

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202292475** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2023.10.30**

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

(22) Дата подачи заявки  
**2014.06.27**

---

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

---

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

(32) **2013.06.28**

(33) **US**

(62) **201592022; 2014.06.27**

(71) Заявитель:  
**БИОВЕРАТИВ ТЕРАПЬЮТИКС  
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

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

(74) Представитель:

**Строкова О.В., Гизатуллин Ш.Ф.,  
Гизатуллина Е.М., Джермакян Р.В.,  
Христофоров А.А., Угрюмов В.М.,  
Костюшенкова М.Ю. (RU)**

---

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

**A1**

**202292475**

**202292475**

**A1**

# РАСЩЕПЛЯЕМЫЙ ТРОМБИНОМ ЛИНКЕР, СОДЕРЖАЩИЙ ХТЕН, И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ

## ОПИСАНИЕ

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

**[0001]** Гемофилия А представляет собой нарушение, сопровождающееся повышенной кровоточивостью, вызываемое дефектами кодирования гена коагулирующего фактора VIII (FVIII), и поражает 1-2 из 10000 родившихся мальчиков. Graw et al., Nat. Rev. Genet. 6(6): 488-501 (2005). Пациентов, страдающих гемофилией А, можно лечить инфузией очищенного или рекомбинантно полученного FVIII. Однако известно, что все коммерчески доступные продукты FVIII имеют период полувыведения, равный около 8-12 часов, что требует частого внутривенного введения пациентам. См. Weiner M.A. and Cairo, M.S., Pediatric Hematology Secrets, Lee, M.T., 12. Disorders of Coagulation, Elsevier Health Sciences, 2001; Lillicrap, D. Thromb. Res. 122 Suppl 4:S2-8 (2008). Кроме того, был опробован ряд подходов, направленных на увеличение периода полувыведения FVIII. Например, подходы, используемые для увеличения периода полувыведения факторов свертывания крови, включают пегилирование, гликопегилирование и конъюгацию с альбумином. See Dumont et al., Blood. 119(13): 3024-3030 (интернет-публикация 13 января 2012 г.). Независимо от используемой белковой инженерии, однако, разрабатываемые в настоящее время продукты FVIII пролонгированного действия имеют улучшенные значения периода полувыведения, но величины периодов полувыведения, как сообщается, ограничены всего лишь около 1,5-2-кратным увеличением в доклинических животных моделях. См. там же. Непротиворечивые результаты были продемонстрированы на людях, например, сообщалось, что rFVIII Fc улучшает период полувыведения до около 1,7-кратной величины по сравнению с ADVATE® у пациентов с гемофилией А. См. там же. Таким образом, увеличение периода полувыведения, несмотря на незначительные улучшения, может указывать на существование других факторов, ограничивающих  $t_{1/2}$ .

**[0002]** Вследствие частого введения доз и неудобств, причиняемых графиком введения, существует потребность в разработке продуктов FVIII, требующих меньшей частоты введения, *т.е.* продукта FVIII, имеющего период полувыведения, превышающий 1,5-2-кратный предел периода полувыведения.

## СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

**[0003]** Настоящее изобретение касается химерной молекулы, содержащей белок фактора фон Виллебранда (VWF), гетерологичный фрагмент (H1), последовательность XTEN и линкер VWF, соединяющий белок VWF с гетерологичным фрагментом, при этом линкер VWF содержит полипептид, выбранный из: (i) области a2 из фактора VIII (FVIII); (ii) области a1 из FVIII; (iii) области a3 из FVIII; (iv) сайта расщепления тромбином, содержащего X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любой их комбинации, и при этом последовательность XTEN соединена с белком VWF, гетерологичным фрагментом (H1), линкером VWF или любой их комбинацией. В одном варианте реализации изобретения последовательность XTEN соединяет белок VWF с линкером VWF или линкер VWF с гетерологичным фрагментом. В другом варианте реализации изобретения химерная молекула дополнительно включает вторую полипептидную цепь, которая содержит белок FVIII, при этом первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь ассоциированы друг с другом. В других вариантах реализации изобретения белок FVIII в химерной молекуле дополнительно содержит дополнительную последовательность XTEN. Дополнительная последовательность XTEN может быть связана с N-концом или C-концом белка FVIII или вставлена между двумя соседними аминокислотами FVIII. В еще одних вариантах реализации изобретения вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй гетерологичный фрагмент (H2).

**[0004]** Настоящее описание также включает химерную молекулу, содержащую первую полипептидную цепь, которая содержит белок VWF, гетерологичный фрагмент (H1) и линкер VWF, соединяющий белок VWF и гетерологичный фрагмент (H1), и вторую полипептидную цепь, содержащую белок FVIII и последовательность XTEN, при этом линкер VWF в первой полипептидной цепи содержит: (i) область a2 из FVIII; (ii) область a1 из FVIII; (iii) область a3 из FVIII; (iv) сайт расщепления тромбином, содержащий X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любую их комбинацию, и при этом первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь ассоциированы друг с другом. В одном варианте реализации изобретения последовательность XTEN присоединена к N-концу или C-концу белка FVIII или вставлена между двумя соседними аминокислотами FVIII. В другом варианте реализации изобретения химерная молекула дополнительно содержит дополнительную последовательность XTEN, которая связана с белком VWF, гетерологичным фрагментом, линкером VWF или любой их комбинацией. В других

вариантах реализации изобретения химерная молекула дополнительно содержит второй гетерологичный фрагмент (H2). В еще одних вариантах реализации изобретения второй гетерологичный фрагмент соединен с белком FVIII, последовательностью XTEN или обоими.

