовленная смесь IXa/FX/фосфолипид (50 мкл), 25 мкл 25 мМ $CaCl_2$, и 50 мкл субстрата FXa добавляют последовательно к каждой лунке, с 5 минутами инкубирования между каждым добавлением. После инкубирования с субстратом, 25 мкл 20% уксусной кислоты добавляют для остановки цветной реакции, а поглощение при 405 нм измеряют с помощью инструмента SpectraMAX® plus (Molecular Devices).

Анализ данных осуществляют с использованием программного обеспечения SoftMax Pro (вариант 5.2). Lowest Level of Quantification (LLOQ) составляет 39 мМЕ/мл. Результаты представлены в табл. 22.

Измерение экспрессии с помощью FVIII-HC и FVIII-LC ELISA.

Экспрессию вариантов количественно оценивают с использованием ELISA. Уровни экспрессии антигена FVIII конструкций DNA, соответствующих вставкам XTEN в доменах A1 и A2 FVIII, анализируют с помощью ELISA FVIII-LC. Уровни экспрессии антигена FVIII конструкций DNA, соответствующих вставкам XTEN в доменах A3, C1 и C2 FVIII, анализируют с помощью ELISA FVIII-HC. Результаты представлены в табл. 22.

Антигены FVIII-XTEN в среде для выращивания культур клеток после сбора захватывают с помощью антител GMA011 (Green Mountain Antibodies) в случае FVIII-LC ELISA) или с помощью антител GMA016 (Green Mountain Antibodies) в случае FVIII-HC ELISA. 96-луночные планшеты Immulon® 2HB покрывают 100 мкл/лунка анти-FVIII антитела (2 мкг/мл) с помощью инкубирование при 4°C в течение ночи. Планшеты затем промывают четыре раза физиологическим раствором Phosphate Buffer с Tween-20 (PBST) и блокируют блокирующим буфером (PBST с 10% термоинактивированной лошадиной сыворотки) в течение 1 ч при комнатной температуре.

Сборы культуры клеток из среды временной трансфекции вариантов FVIII-XTEN из 6-луночного планшета разбавляют до нужного диапазона антигена FVIII с использованием 1× блокирующего буфера. Стандарты FVIII получают в блокирующем буфере 1× FVIII, который содержит мнимую среду для трансфекции с соответствующей концентрацией среды в качестве образцов для тестирования. Диапазон стандарта rFVIII составляет от 50 нг/мл до 0,39 нг/мл.

Стандарты, разбавленные образцами культуры клеток, и объединенный контроль для анализа плазмы нормального человека добавляют в 96-луночные планшеты Immulon® 2HB в двух экземплярах (100 мкл/лунка) и инкубируют при 37°C в течение 2 ч. Следующие четыре раза промывают с PBST, в каждую лунку и планшеты добавляют 100 мкл анти-hFVIII антитела HRP-овцы (Affinity Biologicals, F8C-EIC-D), инкубируют в течение 1 ч при 37°C. После еще четырех промываний PBST, к каждой лунке добавляют 100 мкл TMB Super Sensitive Substrate (BioFX), после чего следует 5-10 мин формирования цвета. Для остановки цветной реакции, к каждой лунке добавляют 50 мкл H_2SO_4, а поглощение при 450 нмоль измеряют прибором SpectraMAX plus (Molecular Devices).

Анализ данных осуществляют с использованием программного обеспечения SoftMax Pro (вариант 5.4). Lowest Level of Quantification(LLOQ) составляет 0,0039 мкг/мл. Результаты представлены в табл. 22.

Пермиссивные сайты, в который последовательности XTEN вводят без устранение прокоагулянтной активности рекомбинантного протеина или способности рекомбинантного протеина экспрессироваться в клетке-хозяине, кластеризуют в пределах петли в каждом из трех доменов FVIII. Фиг. 36 иллюстрирует расположение инсерционных сайтов в рекомбинантных протеинах FVIII, которые демонстрируют активность FVIII в доменах A1, A2 и A3. Фиг. 33 иллюстрирует структурное представление, изображающее расположение инсерционных сайтов в рекомбинантных протеинах FVIII, которые демонстрируют активность FVIII.

Пермиссивный сайты сосредоточены в высоко конформационно-лабильных наружных петлях, подверженных действию растворитель (петля XTEN, доступная для встраивания). Петли домена A1 локализованы в области, приблизительно соответствующей аминокислотным положениям от 15 до 45 и от 201

до 232, соответственно, в последовательностях FVIII зрелого человека (фиг. 30). Петли домена A2 локализованы в области, приблизительно соответствующей аминокислотным положениям от 395 до 421 и от 577 до 635, соответственно, в последовательностях FVIII зрелого человека (фиг. 30). Петли домен A3 локализованы в области, приблизительно соответствующей аминокислотным положениям от 1705 до 1732 и от 1884 до 1917, соответственно, в последовательностях FVIII зрелого человека (фиг. 30). Фиг. 37A и 37B иллюстрируют расположение в трехмерной структуре FVIII петель XTEN, доступных для встраивания, по отношению к элементам вторичной структуры.

Пример 47. CFXTEN со вставками XTEN, которые имеют 144 аминокислот.

Анализ предварительных данных, представленных выше (пример 46), предположил существование определенных регионов в пределах линейных полипептидных последовательностей и 3-D структур доменов A FVIII, где может разместиться вставка последовательности XTEN. Чтобы проверить эту гипотезу и далее определить границы предполагаемых районов, где может разместиться вставка последовательностей XTEN без потери активности FVIII, выбирают 23 дополнительные инсерционные сайты, не представленные в Серии либо 1, либо 2, и обозначают Серией 3.

Конструкции Серии 3 получают с помощью вставки остатка 144 полипептида AE XTEN, который содержит аминокислотные остатки Gly (G), Ala (A), Pro (P), Ser (S), Thr (T) и Glu (E) или остатка 144 полипептида AG XTEN, который содержит аминокислотные остатки Gly (G), Ala (A), Pro (P), Ser (S) и Thr (T). Получают пять различных вариантов остатка 144 полипептида AE и обозначают XTEN-AE144-2A, XTEN-AE144-3B, XTEN-AE144-4A, XTEN-AE144-5A, XTEN-AE144-6B. Аминокислотные последовательности являются такими, как указано в табл. 4. Получают пять различных вариантов остатка 144 полипептида и обозначают XTEN-AG144-1, XTEN-AG144-A, XTEN-AG144-B, XTEN-AG144-C, и XTEN-AG144-F. Аминокислотные последовательности являются такими, как указано в табл. 4.

Остаток 144 XTEN, кодирующего последовательность DNA, вводят с помощью химического синтеза сегментов DNA (DNA 2.0, Редвуд Сити, CA) охватывающих ближайшие уникальные сайты рестрикции внутри основного вектора по обе стороны от места вставки.

Последовательности DNA, соответствующие 144 пептидам XTEN, вводят так, что получаемая конструкция DNA будет кодировать протеин FVIII, в котором последовательность XTEN из 144 белков вводят непосредственно после остатка, указанного в выборе сайта, и окруженного по бокам сайтами AscI и XhoI.

В дополнение к этим сайтам, сайты из Серии 1 и 2, при том, что вставка полипептида AE42 XTEN не отменяет прокоагулянтную активность FVIII, изменяют с помощью вырезания полипептида AE42, кодирующего сегмент DNA с рестрикционными ферментами AscI и XhoI, и введения AE144 XTEN и AG144XTEN, кодирующих последовательности в таких же сайтах. Расположение этих Серии 1, Серии 2 и Серии инсерционных сайтов суммируют в табл. III. Фиг. 34 представляет собой структурное представление FVIII, которое демонстрирует расположение инсерционных сайтов XTEN 144.

Создают, в общей сложности, 48 конструкций со 144 вставками XTEN. Конструкции представляют собой последовательности pSD0001-pSD0004, pSD0009- pSD0012, pSD0023-63 [приведенные выше диапазоны также содержат все промежуточные номера], которые приведены в табл. 21 и инсерционные сайты которых детально описаны в табл. 22.

Экспрессия 144 вариантов FVIII-XTEN.

Варианты FVIII с 144 вставками XTEN трансфектируют в клетки HEK293F (Invitrogen, Карлсбад, CA) с использованием полиэтиленимина (PEI, Polysciences Inc. Уоррингтон, PA) или вещества для трансфекции Lipofectamine (Invitrogen, Карлсбад, CA). Временно трансфицированные клетки выращивают в среде 293 Free Style или смеси сред 293 Free Style и CD Opti CHO (Invitrogen, Карлсбад, CA). Среду для выращивания культур клеток собирают через 3-5 дней после трансфекции и анализируют на экспрессию FVIII с помощью хромогенного анализа активности FVIII и проводят ELISA FVIII, как описано в данном документе.

Среда для выращивания культур клеток из временной трансфекции концентрируют в 10 раз в центрифужной колонке Centricon® (отсекают 100 кДа). Концентрированный материал затем быстро замораживают и хранят при -80°C для дальнейшего анализа in vitro и in vivo исследований PK.

Анализы in vitro.

Для оценки переносимости FVIII к вставкам, активность FVIII в образцах культуральной среды из культур клеток анализируют с использованием хромогенного анализа FVIII. Уровни экспрессии антигена анализируют с помощью FVIII-HC (тяжелая цепь FVIII) и FVIII-LC (легкая цепь FVIII) ELISA.

Измерение активности FVIII с помощью хромогенного анализа и измерения экспрессии с помощью FVIII-HC и FVIII-LC ELISA.

Способы хромогенного анализа и анализ ELISA осуществляют как описано. Полученные результаты приведены в табл. 23.

Пермиссивные сайты, в которые последовательности XTEN вводят без устранения прокоагулянтной активности рекомбинантного протеина или способности рекомбинантных протеинов экспрессироваться в клетке-хозяине, расположены в пределах петли в каждом из трех доменов FVIII. Такие же области петли XTEN, доступной для встраивания, допускают более короткие последовательности XTEN,

при введении проявляют допущение вставки более продолжительных последовательностей XTEN. Фиг. 38 иллюстрирует расположение инсерционных сайтов 144 XTEN в рекомбинантных протеинах FVIII, которые демонстрируют активность FVIII в доменах A1, A2 и A3. Фиг. 35 иллюстрирует структурное представление изображающее расположение инсерционных сайтов в рекомбинантных протеинах FVIII, которые демонстрируют активность FVIII.

Эти наблюдения, указывают, что две области в пределах каждого из доменов FVIII в состоянии вместить вставку последовательностей XTEN без потери активности кофактора FVIII. Структурное изображение этих так называемых петель XTEN, доступных для встраивания, (фиг. 40 и 41) демонстрирует, что они занимают структурно аналогичные положения в каждом из доменов и показаны с одной стороны молекулы FVIII. Определенные петли XTEN, доступные для встраивания, соответствуют высоко конформационно-лабильным петлям, расположенным между бета-тяжами в трехмерных структурах доменов A1, A2 и A3, как показано в фиг. 37A и 37B.

In vivo оценку вставки 144 XTEN на увеличение времени полужизни FVIII, определенное с помощью фармакокинетических свойств, описывают в примере 32.

Пример 48. Облегчение или повышение экспрессии FVIII с помощью вставки последовательностей XTEN в пределах кислой пептидной области a3 FVIII.

Адгезивные клетки HEK293 трансфицируют (как описано в примере 24) с конструкциями FVIII-XTEN DNA, в которых кодирующая последовательность фактора VIII без B-доменов содержит от 2 до 4 вставок XTEN из 144 аминокислотных остатков каждый, композиции и расположение вставок, как указано в табл. 44, ниже. Через 5 дней после трансфекции, супернатанты культуры клеток анализируют на активность FVIII с помощью хромогенного анализа (как описано в примере 25). Результаты показаны в табл. 44.

Таблица 44

Уровни экспрессии активности FVIII вариантами CFXTEN, которые содержат XTEN в положении 1720 и одной, двумя или тремя дополнительными вставками XTEN

Название конструкции	Домен, положение и тип вставки XTEN					Активность (мМЕ/мл)
	A1	A2	a3	A3-1	A3-2	
LSD0040.002	26 AG144			1720 AG144		175
LSD0041.008		403 AE144		1720 AG144		279
LSD0045.002			1656 AG144	1720 AG144		2598
PSD080.002	26 AG144		1656 AG144	1720 AG144		1081
PSD083.001		403 AE144	1656 AG144	1720 AG144		789
PSD082.001	26 AG144			1720 AG144	1900 AE144	<LLOQ
PSD090.003	26 AG144		1656 AG144	1720 AG144	1900 AE144	316

С целью сравнения, все конструкции FVIII-XTEN имеют вставку AG144 XTEN в положении аминокислоты 1720 (нумерация относительно непроцессированного фактора VIII) в домене A3. Уровни экспрессии вариантов FVIII-XTEN определяют с помощью хромогенного анализа и выражают в единицах мМЕ/мл. Конструкции с уникальной дополнительной вставкой XTEN в либо положении 26 в домене A1 (LSD0040.002), либо в положении 403 в домене A2 (LSD0041.008), дает уровни экспрессии 175 и 279 мМЕ/мл соответственно. В противоположность этому, конструкция с уникальной дополнительной вставкой XTEN в положении 1656 в пределах кислого пептида a3 дает уровень экспрессии 2598 мМЕ/мл, демонстрируя повышение уровня экспрессии в случае конструкции вставки a3 XTEN по отношению к конструкциям вставки A1 и A2. Кроме того, по сравнению с конструкцией FVIII-XTEN со вставками XTEN в положениях 26 в домене A1 и 1720 в домене A3 (LSD0040.002), конструкция с дополнительной вставкой XTEN в положении 1656 в пределах кислой пептидной области a3 (PSD080.002) дает значительно большую экспрессию (175 и 1081 мМЕ/мл, соответственно). В соответствии с этими результатами, конструкция со вставками XTEN в положениях 403 в домене A2 и 1720 в домене A3 (LSD0041.008) дает уровень экспрессии 279 мМЕ/мл, в то время как дополнительная вставка XTEN в положении 1656 в пределах кислой пептидной области a3 (PSD083.001) приводит к повышению уровня экспрессии до 789 мМЕ/мл. Наконец, конструкция FVIII-XTEN со вставкой XTEN в положении 26 в домене A1 и двумя вставками XTEN в положениях 1720 и 1900 в домене A3 (PSD082.001) не дают активность выше нижнего предела количественного определения. Несмотря на это, конструкция FVIII-XTEN с дополнительной вставкой XTEN в пределах кислой пептидной области a3 (PSD090.003) приводит к обнаруживаемой активности, демонстрируя то, что включение последовательностей XTEN в домене A3 может привести к восстановлению экспрессии (как измерено с помощью активность) в конструкциях FVIII-XTEN, которые

являются, в других случаях, экспрессируют на уровнях ниже нижнего предела количественного определения. В условиях эксперимента, результаты обеспечивают вывод, что вставка XTEN в положении 1656 и, с помощью увеличения, в пределах области a3, приводит к улучшенной экспрессии прокоагулирующих композиций FVIII- XTEN.

Пример 49. Влияние вставки XTEN на активность FVIII, измеренную с помощью aPTT.

Одноэтапный анализ коагулирующей активности активированного частичного протромбина (aPTT) используют в дополнение к хромогенному анализу (как описано в примере 25), для определения активности FVIII различных гибридных белков FVIII- XTEN.

Способ: активность aPTT FVIII-XTEN измеряют с использованием прибора Sysmex CA-1500 (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Тарритаун, NY). Для создания стандартной кривой для анализа, стандарт WHO фактора VIII разбавляют с 2% мнимой средой для трансфекции до 100 мЕд./мл и затем осуществляют серии двукратного серийного разбавления, с последним стандартом, составляющим 0,78 мЕд./мл. Образцы культуры клеток FVIII-XTEN сначала разбавляют до 1:50 с буфером для анализа aPTT, дополнительные разбавления осуществляют 2% мнимой средой для трансфекции при необходимости.

После разбавления, анализ aPTT осуществляют с использованием прибора Sysmex следующим образом: 50 мкл разбавленных стандартов и образцов смешивают с 50 мкл плазмы человека с дефицитом FVIII, а затем с 50 мкл вещества aPTT. Смесь инкубируют при 37°C в течение 4 мин, и с дальнейшем инкубированием, к смеси добавляют 50 мкл $CaCl_2$ и безотлагательно измеряют время свертывания.

Для определения образцов для испытания активности FVIII, время свертывания стандартов строят с использованием полулогарифмической шкалы (время свертывания: линейная; стандартная концентрация: Log) для экстраполирования выравнивания между временем свертывания и активностью FVIII, и активность FVIII-XTEN затем рассчитывают против стандартной кривой. Чувствительность анализа составляет 40 мЕд./мл фактора VIII.

Результаты. Результаты проиллюстрированы на фиг. 44-46. Если уникальный XTEN из 144 или 288 аминокислот вводят в FVIII, все гибридные белки FVIII-XTEN, которые демонстрируют активность в хромогенном анализе являются также активными в анализе aPTT. Активность aPTT с последующей тенденцией хромогенного анализа, например, молекулы, которые демонстрируют низкую активность FVIII в хромогенном анализе, также имеют низкие величины aPTT. Как правило, результаты aPTT в случае гибридных белков являются ниже, чем полученные с помощью хромогенного анализа, с отношением хромогенного анализа к aPTT как 1,1 к 2,2, как проиллюстрировано на фиг. 44, в случае уникальных вставок XTEN. Гибридные белки FVIII-XTEN с несколькими вставками XTEN, в общем, демонстрируют дополнительные снижения активности aPTT, по сравнению с хромогенным анализом. Анализы FVIII-XTEN с двумя вставками XTEN демонстрируют активность со всеми конструкциями, но с отношениями хромогенный анализ/aPTT доходящими до 4, в некоторых случаях (фиг. 45). Анализы FVIII-XTEN с тремя вставками XTEN также демонстрируют активность в обоих анализах, с отношениями хромогенный анализ/aPTT доходящими до 5, в некоторых случаях (фиг. 46), в то время как отношения в случае контроль BDD-FVIII являются более схожими (правая часть FIG 46). Дополнительно, появившейся сайт вставки XTEN приводит к тому, что способствует видимым различиям между активностями в случае aPTT и хромогенного анализа. Например, в то время как некоторые молекулы с 2 вставками XTEN приводят к в 4 раза более низкой активности, чем значения в случае хромогенного анализа, активность aPTT других молекул FVIII с 2 XTEN являются довольно аналогичными активности в случае хромогенного анализа (фиг. 45). Некоторые молекулы с 3 вставками XTEN демонстрируют до 5-кратно более низких активностей, чем в случае хромогенного анализа, другие молекулы FVIII с 3 XTEN имеют активность aPTT менее чем в 2 раза более низкие, чем активность в случае хромогенного анализа (фиг. 45). В условиях эксперимента, результаты обеспечивает вывод, что конструкции гибридного белка FVIII-XTEN сохраняют прокоагулянтную активность, но что хромогенный анализ как правило обеспечивает большие уровни активности, чем таковые в случае системы анализ aPTT, используемой в исследовании.

Пример 50. Оценки влияния инсерционного сайта XTEN на увеличение времени полужизни FVIII.

Способы. Шесть гибридных белков FVIII-XTEN с уникальными вставками AG-144 XTEN в определенных локализациях проверяют у мышей FVIII/VWF DKO (как описано в примере 32), чтобы оценить влияние инсерционного сайта XTEN на время полужизни FVIII. Шесть репрезентативных вариантов XTEN (приведенных в табл. 1) со вставкой XTEN либо в пределах A1, A2, a3, A3-область 1 (A3-R1), A3-область 2 (A3-R2), либо на C-конце, выбирают для этого исследования, и BDD-FVIII, получаемый из основного вектора, используют в качестве контроля. Мышей FVIII/VWF DKO обрабатывают однократным внутривенным введением концентрата среды для выращивания культуры клеток для временной трансфекции из шести конструкций FVIII-XTEN (или среда положительного контроля) при 100-200 МЕ/кг, и образцы плазмы впоследствии собирают через 5 мин, 7 ч и 16 ч после введения дозы. Активность FVIII в плазме проверяют с использованием хромогенного анализа FVIII, а время полужизни FVIII-XTEN оценивают с использованием программы WinNonlin. Данные из исследования приведены в табл. 45 и фиг. 47.

Результаты. Значительно более продолжительное время полужизни, наблюдаемое в случае всех вариантов FVIII-XTEN, проверяют, по сравнению с контролем BDD-FVIII, но степень повышения времени

полужизни варьируется, с вариантом с XTEN в инсерционном сайте 403 обеспечивает меру увеличения времени полужизни в 10 раз (по сравнению с контролем), в то время как вариант вставка 1900 обеспечивает наибольшее увеличение времени полужизни в 18 раз. Различия инсерционного сайта XTEN в увеличении времени полужизни FVIII могут отражать роли различных доменов FVIII в выведении FVIII in vivo.

Таблица 45

PK вариантов отдельной вставки AG-144 FVIII-XTEN у мышей FVIII/VWF DKO

Обработка	**BDD-FVIII**	**pSD-050**	**pSD-0003**	**pSD-0039**	**pSD-0010**	**pSD-063**	**pSD-014**
Инсерционный сайт	нет	26	403	1656	1720	1900	CT
Восстановление	21,3	33,8	34,8	36,0	33,6	39,6	32,4
t1/2 (ч)	0,25	3,15	2,4	3,3	4,28	4,54	3,91
Повышение t1/2 (раз)		13	10	13	17	18	16

Пример 51. Оценки аддитивного эффекта вставок XTEN на увеличение времени полужизни FVIII.