**[0005]** Для химерных молекул, в соответствии с настоящим изобретением, последовательность XTEN, соединенная с белком VWF, линкером VWF, белком FVIII или любыми другими компонентами в химерных молекулах, содержит около 42 аминокислот, около 72 аминокислот, около 108 аминокислот, около 144 аминокислот, около 180 аминокислот, около 216 аминокислот, около 252 аминокислот, около 288 аминокислот, около 324 аминокислот, около 360 аминокислот, около 396 аминокислот, около 432 аминокислот, около 468 аминокислот, около 504 аминокислот, около 540 аминокислот, около 576 аминокислот, около 612 аминокислот, около 624 аминокислот, около 648 аминокислот, около 684 аминокислот, около 720 аминокислот, около 756 аминокислот, около 792 аминокислот, около 828 аминокислот, около 836 аминокислот, около 864 аминокислот, около 875 аминокислот, около 912 аминокислот, около 923 аминокислот, около 948 аминокислот, около 1044 аминокислот, около 1140 аминокислот, около 1236 аминокислот, около 1318 аминокислот, около 1332 аминокислот, около 1428 аминокислот, около 1524 аминокислот, около 1620 аминокислот, около 1716 аминокислот, около 1812 аминокислот, около 1908 аминокислот или около 2004 аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения полипептид XTEN выбирают из AE42, AE72, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288 или AG144. В других вариантах реализации изобретения полипептид XTEN выбирают из SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 47; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 48; SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 42.

**[0006]** В других аспектах дополнительная последовательность XTEN в химерных молекулах содержит около 42 аминокислот, около 72 аминокислот, около 108 аминокислот, около 144 аминокислот, около 180 аминокислот, около 216 аминокислот, около 252 аминокислот, около 288 аминокислот, около 324 аминокислот, около 360 аминокислот, около 396 аминокислот, около 432 аминокислоты, около 468 аминокислот, около 504 аминокислоты, около 540 аминокислот, около 576 аминокислот, около 612 аминокислот, около 624 аминокислот, около 648 аминокислот, около 684 аминокислот, около 720 аминокислот, около 756 аминокислот, около 792 аминокислот, около 828 аминокислот, около 836 аминокислот, около 864 аминокислоты, около 875 аминокислот, около 912 аминокислот, около 923 аминокислот, около 948 аминокислот, около 1044 аминокислот, около 1140 аминокислот, около 1236 аминокислот, около 1318 аминокислот,

около 1332 аминокислот, около 1428 аминокислот, около 1524 аминокислот, около 1620 аминокислот, около 1716 аминокислот, около 1812 аминокислот, около 1908 аминокислот или около 2004 аминокислот. В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительный полипептид XTEN выбирают из AE42, AE72, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288, или AG144. В определенных вариантах реализации изобретения дополнительный полипептид XTEN выбирают из SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 47; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 48; SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 42.

**[0007]** В одном варианте реализации изобретения линкер VWF, пригодный для соединяющего белка VWF и гетерологичного фрагмента в химерных молекулах, содержит область a2, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80%, около 85%, около 90%, около 95% или 100% идентичную участку от Glu720 до Arg740, соответствующему полноразмерному FVIII, при этом область a2 способна расщепляться тромбином. В конкретном варианте реализации изобретения область a2 содержит ISDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSF (SEQ ID NO: 4). В другом варианте реализации изобретения линкер VWF, пригодный для соединяющего белка VWF и гетерологичного фрагмента, содержит область a1, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80%, около 85%, около 90%, около 95% или 100% идентичную участку от Met337 до Arg372, соответствующему полноразмерному FVIII, при этом область a1 способна расщепляться тромбином. В некоторых вариантах реализации изобретения область a1 содержит ISMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSV (SEQ ID NO: 5).

**[0008]** В других вариантах реализации изобретения линкер VWF, пригодный для соединяющего белка VWF и гетерологичного фрагмента, содержит область a3, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80%, около 85%, около 90%, около 95% или 100% идентичную участку от Glu1649 до Arg1689, соответствующему полноразмерному FVIII, при этом область a3 способна расщепляться тромбином. В конкретном варианте реализации изобретения область a3 содержит ISEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQ (SEQ ID NO: 6).

**[0009]** В еще одних вариантах реализации изобретения линкер VWF, пригодный для соединяющего белка VWF и гетерологичного фрагмента, содержит сайт расщепления тромбином, содержащий X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, при этом мотив экзосайта взаимодействия PAR1 содержит S-F-L-L-R-N (SEQ ID NO: 7). В одном варианте реализации изобретения мотив экзосайта взаимодействия PAR1 дополнительно содержит последовательность, выбранную из P, P-N, P-N-D, P-N-D-K (SEQ

ID NO: 8), P-N-D-K-Y (SEQ ID NO: 9), P-N-D-K-Y-E (SEQ ID NO: 10), P-N-D-K-Y-E-P (SEQ ID NO: 11), P-N-D-K-Y-E-P-F (SEQ ID NO: 12), P-N-D-K-Y-E-P-F-W (SEQ ID NO: 13), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E (SEQ ID NO: 14), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D (SEQ ID NO: 20), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D-E (SEQ ID NO: 21), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D-E-E (SEQ ID NO: 22), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D-E-E-S (SEQ ID NO: 23) или любой их комбинации. В другом варианте реализации изобретения алифатическую аминокислоту выбирают из глицина, аланина, валина, лейцина или изолейцина. В конкретном варианте реализации изобретения линкер VWF содержит GGLVPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEES (SEQ ID NO: 24).