Способы. Для того, чтобы оценить влияния нескольких вставок XTEN на время полужизни гибридного белка FVIII-XTEN, времена полужизни вариантов FVIII-XTEN с 1-3 вставками XTEN определяют у мышей FVIII-XTEN DKO с использованием концентрата культуры клеток из пяти конструкций (как описано в примере 32). В исследовании проверяют пять вариантов FVIII-XTEN: pSD-062, со вставкой AE144 в положение 1900 (нумерация относительно непроцессированного фактора VIII); pSD-0005 с AE144 в домене B FVIII (положение аминокислоты 745 в B-домене); pSD-0019 с AE288 на C-конце FVIII (CT); LSD0003.006 с AE144, вводимой в B-домен и AE288, вводимой на C-конце, и LSD0055.021 с тремя XTEN AE144, AE144 и AE288, вводимыми в положение 1900, с доменом B и на C-конце. Значения времени полужизни FVIII-XTEN предполагают использование программы WinNonlin.

Результаты. Результаты исследования приведены в табл. 46, а кривые PK проиллюстрированы на фиг. 48. Результаты исследования явно демонстрируют аддитивный эффект нескольких вставок XTEN на увеличение времени полужизни FVIII. С уникальными вставками XTEN, время полужизни FVIII расширяют с 0,25 ч до 3,2-4,0 ч, от 13 до 16-кратного возрастание. Если вставки B и CT XTEN комбинируют вместе, время полужизни FVIII дополнительно увеличивается до 10,6 ч, 42-кратное пролонгирование. Наконец, в случае третьей вставки XTEN, добавляемой в положение 1900 к конструкции B/CT, время полужизни достигает 16 ч у мышей FVIII-VWF DKO, 64-кратное возрастание.

Таблица 46

Аддитивный эффект вставок XTEN на $t_{1/2}$ FVIII у мышей FVIII/VWF DKO

Обработка	BDD-FVIII	pSD-062	pSD-0005	pSD-0019	LSD-0003,006	LSD-0055,021
XTEN Инсерционный сайт	нет	1900	B	CT	B/CT	1900/B/CT
Восстановление	21,3	35,3	44,9	33,3	39,0	37,2
t1/2 (ч)	0,25	3,8	3,2	4,0	10,6	16,0
Повышение t1/2 (раз)		15	13	16	42	64

Пример 52. Оценка нарушения FVIII-XTEN, связанного со связыванием анти-FVIII антител с использованием анализа Бетезда.

Способность вставок XTEN в молекулу FVIII препятствовать связыванию предсуществующих анти-FVIII антитела к гибридному белку FVIII-XTEN оценивают для того, чтобы определить их применение при лечении пациентов с анти-FVIII ингибирующими антителами.

Способы. Для оценки связывания анти-FVIII антител, два варианта FVIII-XTEN (PSD088, с 144 XTEN, вводимом в местах 26/403/1656/1900; и PSD-090, с 144 XTEN, вводимом в местах 26/1656/1720/1900) проверяют в сравнении с Refacto (продаваемый rFVIII) против образцов плазмы от трех пациентов с гемофилией A с ингибиторами фактора VIII (обозначенными 04-483, 05-505 и GK1838-2079), а также анти-FVIII поликлональное антитело овцы от Affinity Biologicals Inc (F8C-EIA-C). Титр Бетезда четырех анти-FVIII антител против двух вариантов FVIII-XTEN (pSD-088 и pSD-090) и контроль Refacto определяют с использованием измененных способов анализа Бетезда, описанных следующим образом. Термоинактивированные образцы анти-FVIII антитела при различных разбавлениях инкубируют с 1 МЕ/мл каждого варианта FVIII (разбавленный в 1X в буфер FVIII для хромогенного анализа) при соотношении 1:1. Смеси FVIII/антитело затем инкубируют в течение 2 ч в инкубаторе 37°C. После инкубирования, образцы разбавляют в 10 раз 1×буфером FVIII для хромогенного анализа, и 25 мкл разбавленной смеси затем используют для хромогенного анализа FVIII, процент оставшейся активности FVIII рассчитывают против активности после инкубирования известного не-нейтрализованного образца. Единицы Бетезда рассчитывают с использованием следующей формулы: ЕБ= фактор разбавления X

(LN(процент оставшейся активности) + 6,6438).

Результаты. Результаты приведены в табл. 47. Уменьшенные титры единицы Бетезда (BU) наблюдают в случае всех четырех антител, если проверяют против двух вариантов FVIII-XTEN, в сравнении с Refacto. Наблюдают 5-8-кратное увеличение против PSD-088 и 3-5-кратное увеличение против pSD-090 соответственно. Строят кривые ингибирования против вариантов FVIII для каждого антитела (фиг. 49) и, по сравнению с Refacto, и демонстрирует четкое левый сдвиг кривой ингибирования для двух молекул фактора FVIII-XTEN, с вариантом pSD-088 FVIII-XTEN, что приводит к дополнительному сдвигу влево, по сравнению с pSD-090. Эти результаты явно демонстрируют, что: 1) оба гибридных белка варианта FVIII-XTEN являются более устойчивыми по сравнению с предсуществующими анти-FVIII ингибирующими антителами, чем Refacto; и 2) PSD-088 является более устойчивым к анти-FVIII антителам, чем PSD-090, могут предоставить информацию, полезную при определении различий в инсерционных сайтах XTEN при препятствовании связыванию анти-FVIII антител. В условиях эксперимента, результаты обеспечивают некоторую поддержку потенциального использования композиции FVIII-XTEN при лечении пациентов с гемофилией А с ингибиторами фактора VIII.

Таблица 47

Титр Бетезда анти-FVIII антитела против вариантов FVIII-XTEN

анти-FVIII / антитело FVIII	04-483	05-505	GK1838-2079	F8C-EIA-C
pSD-088 (16/403/1656/1900)	2,5	8	47	57
pSD-090 (26/1656/1720/1900)	3,4	12	55	96
Refacto	12	66	268	337

Пример 53. Оценки времени полужизни молекул слияния FVIII XTEN, которые содержат четыре вставки XTEN у мышей с гемофилией А.

Способы. Восемь гибридных белков FVIII-XTEN с четырьмя вставками XTEN, каждый в определенных локализациях, проверяют у мышей FVIII/VWF DKO для того, чтобы оценить влияние вставок XTEN на увеличение времени полужизни FVIII: LSD0071.001, содержит вставки XTEN 403-AG144, 1900-AE144, 745(B)-AE144, 2332(CT)-AE288 (обозначенные как аминокислота FVIII с номером и вставленным XTEN); LSD0071.002, который содержит вставки XTEN 403-AE144, 1900-AE144, 745(B)-AE144, 2332(CT)-AE288; LSD0072.001, который содержит вставки XTEN 403-AG144, 1900-AG144, 745(B)-AE144, 2332(CT)-AE288; LSD0072.002, который содержит вставки XTEN 403-AE144, 1900-AG144, 745(B)-AE144, 2332(CT)-AE288; pBC0247.004, который содержит вставки XTEN 18-AG144, 403-AE144, 1656-AG144, 2332(CT)-AE288; pBC0251.002, который содержит вставки XTEN 18-AG144, 1656-AG144, 1900-AE144, 2332(CT)-AE288; pSD088, который содержит вставки XTEN 26-AG144, 403-AE144, 1656)-AG144, 1900-AE144 и pSD090, который содержит вставки XTEN 26-AG144, 1656-Ag144, 1720-AG144, 1900-AE144. Мышей FVIII/VWF DKO обрабатывают, как описано в примере 32, однократным внутривенным введением концентрата клеточной среды трансфекции FVIII-XTEN восьми конструкций при 100-200 МЕ/кг, а образцы плазма впоследствии собирают через 5 мин, 8 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч и 96 ч после введения дозы. Активность FVIII в плазме проверяют с использованием хромогенного анализа FVIII и время полужизни FVIII-XTEN оценивают с использованием программы WinNonlin.

Результаты. все из восьми молекул слияния FVIII XTEN, которые содержат четыре вставки XTEN, демонстрируют более продолжительное время полужизни, чем немодифицированный FVIII (результаты в табл. 48). Три молекулы со вставками XTEN в положениях 403, 1900, домене B, и на C-конце достигают время полужизни до 16,3 ч, что представляет собой 65-кратное улучшение, по сравнению с немодифицированным BDD FVIII. Несмотря на это, проверяемые молекулы со вставками XTEN в 26/403/1656/1900 (pSD088), или в 26/1656/1720/1900 (pSD090) демонстрируют время полужизни 9,1 ч и 9,5 ч, соответственно, что, по сравнению с BDD FVIII, представляет собой повышение в 36 раз и 38 раз соответственно. pBC247.004 (вставки XTEN в 18/403/1656/CT) и pBC251.002 (вставки XTEN в 18/1900/1656/CT) достигают значения времени полужизни 14,1 ч и 13 ч соответственно. Результаты демонстрируют, что несколько вставок XTEN (в данном случае, четыре вставки XTEN в случае каждой молекулы FVIII) могут значительно улучшить время полужизни FVIII. Это дополнительно иллюстрирует, что влияние XTEN на время полужизни FVIII является зависимым от инсерционного сайта, даже в случае нескольких вставок XTEN.

Таблица 48

Варианты PK FVIII-XTEN с четырьмя вставками XTEN у мышей FVIII/VWF DKO

Обработка	Вставки XTEN	t 1/2 (ч)	Повышение t1/2 (раз)
BDD-FVIII	нет	0,25	н/д
LSD0071.001	403AG/1900AE/B/CT	16,2	64,8
LSD0071.002	403AE/1900AE/B/CT	16,3	65,2
LSD0072.001	403AG/1900AG/B/CT	11,8	47,2
LSD0072.002	403AE/1900AG/B/CT	16,1	64,4
pBC247.004	18/403/1656/CT	14,1	56,4
pBC251.002	18/1900/1656/CT	13,0	52
pSD088	26/403/1656/1900	9,1	36,4
pSD090	26/1656/1720/1900	9,5	38

Таблица 49

Иллюстративная биологическая активность, иллюстративные анализы и предпочтительные показания

Биологически активный протеин	Биологическая активность	Иллюстративные анализы активности	Предпочтительное показание:
Фактор VIII (фактор VIII; октоког альфа; мороктоког альфа; рекомбинантный антигемофильный фактор; Nordiate; ReFacto; Kogenate; Kogenate SF; Helixate; Recombinate)	Фактор свертывания VIII представляет собой фактор, необходимый для гемостаза. Этот ген, кодирующий фактор свертывания VIII, который участвует во внутреннем пути свертывания крови; фактор VIII представляет собой кофактор в случае фактора IXa, который, в присутствии Ca + 2 и фосфолипидов, превращает фактор X в активированную форму Xa. Этот ген продуцирует две альтернативно, сплайсированные матрицы. Вариант I матрицы кодирует большой гликопротеин, изоформа a, который	Анализ Chromogenix (Rosen S, Scand J Haematol (1984) 33 (Suppl 40):139-45); анализ фактора VIII Chromogenix Coamatic®; одноэтапный анализ коагулирующей активности (Lethagen, S., et al.., Scandinavian J Haematology (1986) 37:448–453. Одноэтапный анализ коагулирующей активности и двухэтапный анализ коагулирующей активности (Barrowcliffe TW,	Гемофилия A; кровотечение; дефицит фактора VIII; случаи кровотечения у пациентов с ингибитором фактора VIII; операция, связанная со случаями геморрагии

	циркулирует в плазме и ассоциируется с фактором фон Виллебранда в нековалентный комплекс. Этот протеин подвергается множеству случаев расщепления. Вариант 2 матрицы кодирует предполагаемый малый протеин, изоформа b, который состоит прежде всего из фосфолипид связывающего домена фактора VIIIc. Этот связывающий домен является необходимым в случае коагулянтной активности. Дефекты в этом гене приводят к гемофилии A, общему рецессивному связанному с X-хромосомой расстройству свертывания.	Semin Thromb Hemost. (2002) 28(3):247-256); Разработка простого хромогенного анализа фактора VIII для клинического применения. (Wagenvoord RJ, Hendrix HH, Hemker HC. Haemostasis 1989; 19(4): 196-204) Бетезда-анализ (Verbruggen B, et al.. Improvements in factor VIII inhibitor detection: From Bethesda to Nijmegen. Semin Thromb Hemost. 2009 Nov;35(8):752-759)	

Таблица 50

Иллюстративные CFXTEN, который содержит FVIII и внутренние/внешние последовательности XTEN (SEQ ID NOS 1537-1554, соответственно, в порядке появления)

Название CFXTEN	**Аминокислотная последовательность**
FVIII BDD2 (A1-K127 -AE144-V128-N745-AE288-P1640-Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL FVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAV GVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKGGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDL VKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNS LMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTT PEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQ HDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDN SPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNG PQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKN QASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVED

	GPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDK RNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVF DSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFS GETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSY EDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGPPVLKRHQREIT RTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAV ERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELN EHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKN FVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGP LLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNI QMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSI HFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHL HAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYS GSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDG KKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTL RMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHL QGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEF LISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQS WVHQIALRMEVLGCEAQDLY
FVIII BDD2 (A1- A375- AE576- K376- N745- AE144- P1640- Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL FVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAV GVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMAS DPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAV FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHR KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTD SEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQ RIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQA SRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGP TKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRN VILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDS LQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGE TVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDI SAYLLSKNNAIEPRSFSQNGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS

	ETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSE PATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEG SAPGPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQS PRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQE FTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSL ISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYF SDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSW YFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQR IRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLP SKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASG QYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQK FSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPII ARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFT NMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTT QGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVN SLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
FVIII BDD2 (A1- Y1792- AF144- E1793- Y2332- AE864)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL FVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAV GVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMAS DPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAV FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHR KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTD SEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPG EIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKES VDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQ ASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHK MVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSC DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQS DQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWD YGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLL GPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYGGTSTPESGSASPGTSPSGE SSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPG TSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSPSGES STAPGTSPSGESSTAPGEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAP TKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQE FALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIM DTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALY NLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG MASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLA PMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGN VDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMES KAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQV DFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKV FQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYG GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGS

	PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
FVIII BDD2 (A1-Y2043-AG144-G2044-Q2222-AG864-V2223-Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL FVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAV GVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMAS DPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAV FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHR KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTD SEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPG EIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKES VDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQ ASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHK MVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSC DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQS DQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWD YGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLL GPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNE TKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHT NTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPT FKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHV FTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMST LFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGPGSSPSASTGTGPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSGGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDL LAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFF GNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGM ESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQGGASPGTSS TGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGT ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAS TGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGS

	GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTG TGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGV NNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWT LFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEV LGCEAQDLY
FVIII BDD2 (A1- G1799- AE144- A1800- F2093- AE42- S2094- V2223- AE42- N2224- AE42- N2225- G2278- AE42- K2279- Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL FVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHA VGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMA SDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLF AVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG CHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTL LMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDD DLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPL VLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGI LGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD FPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLL ICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSG YTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTA LLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQRE ITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIA AVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRG ELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGGG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGAEPRKNFVKPNETKT YFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTL NPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFK ENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFT VRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTL FLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWS TKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPGSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTL MVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCS MPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVGP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGGNNPKEWLQVD FQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGGTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSKVKVFQGNQDSFTP VVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
FVIII BDD2 (A1-R28- AG144- F29-	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARGPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSGFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPR PPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEY

G244-AG288-L245-R2090-AG576-Q2091-Y2332-AG864)	DDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVD LVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKN SLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGGPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS GLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTA QTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDY DDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYA PLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHES GILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLK DFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPL LICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQ LEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFS GYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTA LLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREI TRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAA VERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGEL NEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRK NFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIG PLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCN IQMEDPTFKENYRFHAGINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENI HSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGE HLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLH YSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGT LMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCS MPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNN PKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFF QNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLG CEAQDLYGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSE PATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS

	TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAP
FVIII (A1- T1651- AG576- R1652- K1808- AG144- P1809- F2093- AG288- S2094- Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL FVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAV GVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMAS DPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAV FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHR KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTD SEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPG EIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKES VDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQ ASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHK MVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSC DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPE NDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYE TFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTT AATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLD TTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESG RLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLI ENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSK NMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQ GPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSR NLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFM KNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGEE ENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETE LEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSH SIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESS HFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPK PDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIK WNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQE KSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLC SQNPPVLKRHQREITGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT

	GSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSSGRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYF IAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYR GELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAE PRKNFVKGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGPNETKTY FWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLN PAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKEN YRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVR KKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV YSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKE PFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSGSSL YISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYI RLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMF ATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGV KSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDP PLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
FVIII BDD2 (A1-A28- AG42- F29-E124- AG42- D125- E124- AG42- D125- P333- AG42- Q334- Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDAGGAPSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGPSGPGRFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLF NIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEGGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGASPGDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVK DLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGGSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAGKSWHSETKNSLMQDRDAASA RAWPKMHTVNGYVNSSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHT FLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPGSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGGQL RMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVH YIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTD ETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFV NMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLT ENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYIL SIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILG CHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSF SQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSP RSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEF TDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLI SYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFS DVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWY FTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIR WYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQ

	YGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKF SSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIA RYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTN MFATWTPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQ GVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNS LDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
FVIII (A1- D345- AE144- Y346- D403- AE144- R405- R1797- AE288- Q1798- Y2322)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL FVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAV GVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMAS DPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAV FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHR KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDGGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSP SFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDGGTSTPESGSASP GTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSST AESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAP GTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMA YTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDV RPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSS FVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWY LTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYW YILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWI LGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR SFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLM LLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHS GDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAA GTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLL ESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLK TNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRML MDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKML FLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVV VGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKE TLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRS LNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQ NFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQID YNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQ DNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVG SLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFPTETSN GSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLD PLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAIN EGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYD DTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPH VLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEV EDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRGGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSE

	SATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGQG AEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDV HSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERN CRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMG SNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVE CLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPK LARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFII MYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTH YSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPS KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTS MYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTR YLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
FVIII (A1- N745)- AE864- (P1640- Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL FVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAV GVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMAS DPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAV FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHR KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTD SEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPG EIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKES VDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQ ASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHK MVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSC DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNGGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGPPVLKRHQREITRTTL QSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHL GLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVK PNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLV CHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQME DPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFS

	GHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAG MSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSIN AWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKW QTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRME LMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRS NAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSS QDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVH QIALRMEVLGCEAQDLY
FVIII BDD9 (A1- N745)- AE288- (P1640- Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL FVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAV GVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMAS DPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAV FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHR KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTD SEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPG EIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKES VDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQ ASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHK MVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSC DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNGGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPR SFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFT DGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLIS YEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFS DVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWY FTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIR WYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQ YGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKF SSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIA RYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTN MFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQ GVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNS LDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
FVIII BDD9 (A1- S743)- AE288- (Q1638- Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL FVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAV GVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMAS DPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAV FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHR KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTD

	SEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPG EIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKES VDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQ ASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHK MVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSC DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSGGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG QNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPR SFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFT DGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLIS YEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFS DVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWY FTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIR WYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQ YGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKF SSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIA RYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTN MFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQ GVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNS LDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
FVIII BDD9 (A1-N745)-AG288_2-(P1640-Y2332)-AG288_2	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL FVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAV GVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMAS DPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAV FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHR KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTD SEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPG EIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKES VDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQ ASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHK MVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSC DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNGPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSGPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSP RSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEF TDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLI

	SYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFS DVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWY FTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIR WYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQ YGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKF SSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIA RYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTN MFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQ GVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNS LDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGAGSPGAETAPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSGAETAEQKLISEEDLSPATG
FVIII BDD9 (A1-S743)-AG288_2-(Q1638-Y2332)-AG288_2	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL FVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAV GVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMAS DPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAV FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHR KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTD SEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPG EIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKES VDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQ ASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHK MVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSC DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSGPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS GQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSP RSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEF TDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLI SYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFS DVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWY FTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIR WYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQ YGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKF SSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIA RYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTN MFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQ GVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNS

	LDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGAGSPGAETAPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSGAETAEQKLISEEDLSPATG
FVIII BDD10 (A1- N745)- AE288- (P1640- Y2332)- AE288	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL FVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAV GVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMAS DPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAV FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHR KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTD SEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPG EIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKES VDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQ ASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHK MVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSC DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNGGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGPPVLKRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPR SFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFT DGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLIS YEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFS DVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWY FTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIR WYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQ YGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKF SSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIA RYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTN MFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQ GVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNS LDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAP
FVIII BDD10 (A1-	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL FVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAV GVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMAS

S743)-AE288-(Q1638-Y2332)-AE288	DPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAV FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHR KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTD SEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPG EIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKES VDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQ ASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHK MVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSC DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSGGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG QNPPVLKRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPR SFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFT DGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLIS YEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFS DVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWY FTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIR WYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQ YGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKF SSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIA RYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTN MFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQ GVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNS LDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAP
FVIII BDD10 (A1-N745)-AG288_2-(P1640-Y2332)-AG288_2	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL FVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAV GVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMAS DPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAV FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHR KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTD SEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPG EIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKES VDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQ ASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHK

	MVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSC DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNGPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPPVLKRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPR SFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFT DGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLIS YEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFS DVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWY FTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIR WYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQ YGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKF SSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIA RYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTN MFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQ GVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNS LDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGAGSPGAETAPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSGAETAEQKLISEEDLSPATG
FVIII BDD10 (A1-S743)-AG288_2-(Q1638-Y2332)-AG288_2	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL FVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAV GVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMAS DPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAV FDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHR KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTD SEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAP DDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLL YGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPG EIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKES VDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQ ASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHK MVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSC DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSGPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS QNPPVLKRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPR SFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFT DGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLIS
	YEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFS DVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWY FTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIR WYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQ YGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKF SSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIA RYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTN MFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQ GVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNS LDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGAGSPGAETAPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSGAETAEQKLISEEDLSPATG

Название последовательности отражает конформацию от N- до С-конца сегментов FVIII (аминокислота охватывает номер по отношению к зрелой последовательности) и компонентам XTEN.

Таблица 51

Иллюстративные CFXTEN, которые содержат FVIII, расщепленные последовательности и последовательности XTEN (SEQ ID NOS 1555-1590, соответственно, в порядке появления)

Название CFXTEN	Аминокислотная последовательность
SP-AE288-CS-L-(FVIII_1-745)-AE288-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AE288	MQIELSTCFFLCLLRFCFSGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPQSPRSFQ GPEGPSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTS VVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMA SHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQ VLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEK TQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNG YVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQAS LEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLR MKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVH YIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYT DETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVR PLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYS SFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRS

	WYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEV AYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMEN PGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSK NNAIEPRSFSQNGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPQSPRSFQKKTRH YFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQP LYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQ RQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDL EKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTE NMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIR WYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLP SKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITAS GQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGA RQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQI TASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKT MKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQG NQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGP EGPSQSPRSFQGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
SP-AE576-CS-L-(FVIII_1-745)-AE576-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AE288	MQIELSTCFFLCLLRFCFSGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPQSPRSFQGPSGPATRRYYLGAVELSWDYMQ SDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPW MGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDD QTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDL VKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETK NSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGM GTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHI SSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVR FDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYK SQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEV GDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIF

	KYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKES VDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEF QASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTF KHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALL KVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPQSPRSFQK KTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGS FTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYE EDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSD VDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWY FTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQR IRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEM LPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQIT ASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQ GARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKH NIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDA QITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQK TMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQ GNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYG PEGPSQSPRSFQGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
SP-(FVIII_1-745)-AE576-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AE576	MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARF PPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEV YDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDK VFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGA LLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAAS ARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLE GHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEA YVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRI GRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQA SRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVED GPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSD KRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSING YVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTL TLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGD

	YYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPQSPRSFQKKTRHYFIAAVER LWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNE HLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRK NFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGL IGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRA PCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSN ENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVE CLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAP KLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYIS QFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIR LHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMF ATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQG VKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNS LDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGPEGPSQSPRSFQG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
SP-AE576-CS-L-(FVIII_1-745)-AE576-(FVIII_1686-2332)	MQIELSTCFFLCLLRFCFSGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPQSPRSFQGPEGPSATRRYYLGAVELSWDYM QSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPP WMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYD

	DQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVD LVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETK NSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGM GTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHI SSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVR FDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYK SQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEV GDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIF KYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKES VDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEF QASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTF KHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALL KVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPQSPRSFQK KTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGS FTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYE EDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSD VDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWY FTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQR IRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEM LPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQIT ASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQ GARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKH NIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDA QITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQK TMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQ GNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
SP-AE576-CS-L-(FVIII_1-743)-AE288-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AE576	MQIELSTCFFLCLLRFCFSGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPIEPRSPSGSPGATRRYYLGAVELSWDYMQS DLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWM

	GLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQ TSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLV KDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNS LMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGT TPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISS HQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQ YLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKY KWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKH KMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKV SSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRA QSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIM VTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQH HMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGR QVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRF HAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRK KEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV YSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTK EPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYR GNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELM GCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRS NAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISS SQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSW VHQIALRMEVLGCEAQDLYGSPGIEPRSPSGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
SP-AG288-CS-L-(FVIII_1-743)-AG576-(FVIII_168	MQIELSTCFFLCLLRFCFSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSIEPRSP

6-2332)-L-CS-AG288	SGSPGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSV VYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMAS HPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQV LKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKT QTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNG YVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQAS LEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLR MKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVH YIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYT DETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVR PLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYS SFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRS WYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEV AYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMEN PGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSK NNAIEPRSFSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSA STGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGT SSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNR AQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNI MVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQ HHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHG RQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRF HAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRK KEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV YSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTK EPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYR GNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELM GCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRS NAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISS SQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSW VHQIALRMEVLGCEAQDLYGSPGQSPRSFQPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSS PSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGS
SP-AG576-CS-L-(FVIII_1-745)-	MQIELSTCFFLCLLRFCFSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSS

AG288-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AE576	TGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSQSPRSFQGSPGATRRYYLGAVELSWDY MQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRP PWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEY DDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSET KNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIG MGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFC HISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVV RFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSY KSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGE VGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEI FKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKES VDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEF QASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTF KHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALL KVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLR NRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVED NIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWK VQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPA HGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKEN YRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFT VRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMST LFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINA WSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKW QTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRM ELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQ GRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEF LISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHP QSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGSPGQSPRSFQGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT

	SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
SP- (FVIII_1- 743)- AG576- (FVIII_168 6-2332)-L- CS-AG576	MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARF PPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEV YDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDK VFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGA LLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAAS ARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLE GHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEA YVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRI GRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQA SRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVED GPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSD KRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSING YVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTL TLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGD YYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEH LGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKN FVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLI GPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRA PCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSN ENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVE CLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAP KLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYIS QFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIR LHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMF ATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQG VKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNS LDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGSPGQSPRSFQPGT PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGS SPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGT

	SSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGS STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG S
SP-AG288-CS-L-(FVIII_1-743)-AG288-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AE288	MQIELSTCFFLCLLRFCFSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSQSPRS FQGPSGPATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNT SVVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNM ASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVW QVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKE KTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVN GYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQA SLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQL RMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWV HYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDV RPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYY SSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENR SWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHE VAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSME NPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSQSPRSFQKKTRH YFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQP LYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQ RQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDL EKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTE NMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIR WYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLP SKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITAS GQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGA RQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQI TASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKT MKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQG NQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGP SGPQSPRSFQGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA

	PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
SP-AE576-CS-L-(FVIII_1-743)-AG576-(FVIII_1686-2332)	MQIELSTCFFLCLLRFCFSGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPQSPRSFQGSPGATRRYYLGAVELSWDYMQS DLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWM GLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQ TSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLV KDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNS LMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGT TPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISS HQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQ YLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKY KWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKH KMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKV SSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSS PSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSQSPRSFQKKTR HYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQ PLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQ RQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDL EKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTE NMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIR WYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLP SKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITAS GQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGA RQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQI TASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKT

	MKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQG NQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
FVIII BDD2 S367-FXIa- AE42- F368- Y2332- FXIa- AE864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLH AVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGP MASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFI LLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNSSLP GLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFL TAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEE AEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSKLTRAETGEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGSEPATSGSGFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEED WDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTRE AIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENI QRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILS IGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILG CHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR SFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDEN QSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVV FQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYS FYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCK AWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTI FDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPG LVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLY PGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMA SGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFG NVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLG MESKAISDAQITASSYFTNMFATWTPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKE WLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQ NGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLG CEAQDLYKLTRAETGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
FVIII	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT

BDD2 N745-FIXa- AG288- FIXa- P1640- Y2332- FIXa- AG864	LFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLH AVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGP MASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFI LLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLP GLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFL TAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEE AEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEE DWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTR EAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRL PKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENI QRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILS IGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILG CHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR SFSQNPLGRIVGGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGT SSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSGPLGRIVGGPP VLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSF QKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFT DGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLI SYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAY FSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETK SWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMA QDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFE TVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIR DFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHG IKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSS GIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAI SDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVD FQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVK VFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQD LYPLGRIVGGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT GSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGS

	GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP
FVIII BDD2 V128-FVIIa-AG42-FVIIa-G2044-FVIIa-AG144-Y2332-FVIIa-AG576	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLH AVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVLQVRIVGGGAPSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGPSGPGLQVRIVGG FPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALL VCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASAR AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGH TFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYV KVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRS VAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGR KYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASR PYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPT KSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRN VILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPF SGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYED SYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDD TISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSP HVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIR AEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKT YFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTN TLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDP TFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSG HVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHA GMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGLQVRIVGGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGLQVRIVGGQWAPKLA RLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFII MYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHP THYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFAT WSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVK SLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLD PPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYLQVRIVGGPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGS PGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGS
AE864-FVIII-Тромбин-AE144	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTST

	EPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGATRRYYLGAVELSWDYMQS DLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWM GLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQ TSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLV KDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNS LMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGT TPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISS HQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQ YLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKY KWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKH KMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKV SSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNA TTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQ EAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRL NEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMP VHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSW GKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSAT NRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATAL RLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESAR WIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGE FTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQ ENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLN DSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQ NFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQ IDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRV LFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQ REVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDL FPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSA KTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNAC ESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTT LQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVE RLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELN EHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPR KNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSG

	LIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCR APCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGS NENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRV ECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWA PKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYI SQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYI RLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNM FATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQ GVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVN SLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGLTPRSLLVGGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
FVIII BDD3- FXIIa- AE144	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLH AVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGP MASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFI LLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLP GLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFL TAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEE AEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEE DWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTR EAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRL PKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENI QRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILS IGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILG CHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR SFSQNPPVLKRHQGEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDEN QSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVV FQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYS FYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCK AWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTI FDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPG LVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLY PGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMA SGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFG NVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLG MESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKE WLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQ NGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLG CEAQDLYGTMTRIVGGGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPS EGSAP
FVIII BDD3- Эластаза- AE144	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLH AVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGP MASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFI

	LLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLP GLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFL TAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEE AEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEE DWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTR EAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRL PKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENI QRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILS IGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILG CHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR SFSQNPPVLKRHQGEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDEN QSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVV FQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYS FYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCK AWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTI FDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPG LVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLY PGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMA SGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFG NVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLG MESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKE WLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQ NGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLG CEAQDLYGGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSET PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
FVIII BDD3- FXIa- AE144	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLH AVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGP MASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFI LLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLP GLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFL TAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEE AEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEE DWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTR EAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRL PKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENI QRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILS IGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILG CHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR SFSQNPPVLKRHQGEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDEN QSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVV FQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYS FYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCK AWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTI FDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPG LVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLY

	PGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMA SGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFG NVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLG MESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKE WLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQ NGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLG CEAQDLYGKLTRAETGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAP
FVIII BDD3- Тромбин- AE144	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLH AVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGP MASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFI LLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLP GLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFL TAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEE AEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEE DWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTR EAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRL PKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENI QRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILS IGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILG CHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR SFSQNPPVLKRHQGEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDEN QSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVV FQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYS FYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCK AWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTI FDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPG LVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLY PGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMA SGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFG NVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLG MESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKE WLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQ NGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLG CEAQDLYGLTPRSLLVGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPS EGSAP
AE144- FVIII BDD2- MMP-17- AE864	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGATRRYYLGAV ELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLF NIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWK ASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLT

	YSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEG KSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKS VYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDL TDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGI LGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLK DFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIG PLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPA GVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFL SVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFR NRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPV LKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQ KKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTD GSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLIS YEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYF SDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKS WYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQ DQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFET VEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRD FQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGI KTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSS GIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAI SDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVD FQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVK VFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQD LYGAPLGLRLRGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AE144- FVIII BDD2- FXIIa- AE864	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGATRRYYLGAV ELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLF NIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWK ASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLT YSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEG

	KSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKS VYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDL TDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGI LGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLK DFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIG PLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPA GVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFL SVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFR NRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPV LKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQ KKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTD GSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLIS YEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYF SDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKS WYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQ DQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFET VEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRD FQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGI KTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSS GIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAI SDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVD FQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVK VFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQD LYGTMTRIVGGGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATS GSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG144-FVIII BDD2-FXIa-AG576	SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGA TGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGATRRYYLGAV ELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLF NIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWK ASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLT YSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEG KSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKS

	VYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDL TDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGI LGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLK DFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIG PLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPA GVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFL SVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFR NRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPV LKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQ KKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTD GSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLIS YEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYF SDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKS WYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQ DQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFET VEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRD FQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGI KTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSS GIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAI SDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVD FQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVK VFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQD LYGKLTRAETGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSS PSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGS
AE144-FXIa-FVIII BDD2-AE864	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGKLTRAETGAT RRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLF VEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHA VGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPM ASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFIL LFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPG LIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLT AQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEA EDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEED WDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTRE AIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER

	DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENI QRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILS IGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILG CHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR SFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDEN QSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVV FQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYS FYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCK AWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTI FDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPG LVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLY PGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMA SGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFG NVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLG MESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKE WLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQ NGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLG CEAQDLYGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AE144-FVIII BDD2-Y2332-Тромбин-AE864	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGATRRYYLGAV ELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLF NIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWK ASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLT YSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEG KSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKS VYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDL TDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGI LGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLK DFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIG

	PLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPA GVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFL SVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFR NRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPV LKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQ KKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTD GSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLIS YEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYF SDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKS WYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQ DQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFET VEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRD FQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGI KTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSS GIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAI SDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVD FQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVK VFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQD LYGLTPRSLLVGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AE864-FVIII-MMP-17-AE144	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS

	EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGATRRYYLGAVELSWDYMQS DLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWM GLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQ TSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLV KDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNS LMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGT TPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISS HQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQ YLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKY KWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKH KMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKV SSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNA TTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQ EAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRL NEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMP VHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSW GKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSAT NRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATAL RLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESAR WIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGE FTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQ ENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLN DSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQ NFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQ IDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRV LFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQ REVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDL FPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSA KTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNAC ESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTT LQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVE RLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELN EHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPR KNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSG LIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCR APCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGS NENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRV ECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWA PKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYI SQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYI RLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNM FATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQ GVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVN SLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGAPLGLRLRGGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS

	EGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
AF144- FXIIa- FVIII- FXIIa- AF864	GTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGSTSE SPSGTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESP GPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTMTRIVGGATRR YYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVE FTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVG VSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMAS DPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLF AVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLI GCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTA QTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAE DYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEED WDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTRE AIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENI QRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILS IGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILG CHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR SFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLL MLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQL HHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSD NLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEEN NDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALF KVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKV TPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQ NPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVE GQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNT HNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVE GSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTK QIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDT STQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSP LPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGA KKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPK TSGKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNE ANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKS PEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLC SQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQ SPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVF QEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSF YSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCK AWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTI FDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPG LVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLY PGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMA SGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFG NVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLG MESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKE

	WLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQ NGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLG CEAQDLYGTMTRIVGGGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTA PGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTS ESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESS TAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGT STPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPES GSASPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAP GSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGSTSS TAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGT APGSTSESPSGTAPGTSTPESGPXXXGASASGAPSTXXXXSESPSGTAPGS TSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESP SGTAPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGP GTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPS GESSTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGT APGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTS PSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGTSPSGES STAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPG TSPSGESSTAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP
AE864- FVIII- FXIa- AE144	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGATRRYYLGAVELSWDYMQS DLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWM GLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQ TSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLV KDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNS LMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGT TPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISS HQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQ YLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKY KWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKH KMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKV

	SSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNA TTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQ EAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRL NEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMP VHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSW GKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSAT NRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATAL RLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESAR WIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGE FTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQ ENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLN DSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQ NFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQ IDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRV LFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQ REVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDL FPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSA KTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNAC ESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTT LQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVE RLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELN EHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPR KNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSG LIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCR APCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGS NENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRV ECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWA PKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYI SQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYI RLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNM FATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQ GVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVN SLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGKLTRAETGGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
AE144-FXIa-FVIII BDD9-AE864	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGKLTRAETGAT RRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLF VEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHA VGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPM ASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFIL LFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPG LIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLT AQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEA EDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEED WDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTRE AIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER

	DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENI QRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILS IGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILG CHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR SFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDEN QSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVV FQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYS FYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCK AWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTI FDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPG LVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLY PGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMA SGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFG NVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLG MESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKE WLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQ NGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLG CEAQDLYGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AE48-FXIa-FVIII BDD9-AE864	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGK LTRAETGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNT SVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNM ASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVW QVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKE KTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVN GYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQA SLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQL RMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWV HYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDV RPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYY SSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENR SWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHE VAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSME

	NPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDF DIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGS VPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFR NQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAP TKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTV QEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAING YIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYK MALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKC QTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSW IKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTG TLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLN SCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRP QVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGH QWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIA LRMEVLGCEAQDLYGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
FVIII BDD9- FXIa- AG288_2	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLH AVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGP MASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFI LLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLP GLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFL TAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEE AEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEE DWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTR EAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRL PKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENI QRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILS IGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILG CHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR SFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDEN QSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVV FQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYS

	FYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCK AWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTI FDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPG LVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLY PGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMA SGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFG NVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLG MESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKE WLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQ NGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLG CEAQDLYKLTRAETGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS
FVIII BDD9- FXIa- AG864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLH AVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGP MASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFI LLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLP GLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFL TAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEE AEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEE DWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTR EAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRL PKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENI QRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILS IGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILG CHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR SFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDEN QSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVV FQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYS FYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCK AWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTI FDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPG LVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLY PGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMA SGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFG NVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLG MESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKE WLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQ NGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLG CEAQDLYKLTRAETGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP

	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP
FVIII BDD9 (1-745) AG288_2-(1640-Y2332)-FXIa-AG864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLH AVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGP MASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFI LLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLP GLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFL TAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEE AEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEE DWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTR EAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRL PKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENI QRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILS IGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILG CHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR SFSQNGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG SSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPPVLKRHQREITRTTLQS DQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLW DYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHL GLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNF VKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIG PLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAP CNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNE NIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVEC LIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPK LARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQ FIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRL HPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFA TWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGV KSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSL DPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYKLTRAETGGASPGT SSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGT

	PGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGS SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP
FVIII BDD9 (1-743) AG288_2-(1638-Y2332)-FXIa-AG864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLH AVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGP MASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFI LLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLP GLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFL TAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEE AEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEE DWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTR EAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRL PKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENI QRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILS IGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILG CHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR SFSGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSQNPPVLKRHQREITRTTLQ SDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEH LGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKN FVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLI GPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRA PCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSN ENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVE CLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAP KLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYIS QFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIR LHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMF ATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQG VKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNS LDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYKLTRAETGGASPG

	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP
BDD10 (1-745) AG288_2-(1640-Y2332)-FXIa-AG864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLH AVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGP MASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFI LLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLP GLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFL TAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEE AEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEE DWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTR EAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRL PKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENI QRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILS IGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILG CHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR SFSQNGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG SSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPPVLKRHQAEITRTTLQS DQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLW DYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHL GLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNF VKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIG PLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAP CNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNE NIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVEC LIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPK LARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQ FIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRL HPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFA TWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGV

	KSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSL DPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYKLTRAETGGASPGT SSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGT PGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGS SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP
FVIII BDD10- FXIa- AG288_2	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLH AVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGP MASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFI LLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLP GLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFL TAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEE AEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEE DWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTR EAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRL PKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENI QRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILS IGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILG CHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR SFSQNPPVLKRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDEN QSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVV FQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYS FYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCK AWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTI FDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPG LVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLY PGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMA SGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFG NVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLG MESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKE WLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQ NGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLG CEAQDLYKLTRAETGAGSPGAETAPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGS

	GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSGAETAEQKLISEEDLSPATG
FVIII BDD10- FXIa- AG864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLH AVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGP MASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFI LLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLP GLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFL TAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEE AEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEE DWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTR EAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRL PKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENI QRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILS IGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILG CHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR SFSQNPPVLKRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDEN QSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVV FQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYS FYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCK AWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTI FDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPG LVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLY PGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMA SGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFG NVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLG MESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKE WLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQ NGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLG CEAQDLYKLTRAETGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSS TGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGP

	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP
FVIII BDD10-FXIa-AE864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLH AVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGP MASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFI LLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLP GLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFL TAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEE AEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEE DWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTR EAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRL PKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENI QRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILS IGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILG CHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR SFSQNPPVLKRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDEN QSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVV FQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYS FYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCK AWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTI FDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPG LVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLY PGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMA SGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFG NVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLG MESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKE WLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQ NGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLG CEAQDLYKLTRAETGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP

Название последовательности отражает конформация от N- до С-конца варианта FVIII и компонентов XTEN: сигнальная последовательность (SP); линкер (L); последовательность расщепления (CS) может быть обозначена с помощью названия протеаз, активных в последовательности, и компонентов XTEN по названию семейства и длине, с точками вставок в случае компонентов обозначенных с помощью аминокислоты FVIII и пронумерованных позиций, прилегающих к встроенной последовательности или A1, которая представляет собой N-конец и Y2332, которая представляет собой С-конец FVIII.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гибридный белок рекомбинантного фактора VIII, содержащий полипептид фактора VIII, слитый с первым удлиненным рекомбинантным полипептидом (XTEN),

где гибридный белок фактора VIII обладает прокоагулянтной активностью при расщеплении тромбином,

где указанный полипептид фактора VIII содержит аминокислотные остатки 1-745 и 1649-2332 зрелого фактора VIII человека (SEQ ID NO: 2), и XTEN встроен непосредственно в направлении 5'-3' от аминокислоты в положении 745 зрелого нативного фактора VIII человека (SEQ ID NO: 2);

где полипептид фактора VIII содержит частичную делецию в домене B, и

где полипептид фактора VIII не содержит аминокислотного остатка R1648, соответствующего зрелому нативному фактору VIII человека (SEQ ID NO: 2).