**[0010]** В определенных вариантах реализации изобретения тромбин расщепляет линкер VWF быстрее, чем тромбин расщеплял бы сайт расщепления тромбином, если бы сайт расщепления тромбином замещал линкер VWF в химерной молекуле. В других вариантах реализации изобретения тромбин расщепляет линкер VWF по меньшей мере в около 10 раз, по меньшей мере в около 20 раз, по меньшей мере в около 30 раз, по меньшей мере в около 40 раз, по меньшей мере в около 50 раз, по меньшей мере в около 60 раз, по меньшей мере в около 70 раз, по меньшей мере в около 80 раз, по меньшей мере в около 90 раз или по меньшей мере в около 100 раз быстрее, чем тромбин расщеплял бы сайт расщепления тромбином, если бы сайт расщепления тромбином замещал линкер VWF в химерной молекуле.

**[0011]** В некоторых вариантах реализации изобретения линкер VWF дополнительно содержит одну или более аминокислот и имеет длину по меньшей мере около 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 или 2000 аминокислот. В одном примере одна или более аминокислот содержат пептид gly. В другом примере одна или более аминокислот содержат GlyGly. В других примерах одна или более аминокислот содержат пептид gly/ser. В некоторых примерах пептид gly/ser имеет формулу  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$  или  $\text{S}(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ , где n обозначает положительное целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 100. В определенных примерах линкер  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$  представляет собой  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$  (SEQ ID NO: 89) или  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_4$  (SEQ ID NO: 90).

**[0012]** Белок VWF, пригодный для химерной молекулы по изобретению, может содержать домен D' и домен D3 VWF, где домен D' и домен D3 способны связываться с белком FVIII. В одном варианте реализации изобретения домен D' белка VWF содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 90%, 95%, 96%, 97%,

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

**[0013]** В некоторых аспектах гетерологичный фрагмент (H1), соединенный с белком VWF с помощью линкера VWF, способен увеличивать период полувыведения химерной молекулы. В одном варианте реализации изобретения гетерологичный фрагмент (H1) содержит константную область иммуноглобулина или ее участок, альбумин, альбуминсвязывающий фрагмент, PAS, НАР, трансферрин или его фрагмент,

полиэтиленгликоль (ПЭГ), гидроксипропилкрахмал (ГЭК), ПСК, С-концевой пептид (СТР)  $\beta$ -субъединицы хорионического гонадотропина человека, или любую их комбинацию. В другом варианте реализации изобретения гетерологичный фрагмент содержит партнера связывания FcRn. В других вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент содержит Fc-область. В других вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент (H1) содержит клиренс-рецептор, или его фрагмент, причем клиренс-рецептор блокирует связывание белка FVIII с клиренс-рецепторами FVIII. В некоторых вариантах реализации изобретения клиренс-рецептор представляет собой рецептор липопротеинов низкой плотности-связанный белок 1 (LRP1) или его FVIII-связывающий фрагмент.

**[0014]** В некоторых аспектах второй гетерологичный фрагмент, соединенный с белком FVIII через необязательный линкер FVIII, содержит константную область иммуноглобулина или ее участок, альбумин, альбумин-связывающий полипептид, PAS, С-концевой пептид (СТР)  $\beta$ -субъединицы хорионического гонадотропина человека, полиэтиленгликоль (ПЭГ), гидроксипропилкрахмал (ГЭК), альбумин-связывающие малые молекулы, или любые их комбинации. В одном варианте реализации изобретения второй гетерологичный фрагмент (H2) способен увеличивать период полувыведения белка FVIII. В другом варианте реализации изобретения второй гетерологичный фрагмент (H2) содержит полипептид, неполипептидный фрагмент, или оба. В другом варианте реализации изобретения второй гетерологичный фрагмент (H2) содержит константную область иммуноглобулина или ее участок. В еще одних вариантах реализации изобретения второй гетерологичный фрагмент содержит партнер связывания FcRn. В других вариантах реализации изобретения второй гетерологичный фрагмент содержит вторую Fc-область.

**[0015]** В некоторых вариантах реализации изобретения первый гетерологичный фрагмент, соединенный с белком VWF с помощью линкера VWF, и второй гетерологичный фрагмент, соединенный с белком FVIII с помощью необязательного линкера, в котором последовательность XTEN связана с любым из компонентов, ассоциированы друг с другом. В одном варианте реализации изобретения ассоциация между первой полипептидной цепью и вторым полипептидом обозначает ковалентную связь. В другом варианте реализации изобретения ассоциация между первым гетерологичным фрагментом и вторым гетерологичным фрагментом представляет собой дисульфидную связь. В других вариантах реализации изобретения первый гетерологичный фрагмент является партнером связывания FcRn и второй гетерологичный фрагмент является партнером связывания FcRn. В еще одних вариантах реализации изобретения первый гетерологичный фрагмент является Fc-областью и второй гетерологичный фрагмент является Fc-областью.

**[0016]** В определенных вариантах реализации изобретения белок FVIII соединен со вторым гетерологичным фрагментом с помощью линкера FVIII. В одном варианте реализации изобретения второй линкер представляет собой расщепляемый линкер. В другом варианте реализации изобретения линкер FVIII идентичен линкеру VWF. В других вариантах реализации изобретения линкер FVIII отличается от линкера VWF.

**[0017]** В некоторых аспектах химерная молекула по изобретению имеет формулу, выбранную из: (a) V-L1-X1-H1:H2-L2-X2-C; (b) V-X1-L1-H1:H2-L2-X2-C; (c) V-L1-X1-H1:H2-X2-L2-C; (d) V-X1-L1-H1:H2-X2-L2-C; (e) V-L1-X1-H1: H2-L2-C(X2); (f) V-X1-L1-H1:H2-L2-C(X2); (g) C-X2-L2-H2:H1-X1-L1-V; (h) C-X2-L2-H2:H1-L1-X1-V; (i) C-L2-X2-H2:H1-L1-X1-V; (j) C-L2-X2-H2:H1-L1-X1-V; (k) C(X2)-L2-H2:H1-X1-L1-V; или (l) C(X2)-L2-H2:H1-L1-X1-V; где V обозначает белок VWF; L1 обозначает линкер VWF; L2 обозначает необязательный линкер FVIII; H1 представляет собой первый гетерологичный фрагмент; H2 обозначает второй гетерологичный фрагмент; X1 обозначает последовательность XTEN; X2 обозначает необязательную последовательность XTEN; C обозначает белок FVIII; C(X2) обозначает белок FVIII, слитый с последовательностью XTEN, причем последовательность XTEN вставлена между двумя соседними аминокислотами FVIII; (-) обозначает пептидную связь или одну или более аминокислот; и (:) обозначает ковалентную связь между H1 и H2.

**[0018]** В других аспектах химерная молекула имеет формулу, выбранную из: (a) V-L1-X1-H1: H2-L2-X2-C; (b) V-X1-L1-H1: H2-L2-X2-C; (c) V-L1-X1-H1: H2-X2-L2-C; (d) V-X1-L1-H1: H2-X2-L2-C; (e) V-L1-X1-H1: H2-L2-C(X2); (f) V-X1-L1-H1: H2-L2-C(X2); (g) C-X2-L2-H2: H1-X1-L1-V; (h) C-X2-L2-H2: H1-L1-X1-V; (i) C-L2-X2-H2:H1-L1-X1-V; (j) C-L2-X2-H2:H1-L1-X1-V; (k) C(X2)-L2-H2:H1-X1-L1-V; или (l) C(X2)-L2-H2:H1-L1-X1-V; где V обозначает белок VWF; L1 обозначает линкер VWF; L2 обозначает необязательный линкер FVIII; H1 обозначает первый гетерологичный фрагмент; H2 обозначает второй гетерологичный фрагмент; X1 обозначает необязательную последовательность XTEN; X2 обозначает последовательность XTEN; C обозначает белок FVIII; C(X2) обозначает белок FVIII, слитый с последовательностью XTEN, причем последовательность XTEN вставлена между двумя соседними аминокислотами FVIII; (-) обозначает пептидную связь или одну или более аминокислот; и (:) обозначает ковалентную связь между H1 и H2.

**[0019]** В химерных молекулах по изобретению белок VWF может ингибировать или предотвращать связывание эндогенного VWF с белком FVIII.

**[0020]** В определенных аспектах белок FVIII в химерных молекулах, может содержать третий гетерологичный фрагмент (H3). Третий гетерологичный фрагмент (H3) может быть последовательностью XTEN. В других аспектах белок FVIII содержит

четвертый гетерологичный фрагмент (Н4). Четвертый гетерологичный фрагмент (Н4) может быть последовательностью ХТЕН. В некоторых аспектах, белок FVIII содержит пятый гетерологичный фрагмент (Н5). Пятый гетерологичный фрагмент может быть последовательностью ХТЕН. В других аспектах, белок FVIII содержит шестой гетерологичный фрагмент (Н6). Шестой гетерологичный фрагмент может быть последовательностью ХТЕН. В определенных аспектах, один или более из третьего гетерологичного фрагмента (Н3), четвертого гетерологичного фрагмента (Н4), пятого гетерологичного фрагмента (Н5) и шестого гетерологичного фрагмента (Н6) способны увеличивать период полувыведения химерной молекулы. В других аспектах, третий гетерологичный фрагмент (Н3), четвертый гетерологичный фрагмент (Н4), пятый гетерологичный фрагмент (Н5) и шестой гетерологичный фрагмент (Н6) присоединены к С-концу или N-концу FVIII или вставлены между двумя аминокислотами белка FVIII. В других аспектах один или более из третьего гетерологичного фрагмента, четвертого гетерологичного фрагмента, пятого гетерологичного фрагмента и шестого гетерологичного фрагмента содержат отрезок, выбранный из одного или более из около 42 аминокислот, около 72 аминокислот, около 108 аминокислот, около 144 аминокислот, около 180 аминокислот, около 216 аминокислот, около 252 аминокислот, около 288 аминокислот, около 324 аминокислот, около 360 аминокислот, около 396 аминокислот, около 432 аминокислот, около 468 аминокислот, около 504 аминокислот, около 540 аминокислот, около 576 аминокислот, около 612 аминокислот, около 624 аминокислот, около 648 аминокислот, около 684 аминокислот, около 720 аминокислот, около 756 аминокислот, около 792 аминокислот, около 828 аминокислот, около 836 аминокислот, около 864 аминокислот, около 875 аминокислот, около 912 аминокислот, около 923 аминокислот, около 948 аминокислот, около 1044 аминокислот, около 1140 аминокислот, около 1236 аминокислот, около 1318 аминокислот, около 1332 аминокислот, около 1428 аминокислот, около 1524 аминокислот, около 1620 аминокислот, около 1716 аминокислот, около 1812 аминокислот, около 1908 аминокислот или около 2004 аминокислот. Например, последовательность ХТЕН третьего гетерологичного фрагмента, четвертого гетерологичного фрагмента, пятого гетерологичного фрагмента или шестого гетерологичного фрагмента может быть выбрана из AE42, AE72, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288 или AG144. В частности последовательность ХТЕН может быть выбрана из SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 47; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 43; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 48; SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 42.