2. Гибридный белок рекомбинантного фактора VIII по п.1, где XTEN содержит по меньшей мере 36 аминокислот.

3. Гибридный белок рекомбинантного фактора VIII по п.2, где XTEN содержит по меньшей мере 144 аминокислоты.

4. Гибридный белок рекомбинантного фактора VIII по п.2, где XTEN содержит по меньшей мере 288 аминокислот.

5. Гибридный белок рекомбинантного фактора VIII по любому из пп.1-4, где XTEN содержит один или более мотивов последовательности XTEN,

где один или более мотивов последовательности XTEN выбраны из SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 и 48.

6. Гибридный белок рекомбинантного фактора VIII по п.5, где один или более мотивов последовательности XTEN выбраны из SEQ ID NO: 23, 24, 25 и 26.

7. Гибридный белок рекомбинантного фактора VIII по любому из пп.1-6, где XTEN содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 49, 50, 51, 52, 57, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 78 и 79.

8. Гибридный белок рекомбинантного фактора VIII по любому из пп.1-7, где XTEN содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 67.

9. Гибридный белок рекомбинантного фактора VIII по любому из пп.1-8, где XTEN содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 67.

10. Гибридный белок рекомбинантного фактора VIII по любому из пп.1-7, где XTEN содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 50.

11. Гибридный белок рекомбинантного фактора VIII по любому из пп.1-7, где XTEN содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50.

12. Гибридный белок рекомбинантного фактора VIII по любому из пп.1-7, где XTEN содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 52.

13. Гибридный белок рекомбинантного фактора VIII по любому из пп.1-7, где XTEN содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 52.

14. Гибридный белок рекомбинантного фактора VIII по любому из пп.1-7, где XTEN содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 78.

15. Гибридный белок рекомбинантного фактора VIII по любому из пп.1-7, где XTEN содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 78.

16. Гибридный белок рекомбинантного фактора VIII по любому из пп.1-6, где XTEN содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 279, 281, 283, 285, 287, 289, 291, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305, 307, 309, 311, 313, 315, 317, 319, 321, 323, 325, 327, 329, 331, 333, 335, 337, 339, 341, 343, 345, 347, 349 и 351.

17. Гибридный белок рекомбинантного фактора VIII по любому пп.1-16, где полипептид фактора VIII содержит одноцепочечный полипептид фактора VIII.

18. Гибридный белок рекомбинантного фактора VIII по любому пп.1-17, где гибридный белок фактора VIII дополнительно содержит Fc фрагмент иммуноглобулина, конъюгированный на С-конце полипептида FVIII.

19. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая гибридный белок рекомбинантного фактора VIII по любому из пп.1-18.

20. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.19.

21. Вектор по п.20, где указанный вектор представляет собой плазмиду, космиду, вирусную частицу или фаг.

22. Вектор по п.20 или 21, где указанный вектор представляет собой аденовирусный вектор, или бакуловирусный вектор, или автономно реплицирующийся вектор.

23. Вектор по любому из пп.20-22, где выделенная нуклеиновая кислота функционально связана с промотором, лидерной последовательностью, терминатором или энхансером.

24. Клетка-хозяин, содержащая вектор по любому из пп.20-23, где указанная клетка представляет собой клетку млекопитающего.

25. Фармацевтическая композиция, содержащая гибридный белок рекомбинантного фактора VIII по любому из пп.1-18 и фармацевтически приемлемый носитель.

26. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенную нуклеиновую кислоту по п.19, вектор по любому из пп.20-23 или клетку-хозяина по п.24 и фармацевтически приемлемый носитель.

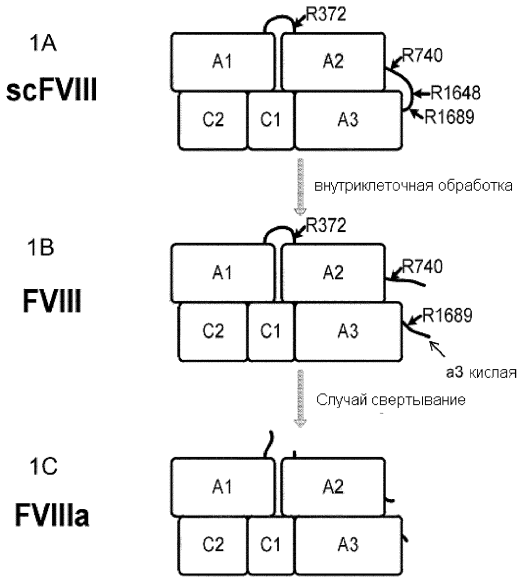
27. Способ получения гибридного белка рекомбинантного фактора VIII, включающий культивирование клетки-хозяина по п.24 в среде при подходящих условиях.

28. Способ по п.27, дополнительно включающий выделение гибридного белка рекомбинантного фактора VIII из среды.

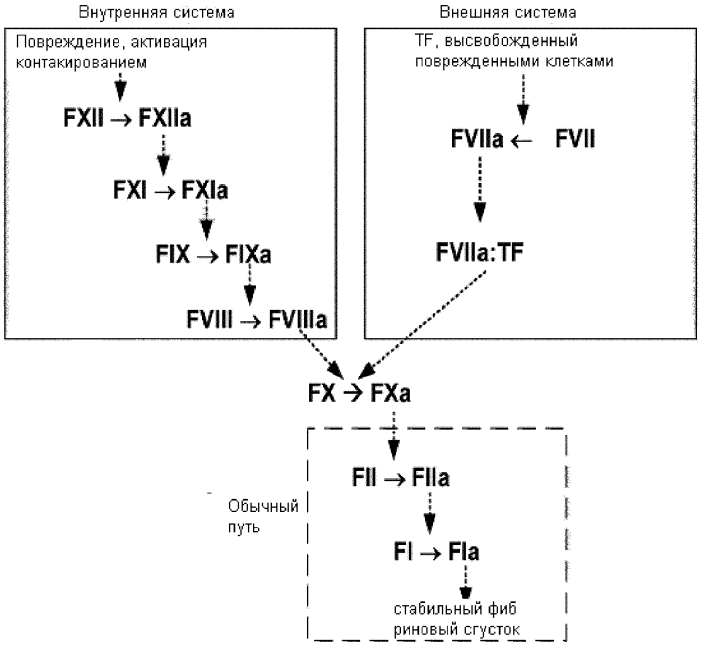
29. Применение фармацевтической композиции по п.25 или 26 для изготовления лекарственного средства для лечения коагулопатии.

30. Применение фармацевтической композиции по п.25 или 26 для изготовления лекарственного средства для лечения кровотечения.

31. Применение фармацевтической композиции по п.25 или 26 для изготовления лекарственного средства для лечения гемофилии А.



Фиг. 1



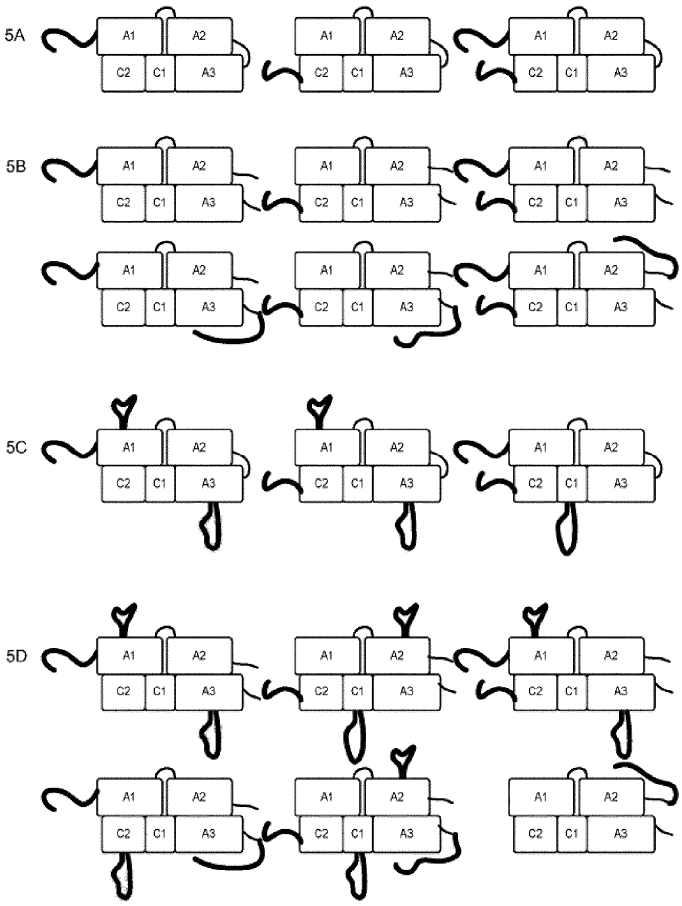
Фиг. 2

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFN
IAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ
REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR
EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNR
SLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLL
MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRF
DDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIG
RKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGI
TDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNME
RDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAG
VQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKH
KMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYE
DSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMP
KIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQ
LHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDN
TSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSW
GKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSL
LIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQK
KEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEG
QNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEK
KETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNR
TKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRL
PLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSI
PQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKK
NNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHI
YQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSK
LLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKP
EIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIY
DEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTD
GSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGA
EPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHT
NTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHA
INGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYP
GVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITAS
GQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQ
FIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRS
TLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWR
PQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKV
KVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

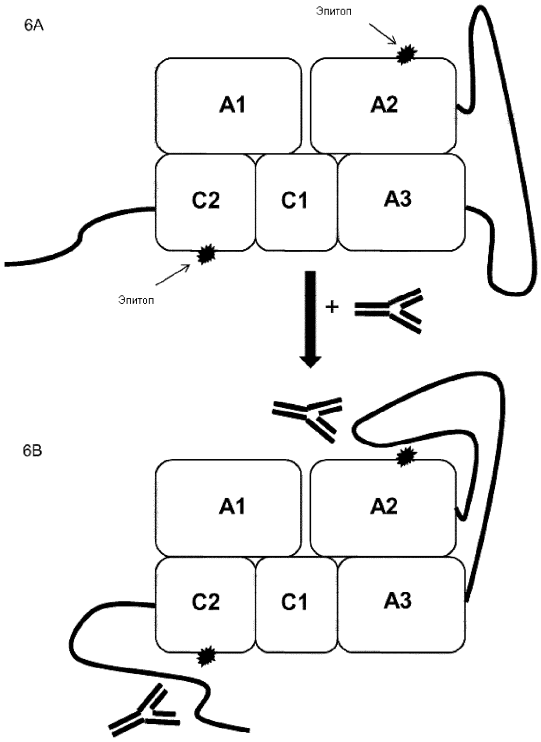
Фиг. 3

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFV
EFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVS
YWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTY
SYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSW
HSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGM
GTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHI
SSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDN
SPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGP
QRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQ
ASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDG
PTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRN
VILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDS
LQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGE
TVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISA
YLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKK
EDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGS
VPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQ
ASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF
DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTI
FDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVM
AQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETV
EMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQIT
ASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGAR
QKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNP
PIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASS
YFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQ
GVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLD
PPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

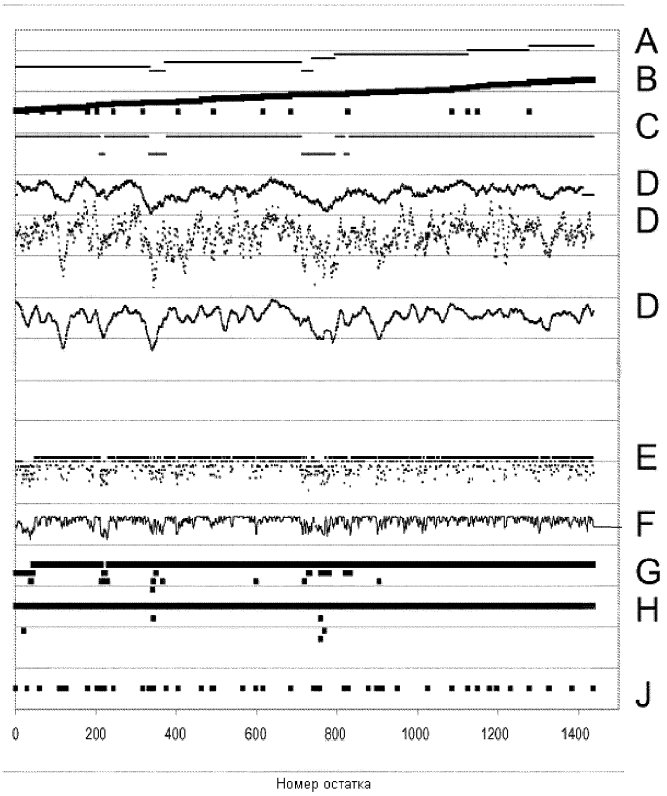
Фиг. 4


5A
5B
5C
5D
A1
A2
C2
C1
A3

Фиг. 5


6A
Эпитоп
A1
A2
C2
C1
A3
Эпитоп
+
6B
A1
A2
C2
C1
A3

Фиг. 6



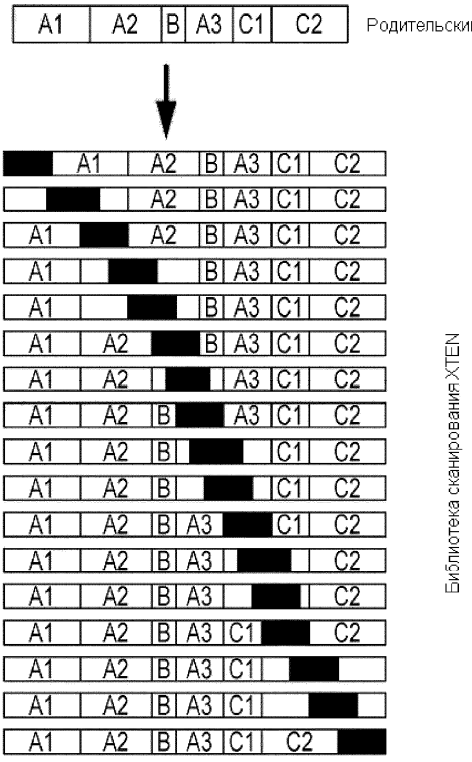
Фиг. 7

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL
FVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHA
VGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASD
PLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFA
VFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHR
KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLL
MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDL
TDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVL
APDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILG
PLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD
FPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGP
LLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAG
VQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS
VFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNR
GMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLK
RHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKK
TRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFT
QPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEE
DQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLE
KDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTEN
MERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL
LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAG
IWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYG
QWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFS
SLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPI
IARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASS
YFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVT
TQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVV
NSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

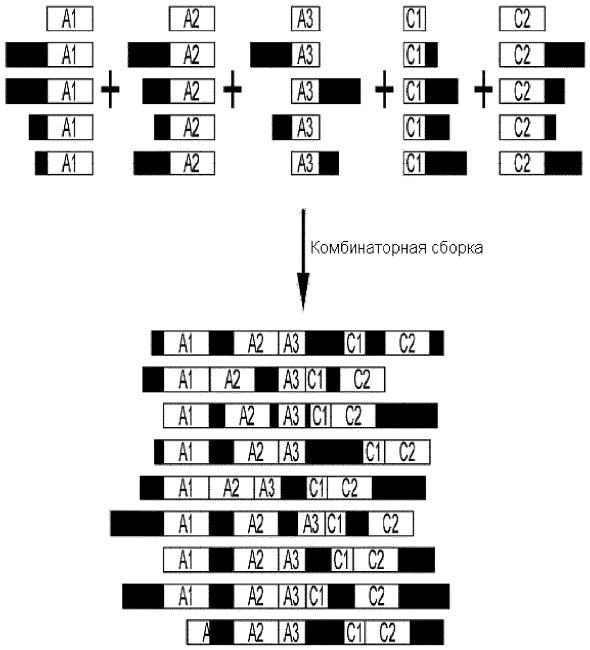
Фиг. 8

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL
FVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHA
VGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASD
PLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFA
VFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHR
KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLL
MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDL
TDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVL
APDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILG
PLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD
FPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGP
LLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAG
VQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS
VFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNR
GMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLK
RHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKK
TRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFT
QPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEE
DQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLE
KDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTEN
MERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL
LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAG
IWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYG
QWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFS
SLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPI
IARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASS
YFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVT
TQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVV
NSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