**[0021]** В определенных вариантах реализации изобретения период полувыведения химерной молекулы увеличивается по меньшей мере в около 1,5 раза, по меньшей мере в около 2 раза, по меньшей мере в около 2,5 раза, по меньшей мере в около 3 раза, по меньшей мере в около 4 раза, по меньшей мере в около 5 раз, по меньшей мере в около 6 раз, по меньшей мере в около 7 раз, по меньшей мере в около 8 раз, по меньшей мере в около 9 раз, по меньшей мере в около 10 раз, по меньшей мере в около 11 раз или по меньшей мере в около 12 раз по сравнению с FVIII дикого типа.

**[0022]** Настоящее описание также предусматривает полинуклеотид или набор полинуклеотидов, кодирующих химерную молекулу или ее комплементарную последовательность. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов может дополнительно содержать полинуклеотидную цепь, которая кодирует PC5 или PC7.

**[0023]** Также включен вектор или набор векторов, содержащих полинуклеотид или набор полинуклеотидов и один или более промоторов, функционально связанных с полинуклеотидом или набором полинуклеотидов. В некоторых вариантах реализации изобретения вектор или набор векторов могут дополнительно содержать дополнительную полинуклеотидную цепь, кодирующую PC5 или PC7.

**[0024]** Настоящее изобретение также включает клетку-хозяина, содержащую полинуклеотид или набор полинуклеотидов или вектор или набор векторов. В одном варианте реализации изобретения клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего. В другом варианте реализации изобретения клетку-хозяина выбирают из клетки НЕК293, клетки CHO или клетки ВНК.

**[0025]** В некоторых аспектах изобретение включает фармацевтическую композицию, содержащую химерную молекулу, раскрытую в данном документе, полинуклеотид или набор полинуклеотидов, кодирующих химерную молекулу, вектор или набор векторов, содержащих полинуклеотид или набор полинуклеотидов, или клетку-хозяина, раскрытую в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В одном варианте реализации изобретения химерная молекула в композиции имеет увеличенный период полувыведения по сравнению с белком FVIII дикого типа. В другом варианте реализации изобретения период полувыведения химерной молекулы в композиции увеличен по меньшей мере в около 1,5 раза, по меньшей мере в около 2 раза, по меньшей мере в около 2,5 раза, по меньшей мере в около 3 раза, по меньшей мере в около 4 раза, по меньшей мере в около 5 раз, по меньшей мере в около 6 раз, по меньшей мере в около 7 раз, по меньшей мере в около 8 раз, по меньшей мере в около 9 раз, по меньшей мере в около 10 раз, по меньшей мере в около 11 раз или по меньшей мере в около 12 раз по сравнению с FVIII дикого типа.

**[0026]** Также включен способ снижения частоты или тяжести эпизода кровотечения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества химерной молекулы, раскрытой в данном документе, полинуклеотида или набора полинуклеотидов, кодирующих химерную молекулу, вектора или набора векторов, раскрытых в данном документе, клетки-хозяина, раскрытой в данном документе, или композиции, раскрытой в данном документе. Изобретение также включает способ предотвращения возникновения эпизода кровотечения у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества химерной молекулы, раскрытой в данном документе, полинуклеотида или набора полинуклеотидов, кодирующих химерную молекулу, вектора или набора векторов, раскрытых в данном документе, клетки-хозяина, раскрытой в данном документе, или композиции, раскрытой в данном документе. В одном варианте реализации изобретения эпизод кровотечения выбирают из нарушения свертываемости крови, гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения в ротовой полости, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в полости рта, травмы, повреждения черепа (trauma capitis), желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома кости, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве, кровоизлияния во влагалище подвздошно-поясничной мышцы, или любых их комбинаций. В другом варианте реализации изобретения химерная молекула, раскрытая в данном документе, полинуклеотид или набор полинуклеотидов, кодирующих химерную молекулу, вектор или набор векторов, раскрытых в данном документе, клетка-хозяин, раскрытая в данном документе, или композиция, раскрытая в данном документе, могут быть введены путем, выбранным из местного введения, внутриглазного введения, парентерального введения, интратекального введения, субдурального введения, перорального введения или любых их комбинаций.

**[0027]** Настоящее описание также включает способ получения химерной молекулы, включающий трансфекцию одной или более клеток-хозяев полинуклеотидом, раскрытым в данном документе, или вектором, раскрытым в данном документе, и экспрессию химерной молекулы в клетке-хозяине. Способ дополнительно включает выделение химерной молекулы. В некоторых вариантах реализации изобретения активность химерной молекулы по отношению к FVIII может быть измерена путем анализа активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) или методом ротационной тромбоэластометрии (ROTEM).

## КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

**[0028]** Фиг. 1 иллюстрирует примерную схему химерной молекулы (FVIII-XTEN/гетеродимер VWF), содержащей две полипептидные цепи - первую цепь, содержащую белок VWF (например, домен D' и домен D3 VWF) соединенный с Fc-областью с помощью расщепляемого тромбином линкера VWF, и вторую цепь, содержащую белок FVIII, соединенный со второй Fc-областью с помощью линкера FVIII. Белок FVIII содержит один или более XTEN в разных доменах FVIII.

**[0029]** Фиг. 2 иллюстрирует разные конструкторы VWF, причем каждый конструктор содержит домен D' и домен D3, соединенные с Fc-областью с помощью расщепляемого тромбином линкера VWF, за исключением контроля (т.е. VWF-052). VWF-031 содержит линкер из 48 аминокислот, включающий сайт расщепления тромбином L-V-P-R (SEQ ID NO: 25). VWF-034 содержит последовательность XTEN, состоящую из 288 аминокислот, и линкер из 35 аминокислот, включающий сайт расщепления тромбином L-V-P-R (SEQ ID NO: 25). VWF-035 содержит линкер из 73 аминокислот, включающий сайт расщепления тромбином L-V-P-R (SEQ ID NO: 25). VWF-036 содержит линкер из 98 аминокислот, включающий сайт расщепления тромбином L-V-P-R (SEQ ID NO: 25). VWF-039 содержит линкер VWF из 26 аминокислот, включающий сайт расщепления тромбином L-V-P-R (SEQ ID NO: 25) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1. VWF-051 содержит линкер из 54 аминокислот, включающий сайт расщепления тромбином A-L-R-P-R-V-V (SEQ ID NO: 26). VWF-052 содержит линкер из 48 аминокислоты без какого-либо сайта расщепления тромбином (контроль). VWF-054 содержит линкер VWF из 40 аминокислот, включающий область a1 FVIII. VWF-055 содержит линкер VWF из 34 аминокислот, включающий область a2 FVIII. VWF-056 содержит линкер VWF из 46 аминокислот, включающий область a3 FVIII.

**[0030]** Фиг. 3А иллюстрирует скорость тромбин-медируемого расщепления в единицах сдвига положения резонанса за секунду (RU/s) как функцию плотности захвата в единицах RU для слитых конструкторов VWF-Fc, т.е. VWF-031, VWF-034, VWF-036, VWF-039, VWF-051 и VWF-052. Фиг. 3В иллюстрирует скорость тромбин-медируемого расщепления в единицах сдвига положения резонанса за секунду (RU/s) как функцию плотности захвата в единицах RU для слитых конструкторов VWF-Fc, т.е. VWF-031, VWF-034, VWF-036, VWF-051 и VWF-052. В этих экспериментах, каждый слитый конструктор VWF-Fc захватывался при разных плотностях и затем подвергался воздействию фиксированной концентрации альфа-тромбина человека. Наклон каждой кривой на Фиг.

3А и Фиг. 3В непосредственно отображает восприимчивость каждого конструкта к расщеплению тромбином.

**[0031]** Фиг. 4А иллюстрирует скорость тромбин-медируемого расщепления в единицах сдвига положения резонанса за секунду (RU/s) как функцию плотности захвата в единицах RU для слитых конструктов VWF-Fc, т.е., VWF-054, VWF-055 и VWF-056. Фиг. 4В иллюстрирует скорость тромбин-медируемого расщепления в единицах сдвига положения резонанса за секунду (RU/s) как функцию плотности захвата в единицах RU для слитых конструктов VWF-Fc, т.е. VWF-031, VWF-039, VWF-054, VWF-055 и VWF-056. В этих экспериментах каждый слитый конструкт VWF-Fc захватывался при разных плотностях и затем подвергался воздействию фиксированной концентрации альфа-тромбина человека. Наклон каждой кривой на Фиг. 4А и Фиг. 4В непосредственно отображает восприимчивость каждого конструкта к расщеплению тромбином.

**[0032]** Фиг. 5 иллюстрирует результаты линейного регрессионного анализа с целью определения восприимчивости различных конструктов VWF-Fc - VWF-031, VWF-034, VWF-036, VWF-039, VWF-051, VWF-052, VWF-054, VWF-055 и VWF-056 - к тромбин-медируемому расщеплению. Значения величин выражены в обратных секундах и отображают наклоны кривых, проиллюстрированных на Фиг. 3 и Фиг. 4. Относительную восприимчивость двух разных конструктов определяют как частное от деления значений их соответствующих наклонов. Отношение  $\text{наклон}_{\text{VWF-039}}/\text{наклон}_{\text{VWF-031}}$  равно 71, указывая на то, что слитый конструкт VWF-Fc VWF-039 является в 71 раз более чувствительным к тромбин-медируемому расщеплению, чем VWF-031. Отношение  $\text{наклон}_{\text{VWF-055}}/\text{наклон}_{\text{VWF-031}}$  равно 65, и отношение  $\text{наклон}_{\text{VWF-051}}/\text{наклон}_{\text{VWF-031}}$  равно 1,8.