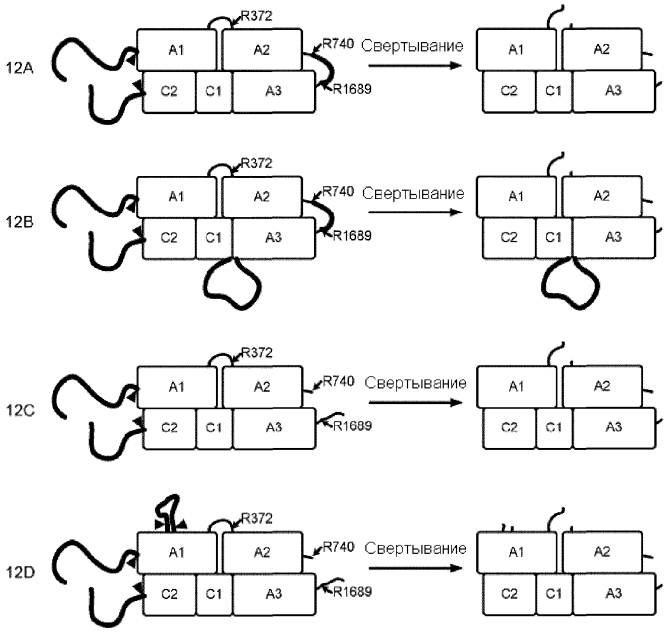
Фиг. 9



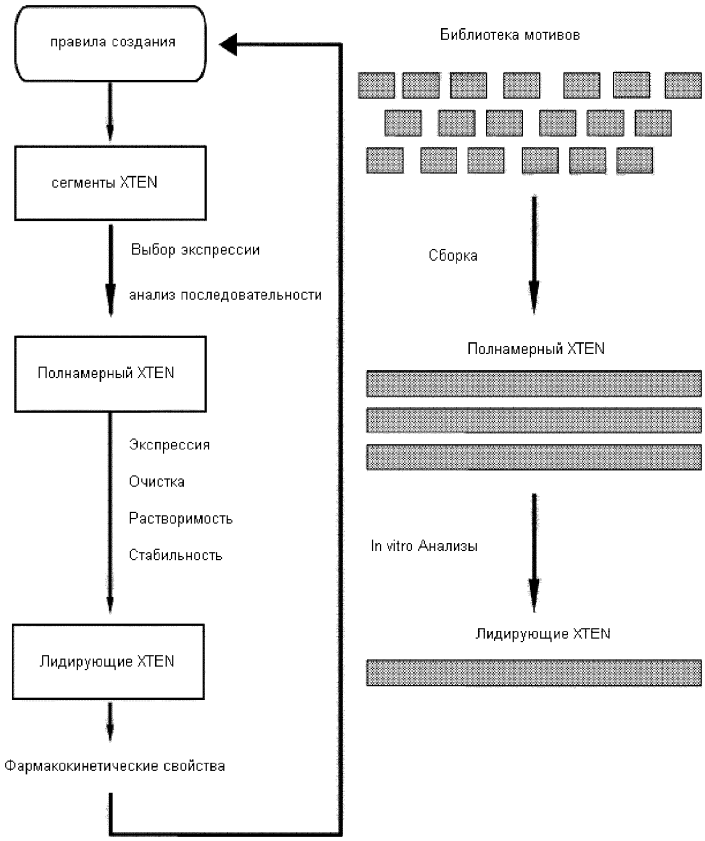
Фиг. 10


A1
A2
A3
C1
C2
Комбинаторная сборка

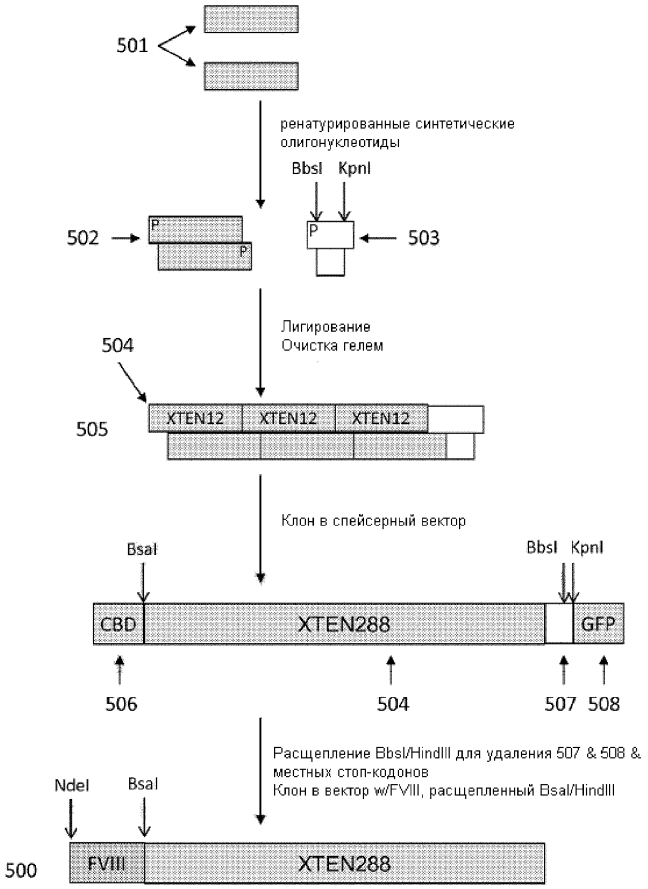
Фиг. 11


12A
12B
12C
12D
R372
R740
R1689
Свертывание
A1
A2
C2
C1
A3

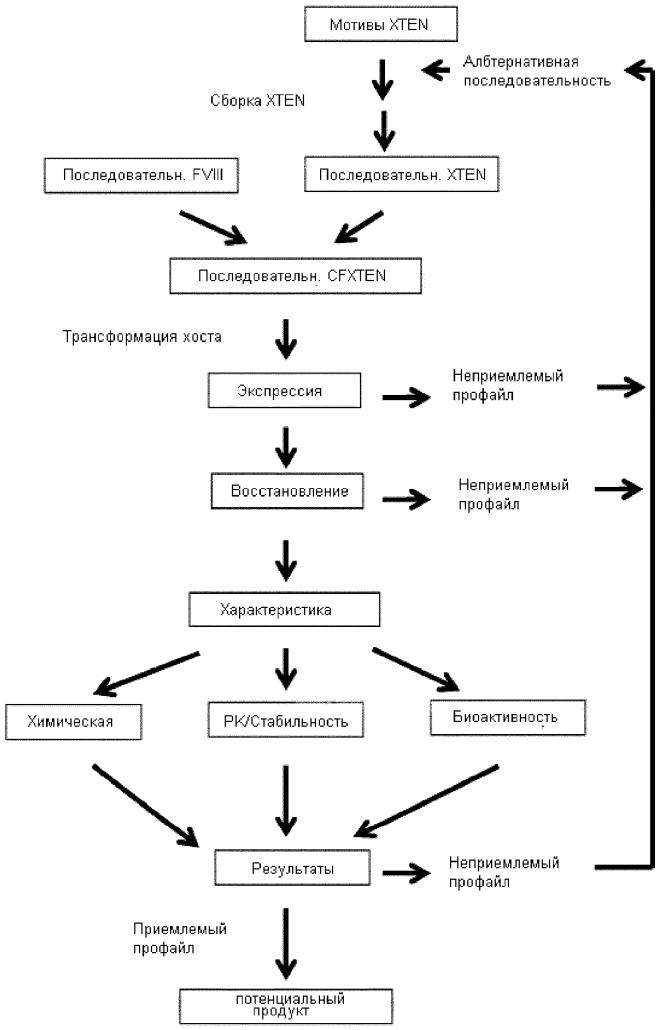
Фиг. 12


правила создания
сегменты XTEN
Выбор экспрессии
анализ последовательности
Полнамерный XTEN
Экспрессия
Очистка
Растворимость
Стабильность
Лидирующие XTEN
Фармакокинетические свойства
Библиотека мотивов
Сборка
Полнамерный XTEN
In vitro Анализы
Лидирующие XTEN

Фиг. 13


501
ренатурированные синтетические олигонуклеотиды
BbsI KpnI
502
503
P
Лигирование
Очистка гелем
504
505
XTEN12
XTEN12
XTEN12
Клон в спейсерный вектор
BsaI
BbsI KpnI
CBD
XTEN288
GFP
506
504
507 508
Расщепление BbsI/HindIII для удаления 507 & 508 & местных стоп-кодонов
Клон в вектор w/FVIII, расщепленный BsaI/HindIII
NdeI
BsaI
500
FVIII
XTEN288

Фиг. 14


Мотивы XTEN
Альтернативная последовательность
Сборка XTEN
Последовательн. FVIII
Последовательн. XTEN
Последовательн. CFXTEN
Трансформация хоста
Экспрессия
Неприемлемый профайл
Восстановление
Неприемлемый профайл
Характеристика
Химическая
PK/Стабильность
Биоактивность
Результаты
Неприемлемый профайл
Приемлемый профайл
потенциальный продукт

Фиг. 15

AG864_2

GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS
PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS
SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST
GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA
TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT
ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG
TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP
SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSST
PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGAS
PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS
STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG
SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP
GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS
PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS
SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP

AG576

PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATG
SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS
SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA
SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG
ATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS
GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPG
TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSST
PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS
TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS
STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGS

Фиг. 16A

AG864_2

GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS
PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS
SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST
GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA
TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT
ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG
TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP
SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSST
PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGAS
PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS
STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG
SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP
GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS
PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS
SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP

AG288_1

PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA
SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPS
ASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGS
SPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGS
PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA
TGS

Фиг. 16B

AG864_2

GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS
PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS
SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST
GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA
TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT
ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG
TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP
SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSST
PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGAS
PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS
STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG
SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP
GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS
PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS
SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP



AG144_2

PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST
GTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPG
TSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS

Фиг. 16C

AE864

GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA
PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST
EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG
SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG
SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP
TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP
SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG
SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP
ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP
AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS
EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE
GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG
PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS
APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP



AE576

GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG
SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS
PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS
TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP
GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPE
SGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP
SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS
TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP
GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE
SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP
SEGSAP

Фиг. 16D

AE864

GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA
PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST
EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG
SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG
SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP
TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP
SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG
SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP
ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP
AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS
EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE
GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG
PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS
APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP



AE288_2

GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE
SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA
TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS
ESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE
GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG
SAP

Фиг. 16E

AE864

GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS
APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT
STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP
SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP
ATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS
PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS
APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP
ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGS
PTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE
SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT
STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP
GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES
GPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE
GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP



AE144_1A

SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA
PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS
TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG

AE144_2B

TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG
PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG
SAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG

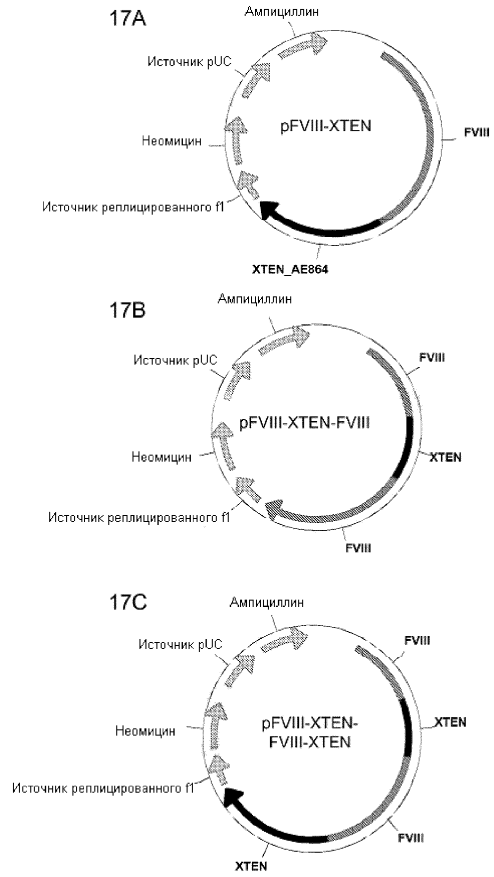
AE144_3A

SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA
PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG
SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG

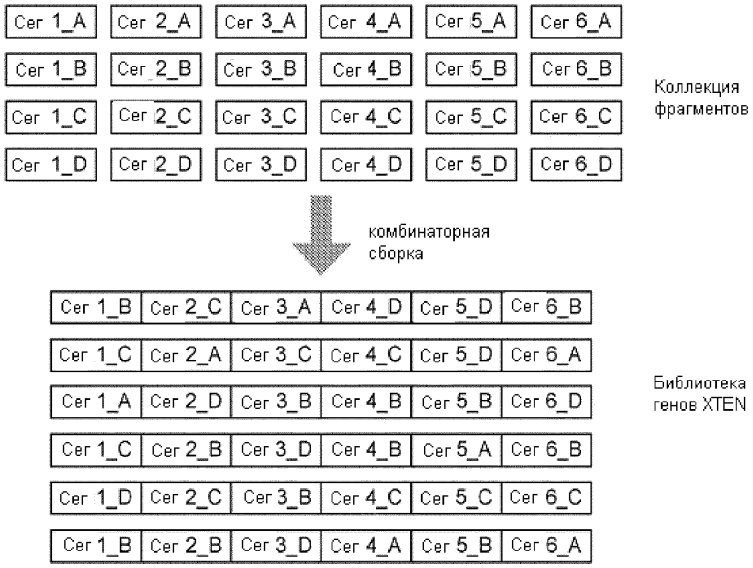
AE144_4B

TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG
PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS
TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG

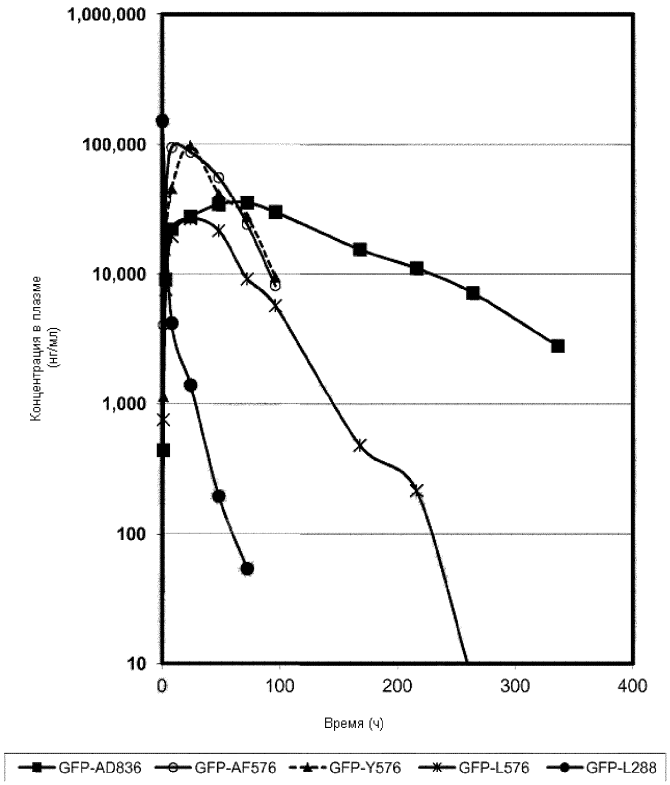
Фиг. 16F


17A
Ампициллин
Источник pUC
pFVIII-XTEN
FVIII
Неомицин
Источник реплицированного f1
XTEN_AE864
17B
Ампициллин
Источник pUC
FVIII
pFVIII-XTEN-FVIII
XTEN
Неомицин
Источник реплицированного f1
FVIII
17C
Ампициллин
Источник pUC
FVIII
pFVIII-XTEN-
FVIII-XTEN
XTEN
Неомицин
Источник реплицированного f1
FVIII
XTEN

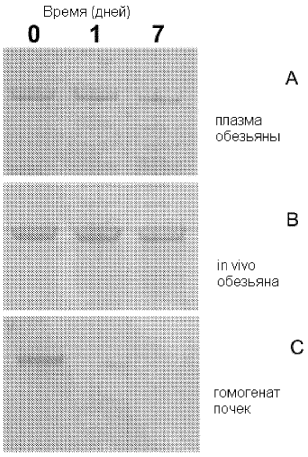
Фиг. 17


Cer 1_A
Cer 2_A
Cer 3_A
Cer 4_A
Cer 5_A
Cer 6_A
Cer 1_B
Cer 2_B
Cer 3_B
Cer 4_B
Cer 5_B
Cer 6_B
Cer 1_C
Cer 2_C
Cer 3_C
Cer 4_C
Cer 5_C
Cer 6_C
Cer 1_D
Cer 2_D
Cer 3_D
Cer 4_D
Cer 5_D
Cer 6_D
Коллекция фрагментов
комбинаторная сборка
Cer 1_B Cer 2_C Cer 3_A Cer 4_D Cer 5_D Cer 6_B
Cer 1_C Cer 2_A Cer 3_C Cer 4_C Cer 5_D Cer 6_A
Cer 1_A Cer 2_D Cer 3_B Cer 4_B Cer 5_B Cer 6_D
Cer 1_C Cer 2_B Cer 3_D Cer 4_B Cer 5_A Cer 6_B
Cer 1_D Cer 2_C Cer 3_B Cer 4_C Cer 5_C Cer 6_C
Cer 1_B Cer 2_B Cer 3_D Cer 4_A Cer 5_B Cer 6_A
Библиотека генов XTEN

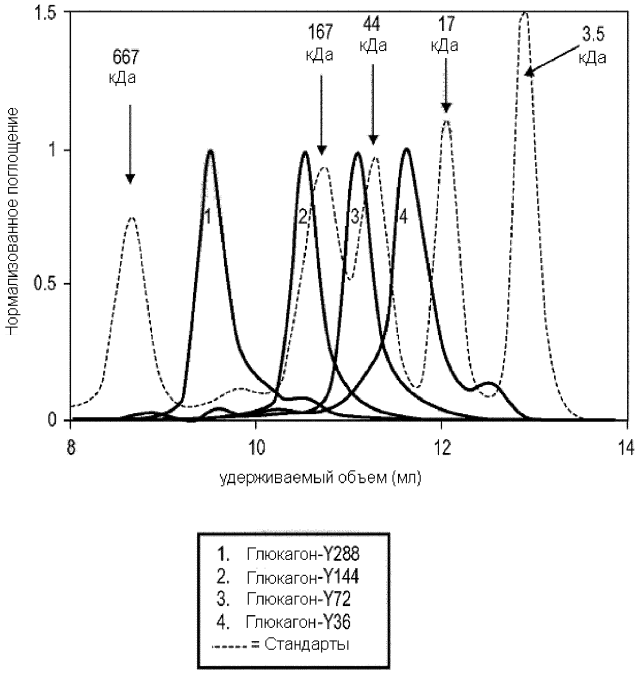
Фиг. 18


1,000,000
100,000
10,000
1,000
100
10
Концентрация в плазме (нг/мл)
0
100
200
300
400
Время (ч)
GFP-AD836
GFP-AF576
GFP-Y576
GFP-L576
GFP-L288