**[0033]** Фиг. 6 иллюстрирует время свертывания для различных химерных молекул у HemA-пациента, измеренное путем анализа цельной крови методом ROTEM. FVIII155/VWF-031 содержит две полипептидные цепи - первую цепь, содержащую BDD FVIII, соединенный с Fc-областью, и вторую цепь, содержащую домен D' и домен D3 VWF, соединенные с Fc-областью через минимальный сайт расщепления тромбином (т.е. L-V-P-R (SEQ ID NO: 25)). FVIII155/VWF-039 содержит две полипептидные цепи - первую цепь, содержащую BDD FVIII, соединенный с Fc-областью, и вторую цепь, содержащую домен D' и домен D3 VWF, соединенные с Fc-областью с помощью линкера VWF, содержащего L-V-P-R (SEQ ID NO: 25) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1. FVIII155/VWF-055 содержит две полипептидные цепи - первую цепь, содержащую BDD FVIII, соединенный с Fc-областью, и вторую цепь, содержащую домен D' и домен D3 VWF, соединенные с Fc-областью с помощью линкера VWF, содержащего область a2 из FVIII.

**[0034]** Фиг. 7 иллюстрирует схему типичного гетеродимера FVIII-VWF и конструкторов FVIII169, FVIII286, VWF057, VWF059 и VWF062. Например, конструктор FVIII169 содержит белок FVIII с делецией В-домена с замещением R1648A, соединенный с Fc-областью, в котором последовательность XTEN (например, AE288) вставлена в положении аминокислоты 745, что соответствует зрелому полноразмерному FVIII (A1-a1-A2-a2-288XTEN-a3-A3-C1-C2-Fc). Конструктор FVIII286 содержит белок FVIII с делецией В-домена с замещением R1648, соединенный с Fc-областью, в котором последовательность XTEN (например, AE288) вставлена в положении аминокислоты 745, что соответствует зрелому полноразмерному FVIII, с дополнительной областью a2 между FVIII и Fc (A1-a1-A2-a2-288XTEN-a3-A3-C1-C2-a2-Fc). VWF057 представляет собой слитый конструктор VWF-Fc, содержащий домен D'D3 белка VWF (с двумя аминокислотными замещениями в домене D'D3, *т.е.* C336A и C379A), связанный с Fc-областью с помощью линкера VWF, который содержит тромбиновый сайт LVPR ("LVPR") и GS-линкер ("GS"), при этом последовательность XTEN (*т.е.* 144XTEN) вставлена между доменом D'D3 и линкером VWF (D'D3-144XTEN-GS+LVPR-Fc). VWF059 представляет собой слитый конструктор VWF-Fc, содержащий домен D'D3 белка VWF (с двумя аминокислотными замещениями в домене D'D3, *т.е.* C336A и C379A), связанный с Fc-областью с помощью участка кислотной области 2 (a2) в качестве линкера VWF, при этом последовательность XTEN вставлена между доменом D'D3 и линкером VWF. VWF062 представляет собой слитый конструктор VWF-Fc, содержащий домен D'D3 белка VWF (с двумя аминокислотными замещениями в домене D'D3, *т.е.* C336A и C379A), связанный с Fc-областью, при этом последовательность XTEN вставлена между доменом D'D3 и Fc-областью (D'D3-144XTEN-Fc).

**[0035]** Фиг. 8 иллюстрирует острую эффективность гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc/D'D3-линкер-Fc (*т.е.* FVIII169/VWF034, FVIII169/VWF059 и FVIII169/VWF057), по сравнению с FVIII с делецией В-домена ("SQ BDD FVIII" или "BDD-rFVIII") или контрольным носителем в модели НемА-мышей со срезанным кончиком хвоста. BDD-rFVIII обозначен кружками, и FVIII169/VWF034 обозначен квадратами, FVIII169/VWF059 обозначен треугольниками, FVIII169/VWF057 обозначен незакрашенными кружками, и носитель обозначен перевернутыми треугольниками. VWF034 представляет собой слитый конструктор VWF-Fc, который содержит Fc-область, соединенную с доменом D' и доменом D3 VWF с помощью линкера VWF, содержащий LVPR, при этом последовательность XTEN (*т.е.* 288XTEN) вставлена между доменом D'D3 и линкером VWF (D'D3-288XTEN-LVPR-Fc). Подробное описание конструкторов FVIII169, VWF059 и VWF057 приведено в других разделах данного документа. Медианная потеря крови (мкл) у мышей после

введения дозы 75 МЕ/кг конструкта в каждой экспериментальной группе показана горизонтальными линиями.

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

**[0036]** Настоящее изобретение касается химерной молекулы, содержащей последовательность XTEN и расщепляемый тромбином линкер, соединяющий белок VWF или белок FVIII с гетерологичным фрагментом, например, фрагментом, увеличивающим период полувыведения. Изобретение также предусматривает химерную молекулу, содержащую две полипептидные цепи - первую цепь, содержащую белок VWF, связанный с гетерологичным фрагментом, и вторую цепь, содержащую белок FVIII и второй гетерологичный фрагмент, причем химерная молекула содержит последовательность XTEN в первой или второй полипептидных цепях, и или белок VWF, или белок FVIII (или оба) связаны с гетерологичным фрагментом с помощью линкера VWF или линкера FVIII (или обоих). Расщепляемый тромбином линкер (линкер VWF или линкер FVIII) может эффективно расщепляться тромбином в месте повреждения, где тромбин является легкодоступным. Типичные примеры химерных молекул проиллюстрированы в настоящем описании и фигурах. В некоторых вариантах реализации изобретения изобретение относится к химерным молекулам, имеющим структуры, представленные, например, на Фиг. 1-7. В других вариантах реализации изобретения изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему конструкты химерных молекул, раскрытые в данном документе.