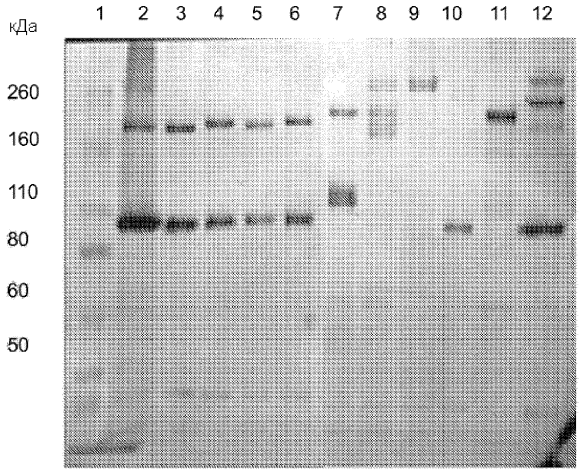
Фиг. 19


Время (дней)
0
1
7
A
плазма обезьяны
B
in vivo обезьяна
C
гомогенат почек

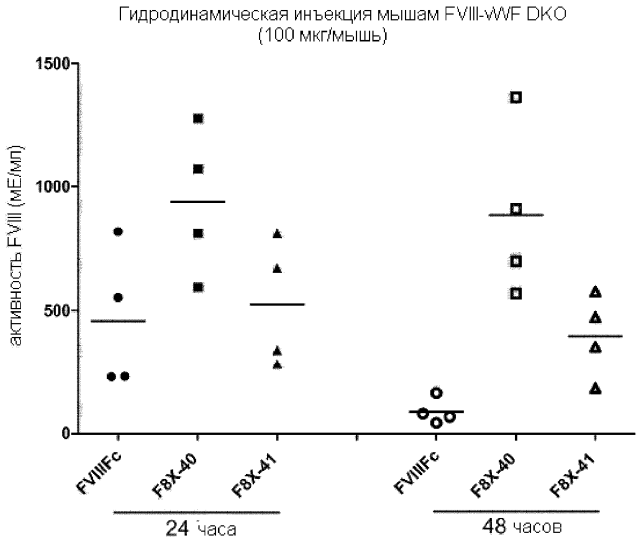
Фиг. 20



Фиг. 21

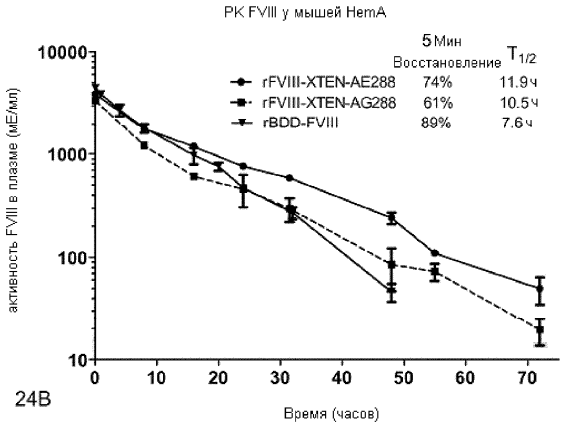


Фиг. 22

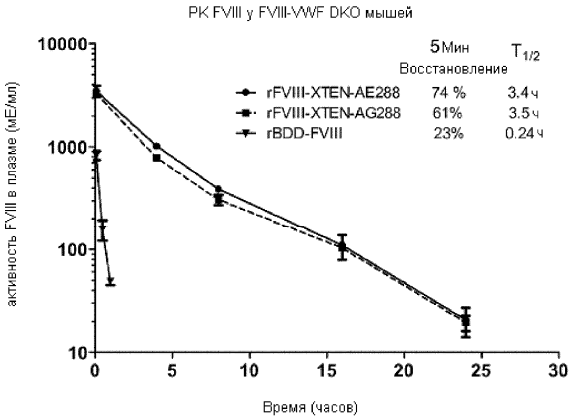


Фиг. 23

24A

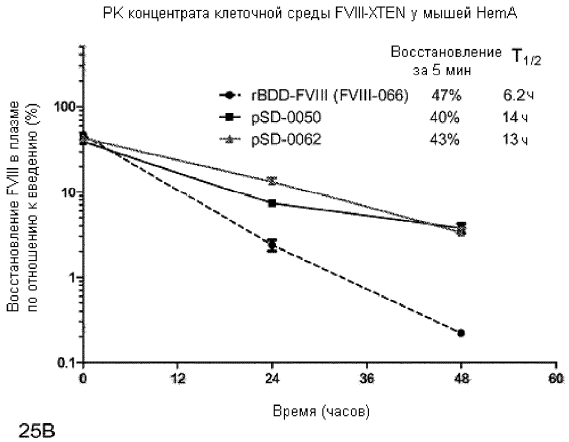


24B

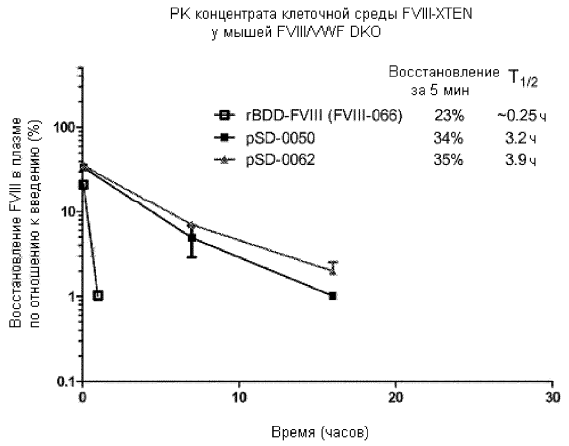


Фиг. 24

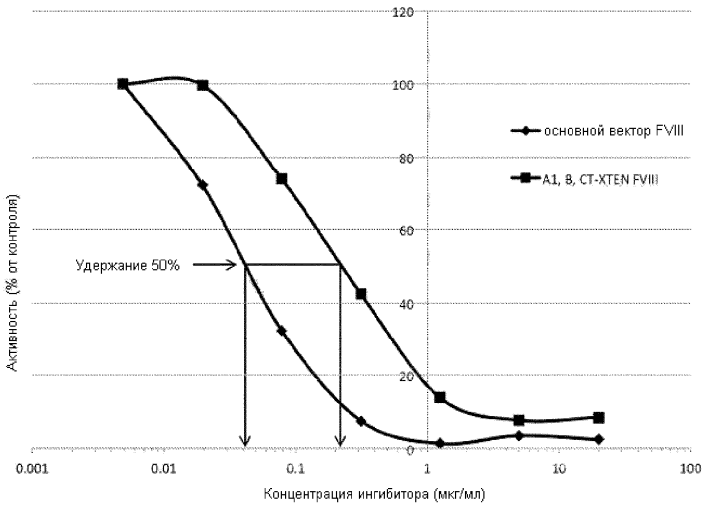
25A



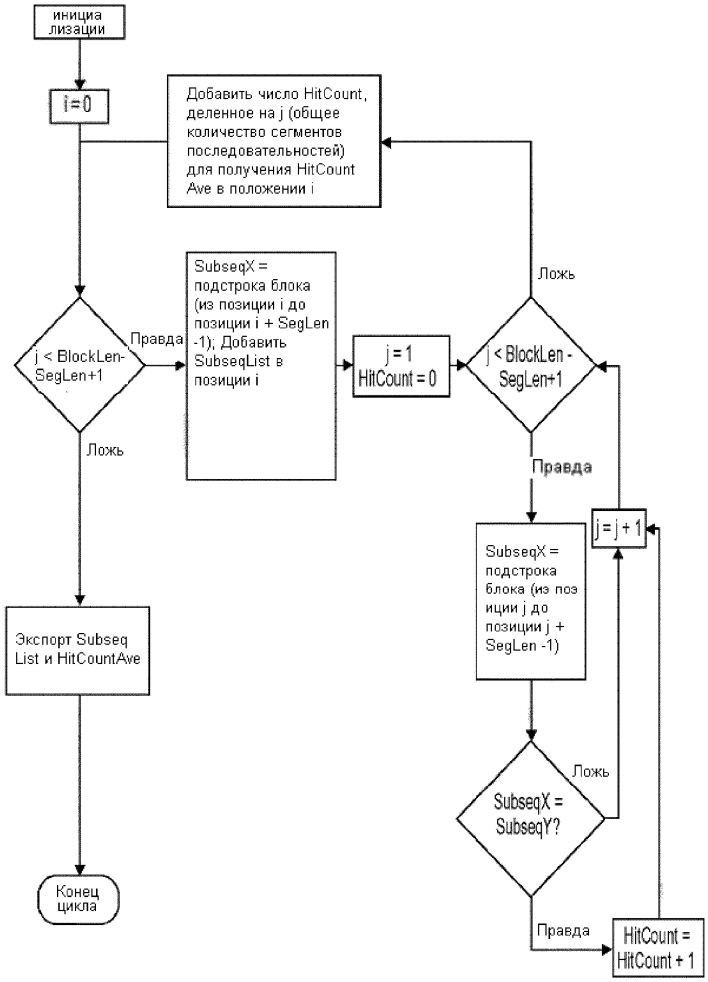
25B



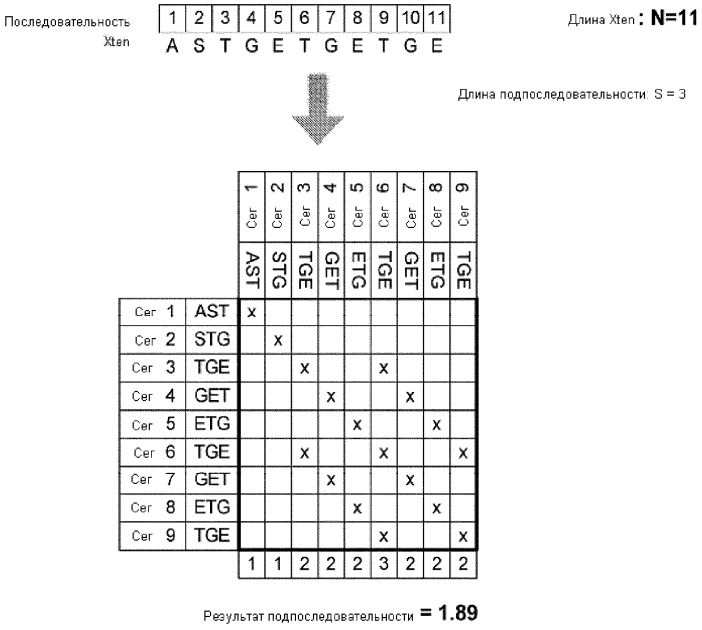
Фиг. 25



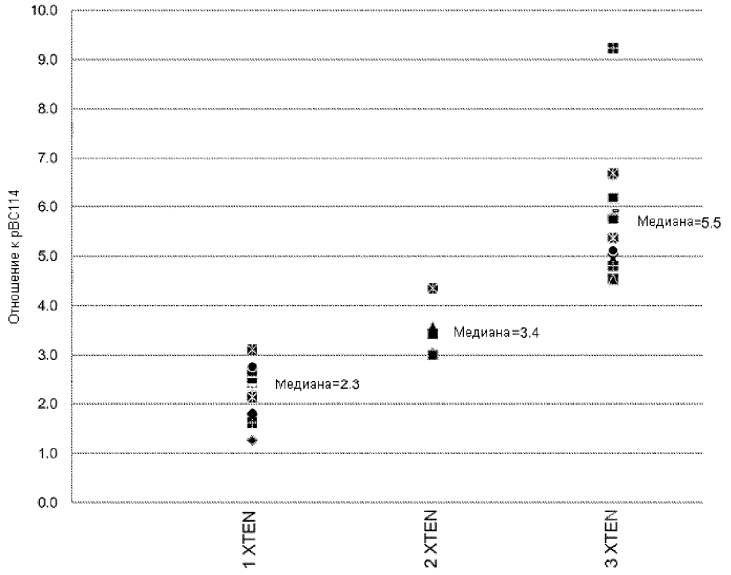
Фиг. 26


инициа
лизации
i=0
Добавить число HitCount, деленное на j (общее количество сегментов последовательностей) для получения HitCount Ave в положении i
j < BlockLen-SegLen+1
Правда
Ложь
SubseqX = подстрока блока (из позиции i до позиции i + SegLen -1); Добавить SubseqList в позиции i
j = 1
HitCount = 0
j < BlockLen - SegLen+1
Ложь
Правда
j = j + 1
SubseqX = подстрока блока (из позиции j до позиции j + SegLen -1)
SubseqX = SubseqY?
Ложь
Правда
HitCount = HitCount + 1
Экспорт Subseq List и HitCountAve
Конец цикла

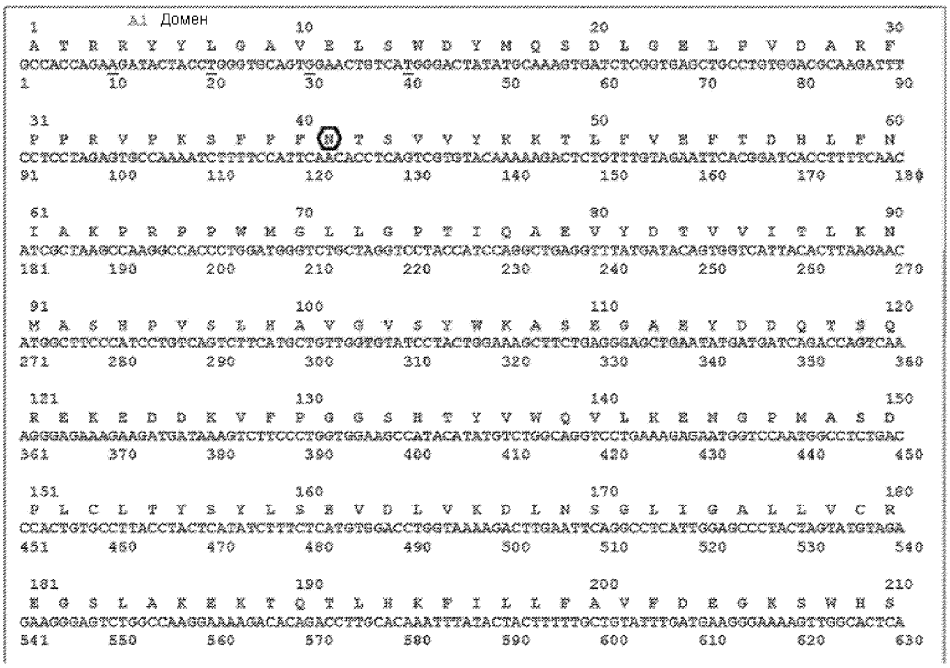
Фиг. 27


Последовательность Xten
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
A S T G E T G E T G E
Длина Xten: N=11
Длина подпоследовательности: S = 3
Cer 1 AST
Cer 2 STG
Cer 3 TGE
Cer 4 GET
Cer 5 ETG
Cer 6 TGE
Cer 7 GET
Cer 8 ETG
Cer 9 TGE
1 1 2 2 2 3 2 2 2
Результат подпоследовательности = 1.89

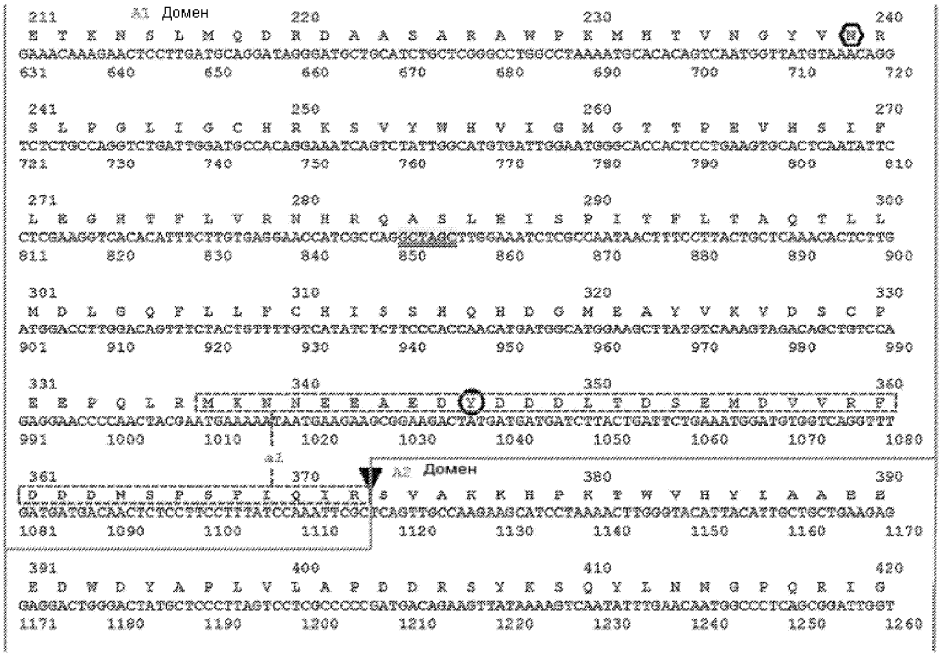
Фиг. 28



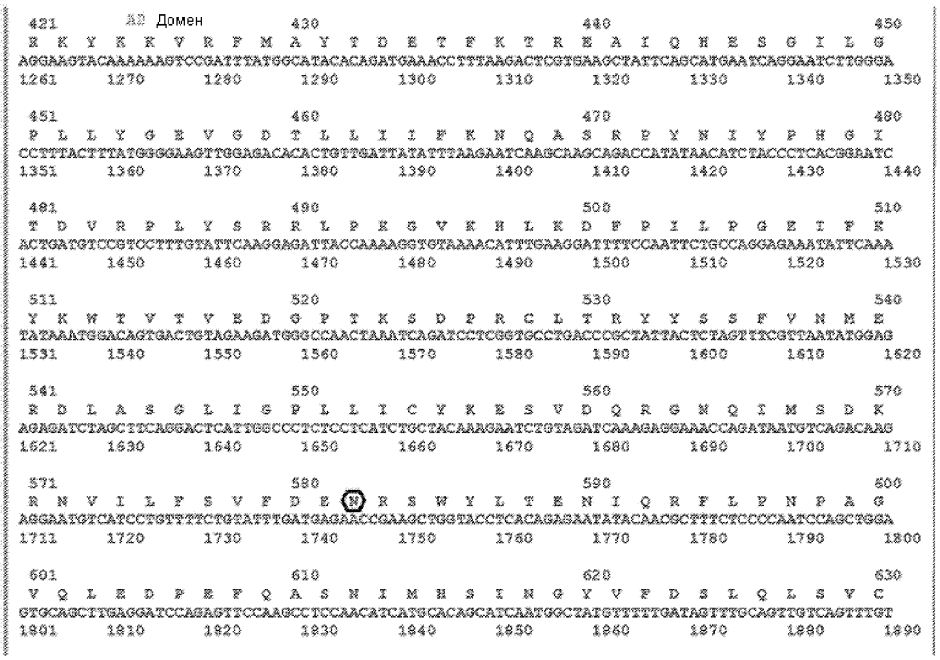
Фиг. 29



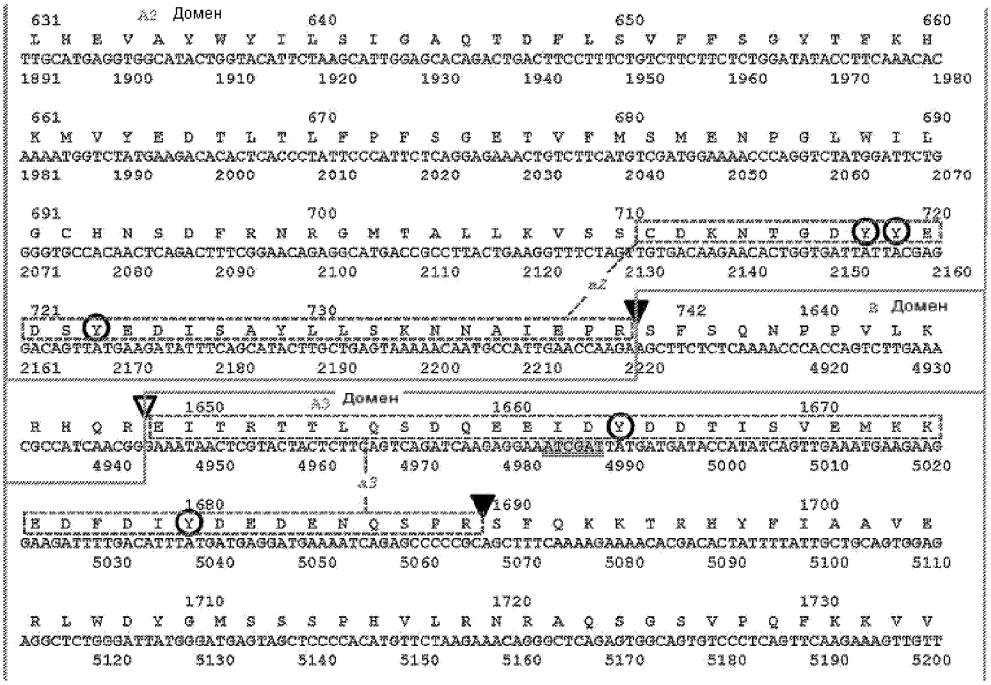
Фиг. 30A



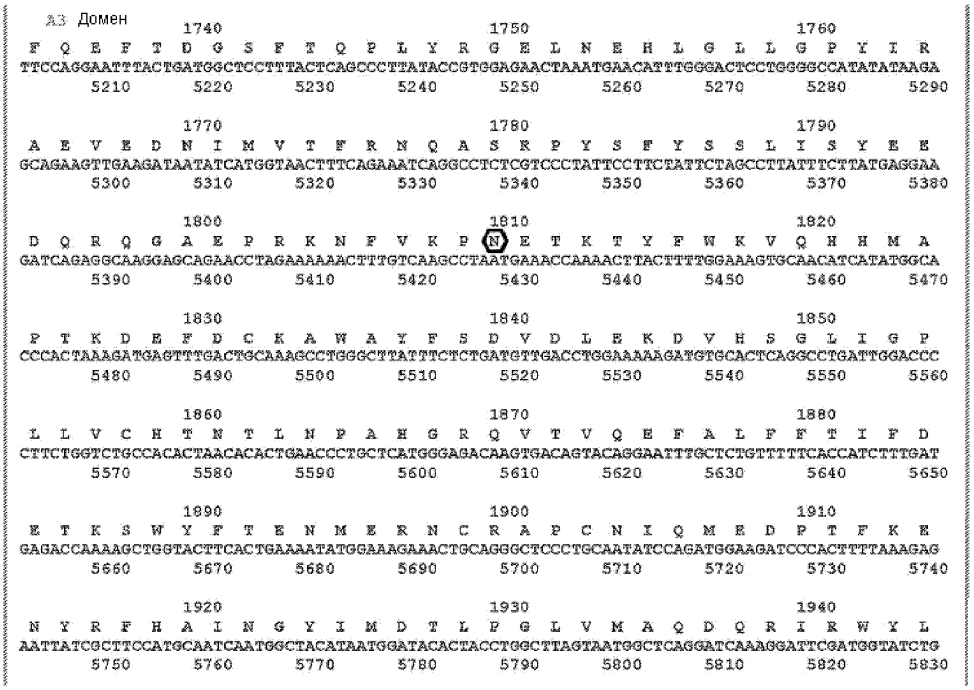
Фиг. 30B



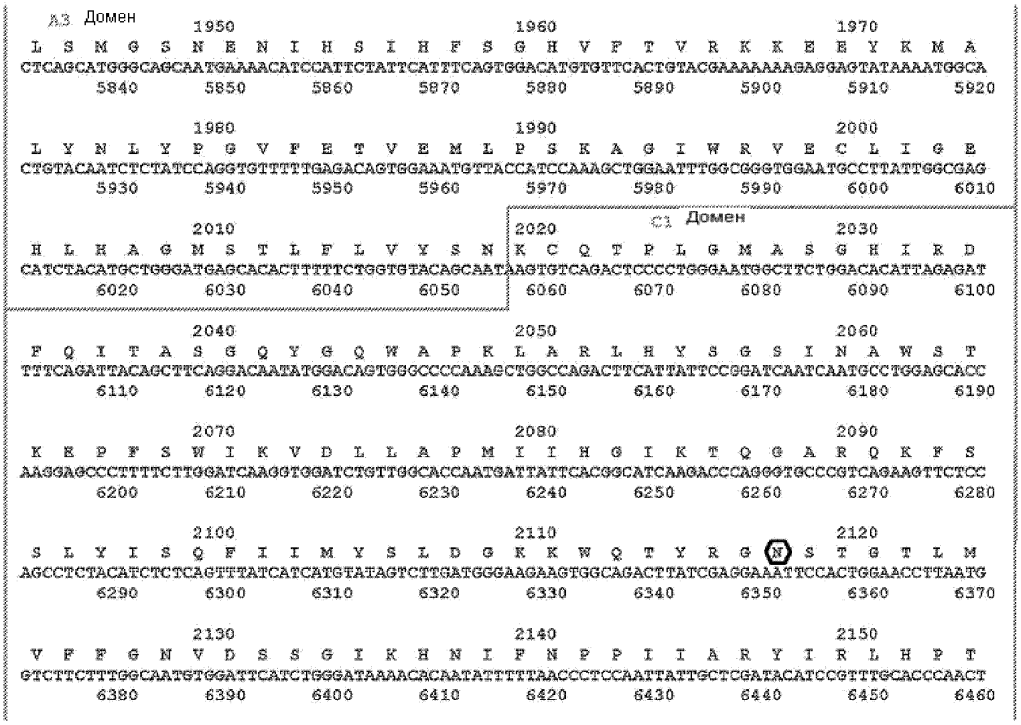
Фиг. 30C



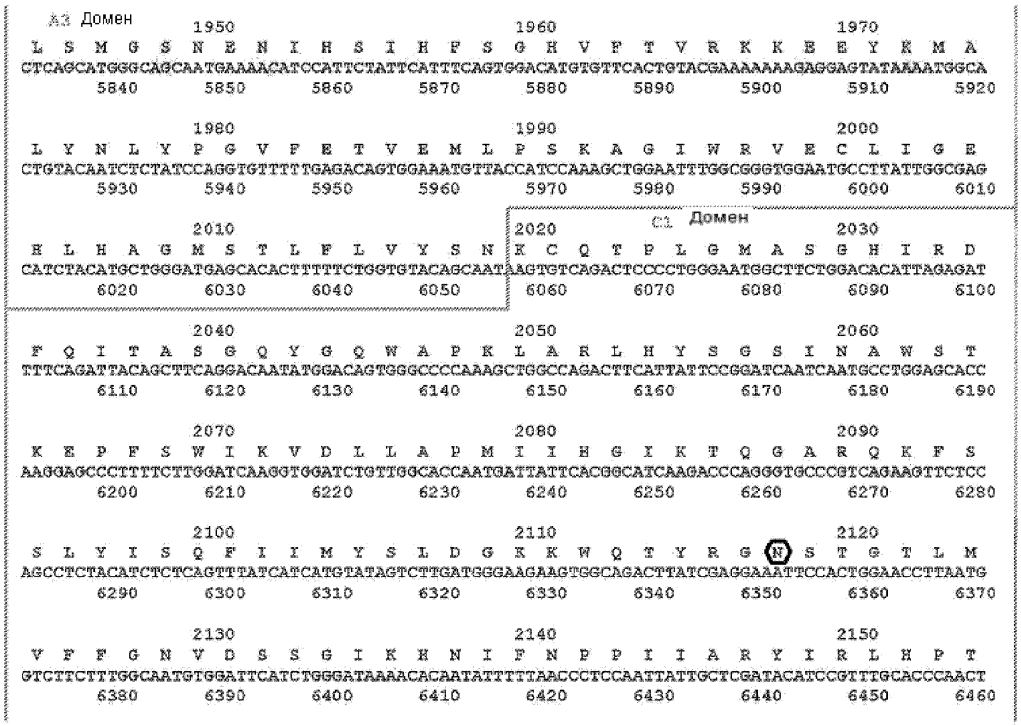
Фиг. 30D

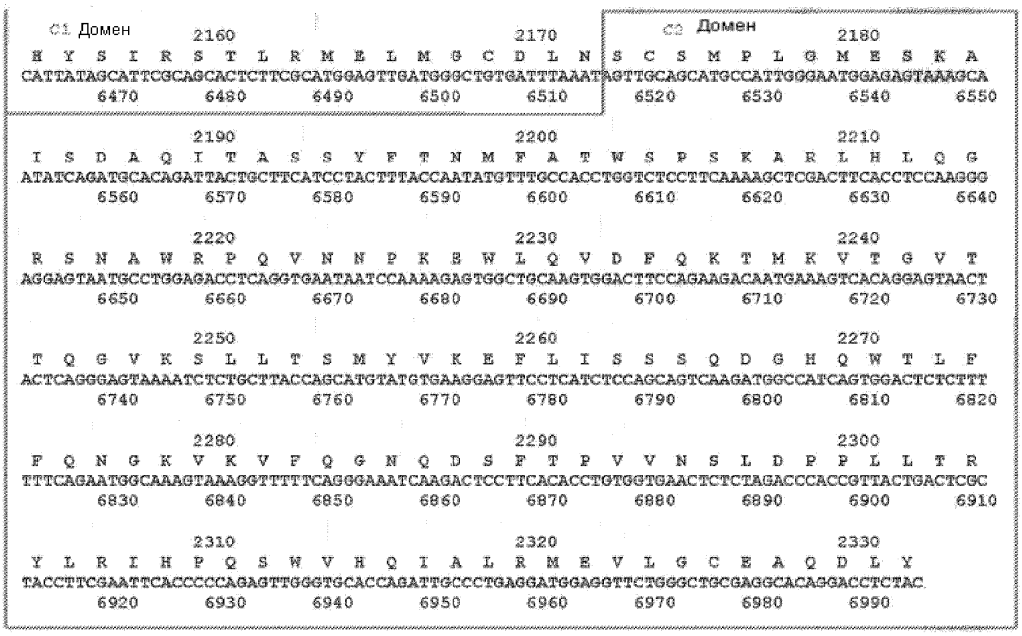


Фиг. 30E

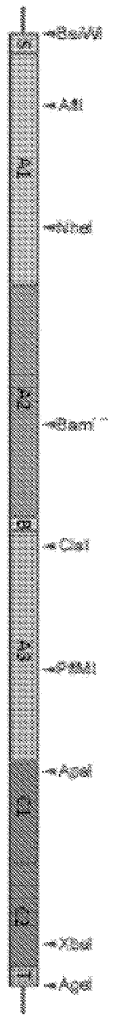


Фиг. 30F

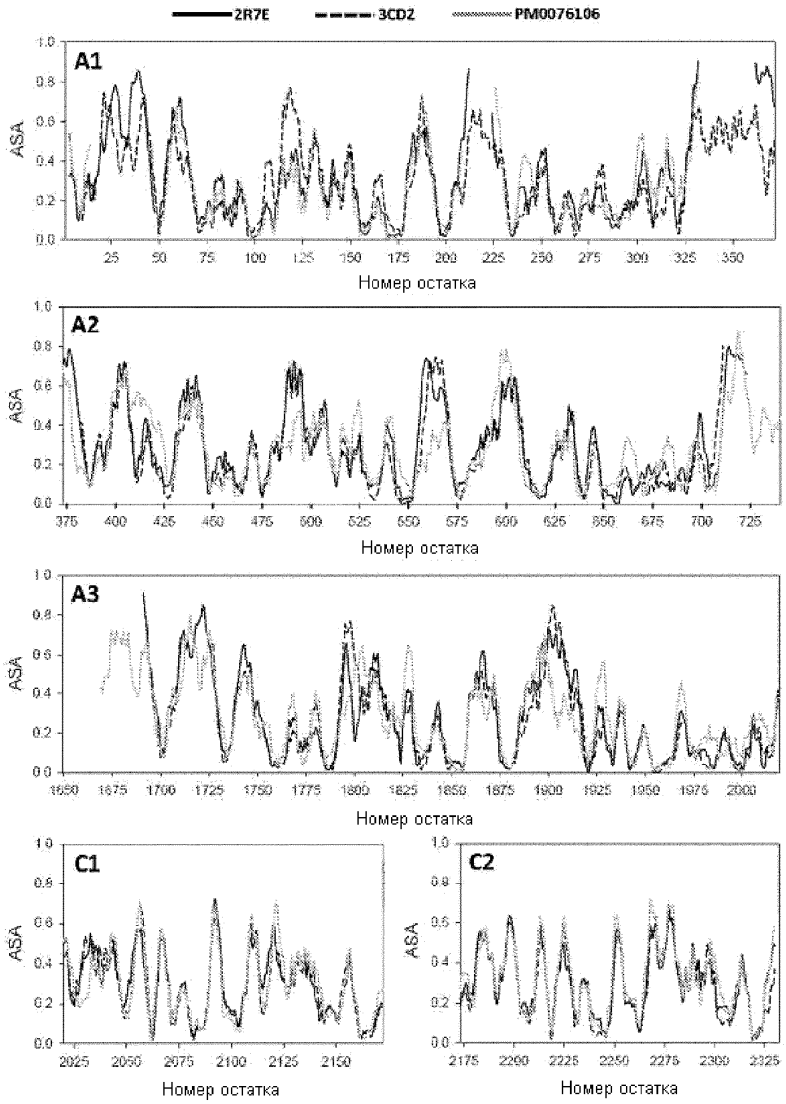




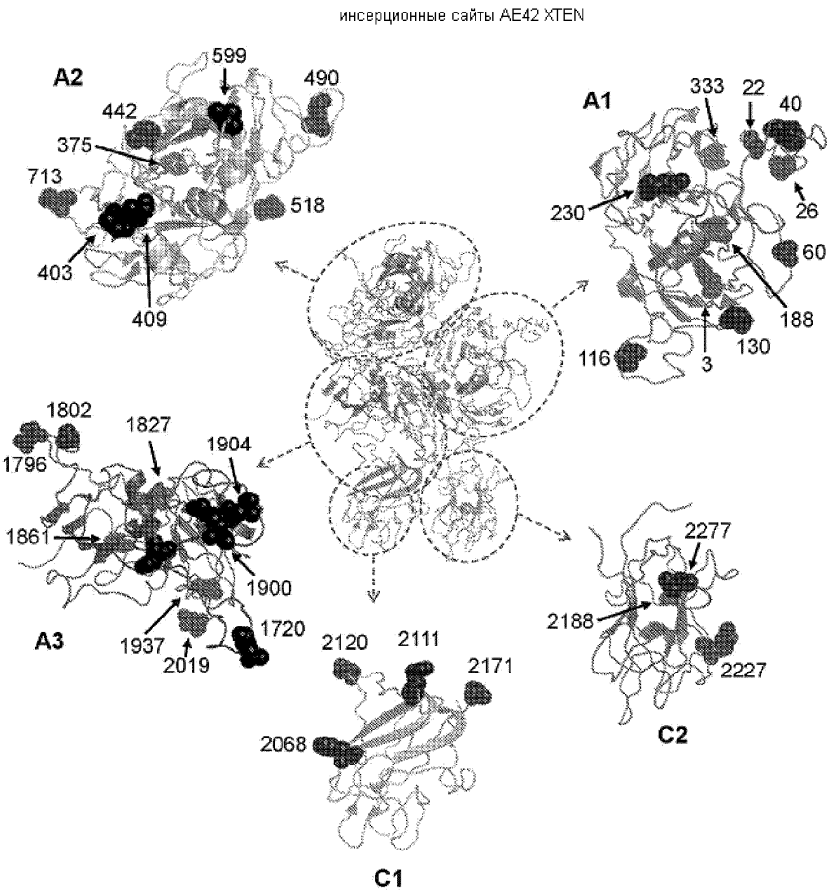
Фиг. 30G



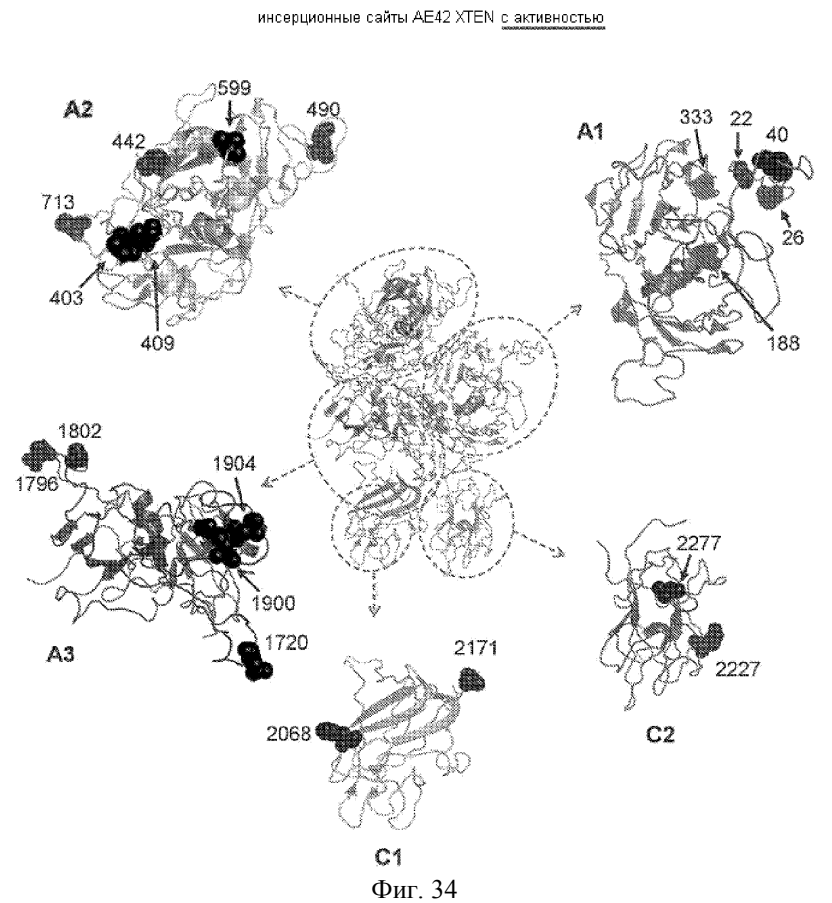
Фиг. 31



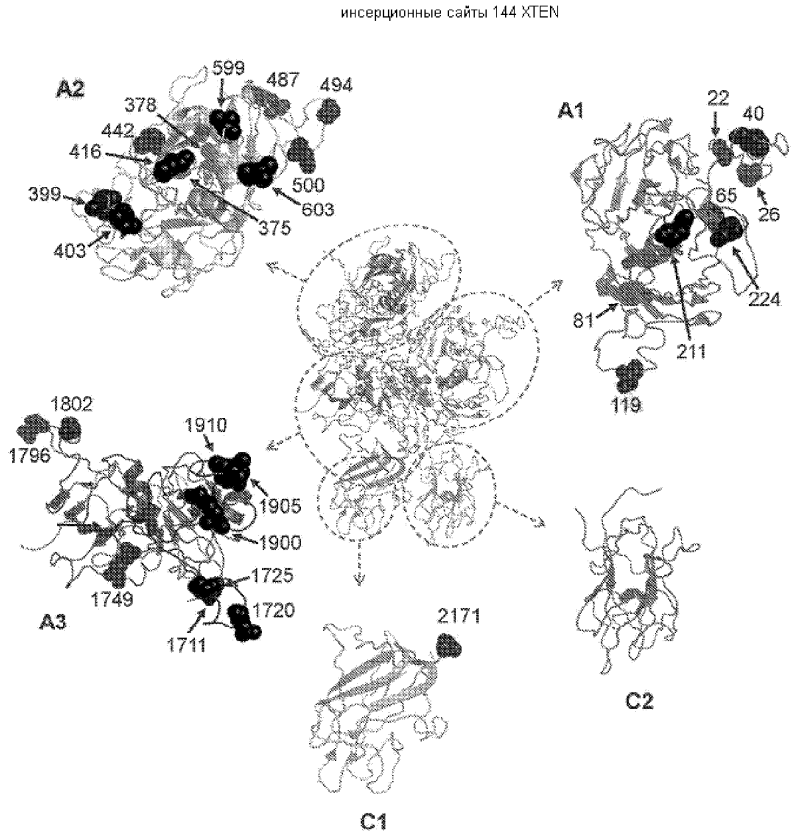
Фиг. 32


инсерционные сайты AE42 XTEN
A2
599
490
442
375
713
518
403
409
A1
333
22
40
230
26
60
188
116
3
130
1802
1827
1904
1796
1861
1900
A3
1937
1720
2019
2120
2111
2171
2068
2277
2188
2227
C2
C1

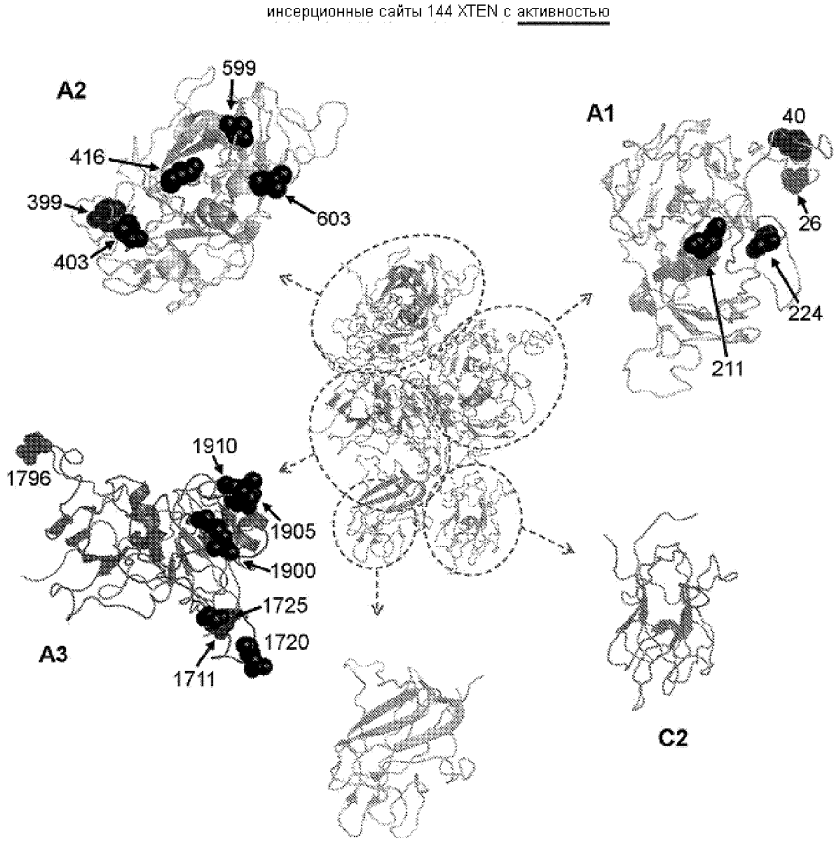
Фиг. 33


инсерционные сайты AE42 XTEN с активностью
A2
599
490
442
713
403
409
A1
333
22
40
26
188
1802
1904
1796
1900
A3
1720
2171
2068
2277
2227
C2
C1

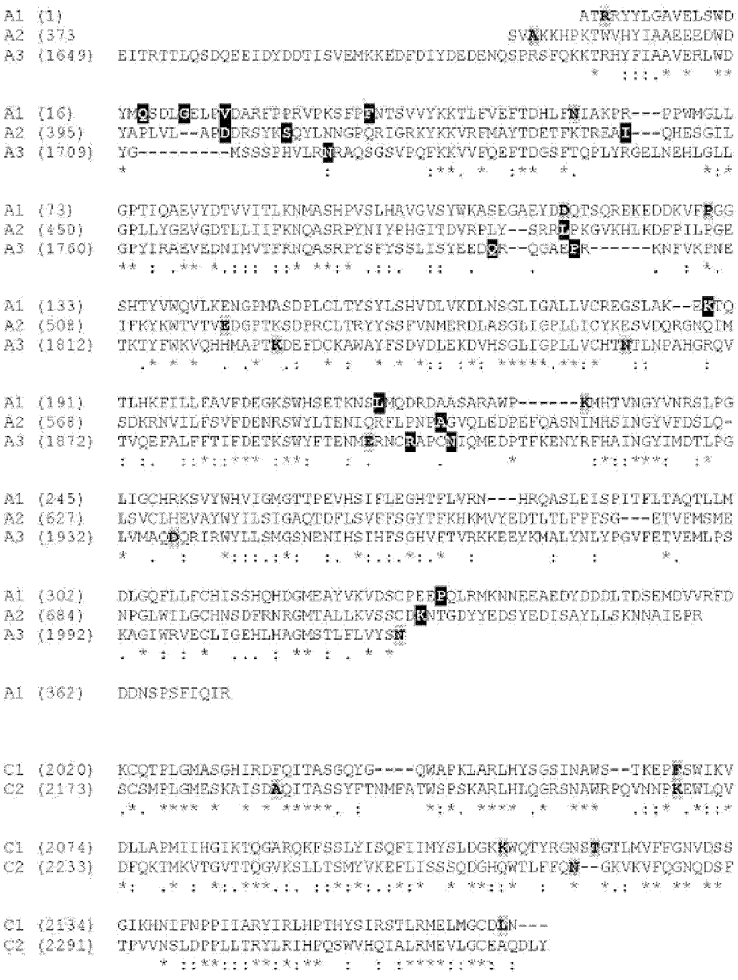
Фиг. 34


инсерционные сайты 144 XTEN
A2
599
487
494
378
442
416
500
603
399
375
403
A1
22
40
65
26
224
81
211
119
1802
1796
1910
1905
1900
1725
1749
1720
A3
1711
2171
C2
C1

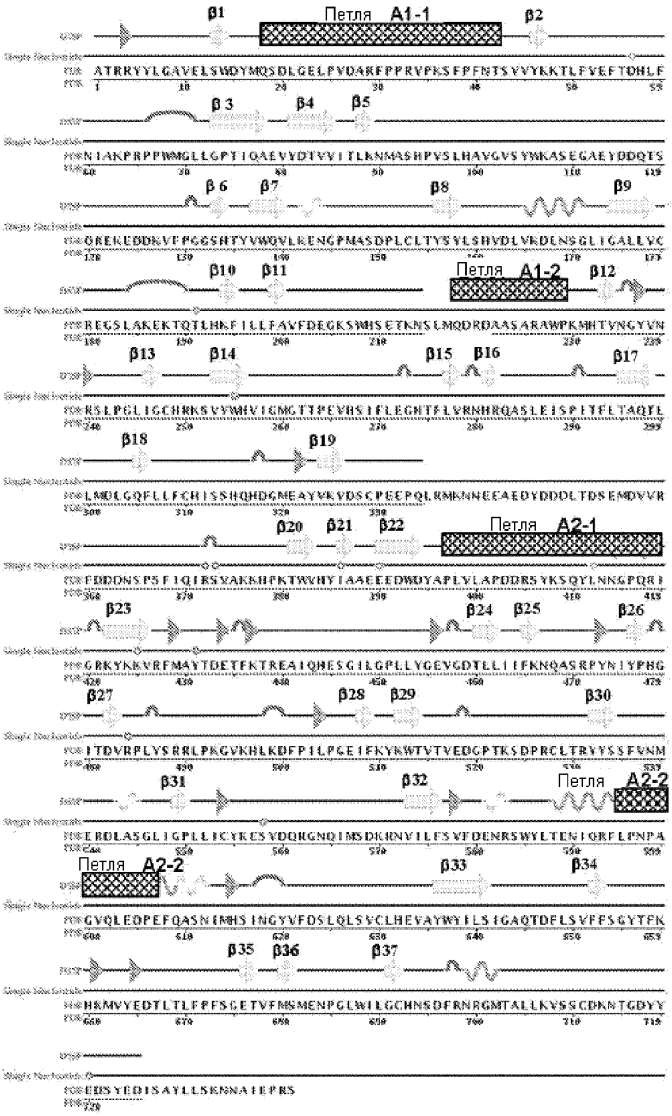
Фиг. 35


инсерционные сайты 144 XTEN с активностью
A2
599
416
399
603
403
A1
40
26
224
211
1910
1796
1905
1900
1725
1720
A3
1711
C2
C1

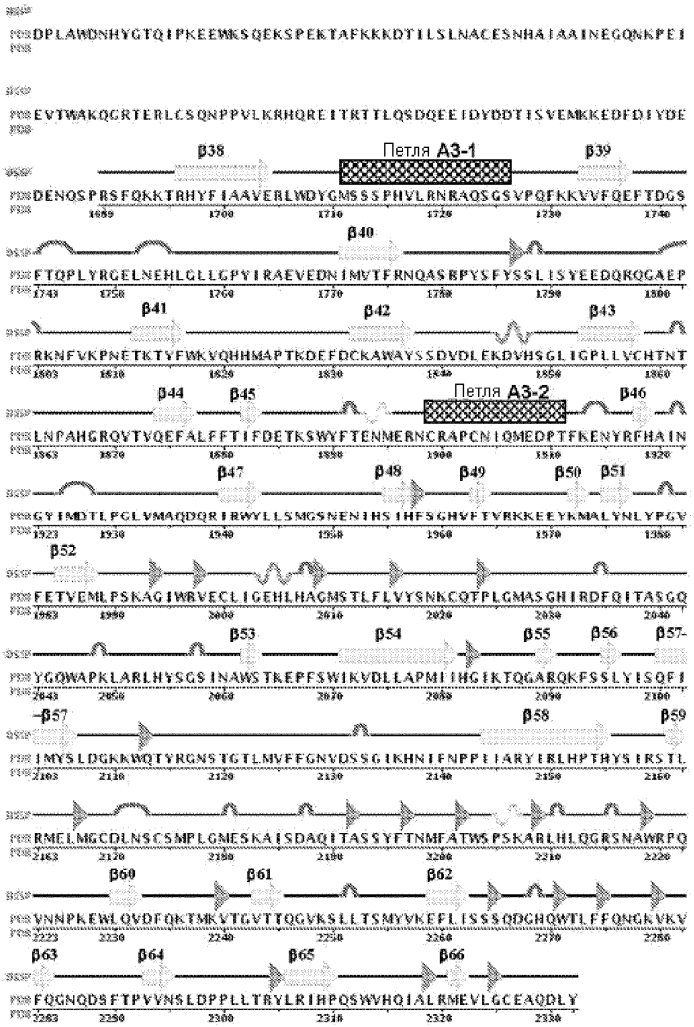
Фиг. 36



Фиг. 37


β1
Петля A1-1
β2
β3
β4
β5
β6
β7
β8
β9
β10
β11
Петля A1-2
β12
β13
β14
β15
β16
β17
β18
β19
β20
β21
β22
Петля A2-1
β23
β24
β25
β26
β27
β28
β29
β30
β31
β32
Петля A2-2
Петля A2-2
β33
β34
β35
β36
β37

Фиг. 38



Фиг. 39

```
A1 (1)                                                          ATRRYYLGAVELSWD
A2 (373                                                      SVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWD
A3 (1649)  EITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWD
                                                                *  :::.* *  **

A1 (16)    YQSDLGELEVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPR---PPWMGLL
A2 (395)   YPPLVL--APDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAI---QHESGIL
A3 (1709)  YS---------MSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLL
           *                    :  :**. *  :**  *.          *:*

A1 (73)    GPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGG
A2 (450)   GPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLY--SRRLPKGVKHLKDFPILPGE
A3 (1760)  GPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQR--QGAEPR------KNFVKPNE
           ** : .** *.::: ::* **:* .::.  ::  .     .           .  : *.

A1 (133)   SHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAK--EKTQ
A2 (508)   IFKYKNTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIM
A3 (1812)  TKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQV
             .* * *  . .*  .:  * :  * * *:: :*: *****.**:*   ::      :

A1 (191)   TLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWP-------KMHTVNGYVNRSLPG
A2 (568)   SDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQ-
A3 (1872)  TVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPG
           : :.  ::*:;*** :**:    : .       .           :*::***:  :*

A1 (245)   LIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRN---HRQASLEISPITFLTAQTLLM
A2 (627)   LSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSG---ETVFMSME
A3 (1932)  LVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS
           *  .  :   *:::.:*:  :. *:.:.*:.*  :       :   :      *.

A1 (302)   DLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD
A2 (684)   NPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR
A3 (1992)  KNGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSN
           . * : : *  ... : ** : . * *

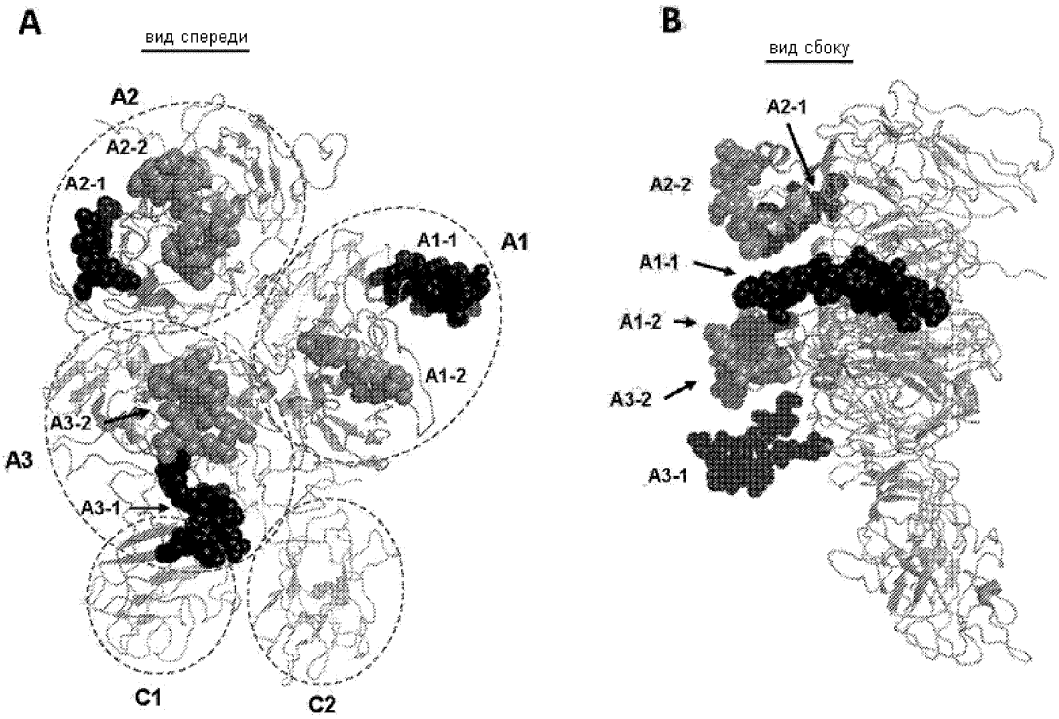
A1 (362)   DDNSPSFIQIR


C1 (2020)  KCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYG----QWAPKLARLHYSGSINAWS--TKEPFSWIKV
C2 (2173)  SCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQV
           .*. **** *  * * *****. :      *:*. **** .*  ***   .::* .*::*

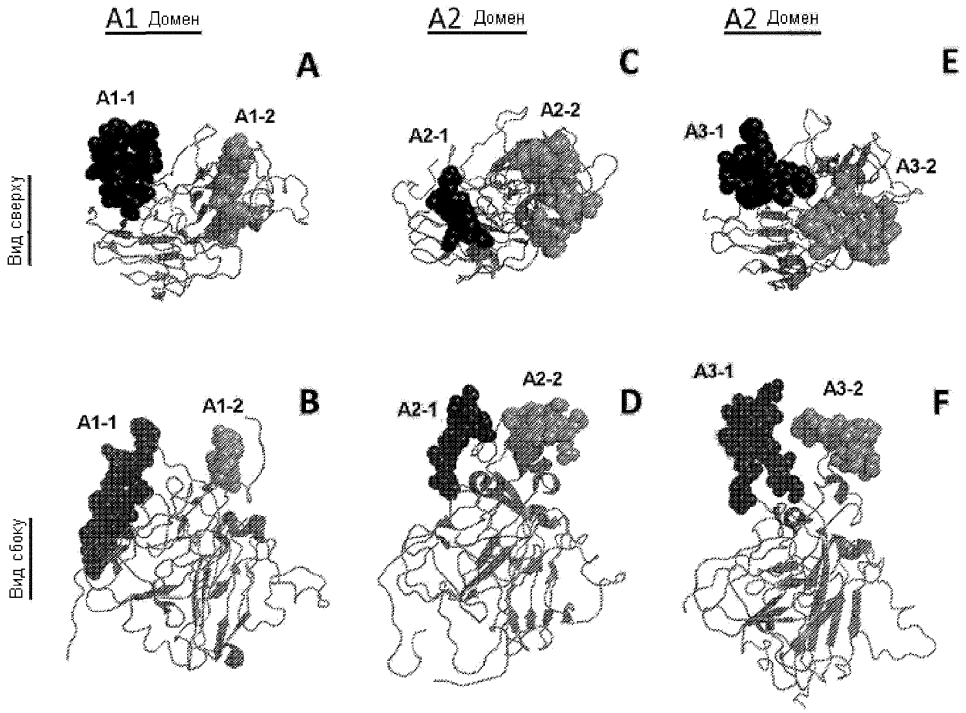
C1 (2074)  DLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSS
C2 (2233)  DFQKIMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQN--GKVKVFQGNQDSF
           *:  .* : *:.***.:. ::*:*:.:*:*  * **::*  :  *  *.: ** ** **

C1 (2134)  GIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLN---
C2 (2291)  TPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
               * ::**:::**:*:**  :  : :****::**: :
```

Фиг. 40



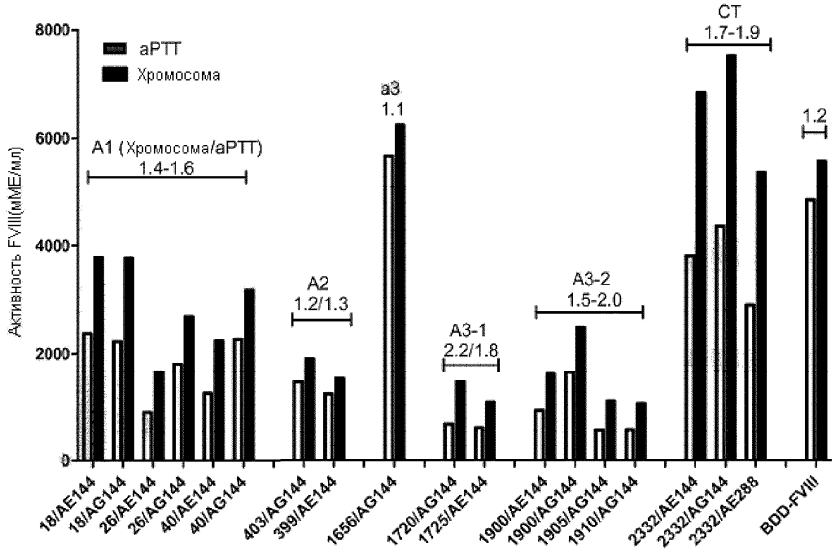
Фиг. 41



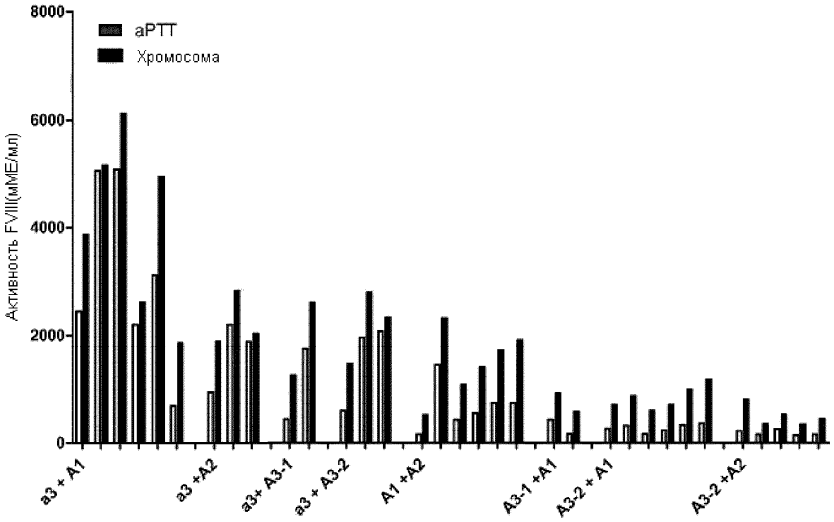
Фиг. 42



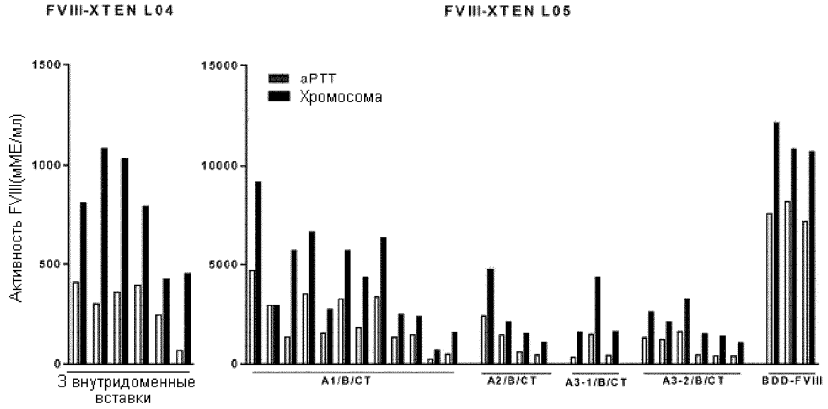
Фиг. 43



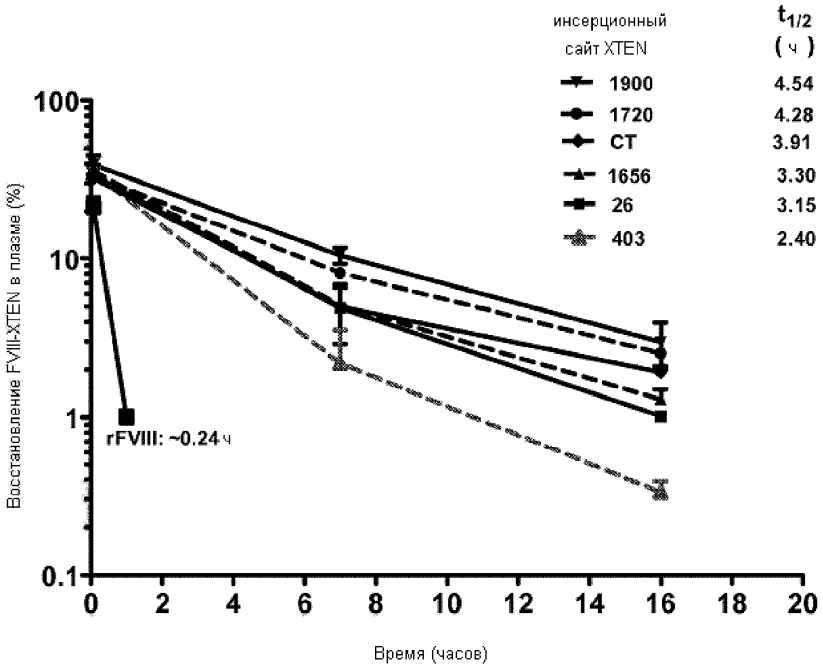
Фиг. 44



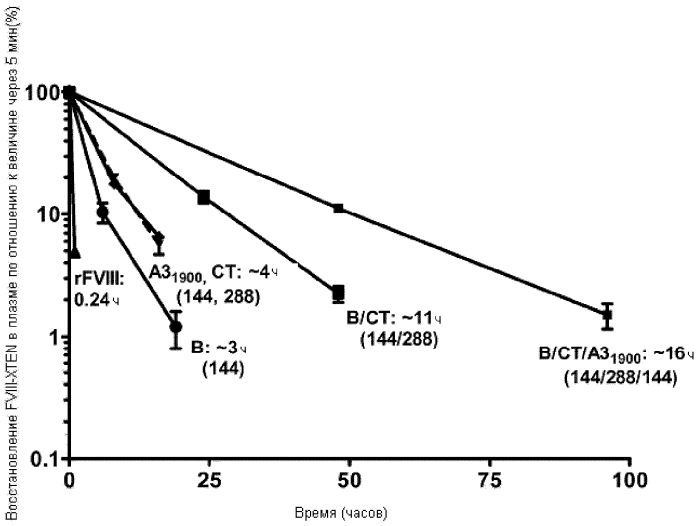
Фиг. 45



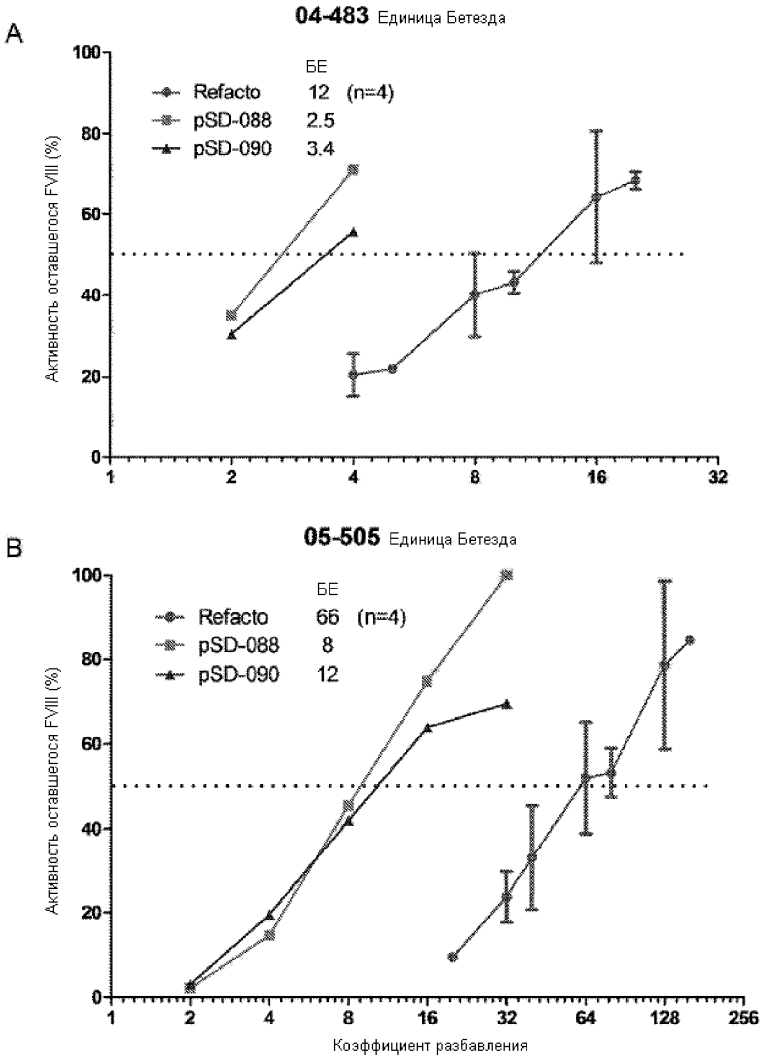
Фиг. 46

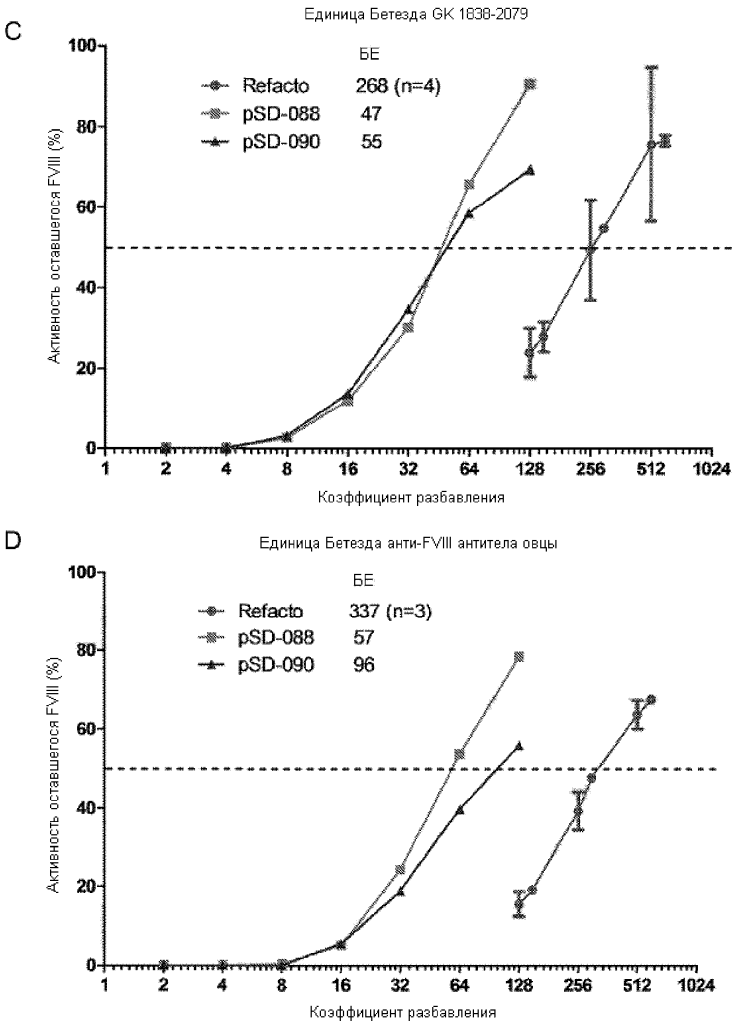


Фиг. 47


Восстановление FVIII-XTEN в плазме по отношению к величине через 5 мин(%)
100
10
1
0.1
0
25
50
75
100
Время (часов)
rFVIII:
0.24 ч
A3$_{1900}$, CT: ~4 ч
(144, 288)
B: ~3 ч
(144)
B/CT: ~11 ч
(144/288)
B/CT/A3$_{1900}$: ~16 ч
(144/288/144)

Фиг. 48


A
04-483 Единица Бетезда
БЕ
Refacto 12 (n=4)
pSD-088 2.5
pSD-090 3.4
Активность оставшегося FVIII (%)
100
80
60
40
20
0
1
2
4
8
16
32
B
05-505 Единица Бетезда
БЕ
Refacto 66 (n=4)
pSD-088 8
pSD-090 12
Активность оставшегося FVIII (%)
100
80
60
40
20
0
1
2
4
8
16
32
64
128
256
Коэффициент разбавления


C
Единица Бетезда GK 1838-2079
БЕ
Refacto 268 (n=4)
pSD-088 47
pSD-090 55
Активность оставшегося FVIII (%)
Коэффициент разбавления
D
Единица Бетезда анти-FVIII антитела овцы
БЕ
Refacto 337 (n=3)
pSD-088 57
pSD-090 96
Активность оставшегося FVIII (%)
Коэффициент разбавления

Фиг. 49