**[0037]** Для обеспечения четкого понимания описания и формулы изобретения, ниже приводятся следующие определения.

### **I. Определения**

**[0038]** Следует отметить, что объекты, описываемые в единственном числе, относятся к одному или более указанным объектам; например, подразумевается, что "нуклеотидная последовательность" обозначает одну или более нуклеотидных последовательностей. По существу, термины в единственном числе, "один или более", и "по меньшей мере один" могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо.

**[0039]** Термин "около" используется в данном документе в значениях приблизительно, ориентировочно, около или близко к. Когда термин "около" используется в сочетании с диапазоном числовых значений, он модифицирует этот диапазон путем

расширения его границ до значений выше и ниже указанных числовых величин. В общем, термин "около" используется в данном документе для модификации числовой величины за счет отклонения ее на 10 процентов от указанного значения в большую или меньшую сторону (выше или ниже).

**[0040]** Термин "полинуклеотид" или "нуклеотид" рассматривается как охватывающий отдельно взятую нуклеиновую кислоту, а также множество нуклеиновых кислот, и относится к выделенной молекуле или конструкту нуклеиновой кислоты, например, матричной РНК (мРНК) или плазмидной ДНК (пДНК). В определенных вариантах реализации изобретения полинуклеотид содержит обычную фосфодиэфирную связь или необычную связь (например, амидную связь, такую как присутствующую в пептидных нуклеиновых кислотах (ПНК)). Термин "нуклеиновая кислота" относится к любому одному или более сегментам нуклеиновой кислоты, например, фрагментам ДНК или РНК, присутствующим в полинуклеотиде. Под "выделенной" нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом подразумевается молекула нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, извлеченная из ее естественного окружения. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий полипептид фактора VIII, содержащийся в векторе, считается выделенным в целях настоящего изобретения. Дополнительные примеры выделенного полинуклеотида включают рекомбинантные полинуклеотиды, поддерживаемые в гетерологичных клетках-хозяевах или очищенные (частично или в значительной степени) от других полинуклеотидов в растворе. Выделенные молекулы РНК включают *in vivo* или *in vitro* РНК-транскрипты полинуклеотидов по настоящему изобретению. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты в соответствии с настоящим изобретением дополнительно включают такие молекулы, полученные путем синтеза. Кроме того, полинуклеотид или нуклеиновая кислота могут включать регуляторные элементы, такие как промоторы, энхансеры, сайты связывания рибосом или сигналы терминации транскрипции.

**[0041]** В используемом в данном документе значении "кодирующая область" или "кодирующая последовательность" представляет собой участок полинуклеотида, который состоит из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Хотя "стоп-кодон" (TAG, TGA или TAA) типично не транслируется в аминокислоту, он может считаться частью кодирующей области, но любые фланкирующие последовательности, например, промоторы, сайты связывания рибосом, терминаторы транскрипции, интроны и т.п., не являются частью кодирующей области. Границы кодирующей области типично определяются стартовым кодоном на 5'-конце, кодирующим аминокислотный конец образующегося полипептида, и кодоном терминации трансляции на 3'-конце, кодирующим карбоксильный конец образующегося

полипептида. Две или больше кодирующих областей по настоящему изобретению может присутствовать в одном полинуклеотидном конструкте, например, в одном векторе или в отдельных полинуклеотидных конструктах, например, в отдельных (разных) векторах. Отсюда следует, что один вектор может содержать только одну кодирующую область, или могут содержать две или больше кодирующих областей, например, один вектор может отдельно кодировать первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь химерной молекулы, как описано ниже. Кроме того, вектор, полинуклеотид, или нуклеиновая кислота по изобретению могут кодировать гетерологичные кодирующие области, слитые или неслитые с нуклеиновой кислотой, кодирующей химерную молекулу по изобретению. Гетерологичные кодирующие области включают, без ограничений, специализированные элементы или мотивы, такие как секреторный сигнальный пептид или гетерологичный функциональный домен.

**[0042]** Определенные белки, секретируемые клетками млекопитающего, ассоциированы с секреторным сигнальным пептидом, который отщепляется от зрелого белка после инициации экспорта растущей белковой цепи через шероховатую эндоплазматическую сеть. Рядовые специалисты в данной области техники знают, что сигнальные пептиды обычно присоединены к N-концу полипептида и отщепляются от полного или "полноразмерного" полипептида с образованием секретируемой или "зрелой" формы полипептида. В определенных вариантах реализации используется нативный сигнальный пептид, например, сигнальный пептид FVIII или сигнальный пептид VWF, или функциональное производное такой последовательности, которое сохраняет способность направлять секрецию полипептида, функционально ассоциированного с ним. Альтернативно, может быть использован гетерологичный сигнальный пептид млекопитающего, например, тканевый активатор плазминогена (ТРА) человека или сигнальный пептид  $\beta$ -глюкуронидазы мыши, или их функциональное производное.

**[0043]** Термин "ниже по ходу транскрипции" относится к нуклеотидной последовательности, которая расположена по направлению к 3'-концу от референтной нуклеотидной последовательности. В определенных вариантах реализации изобретения ниже по ходу транскрипции нуклеотидной последовательности относится к последовательности, следующей за точкой начала транскрипции. Например, кодон инициации трансляции гена расположен ниже по ходу транскрипции от сайта начала транскрипции.

**[0044]** Термин "против хода транскрипции" относится к нуклеотидной последовательности, которая расположена по направлению к 5'-концу от референтной нуклеотидной последовательности. В определенных вариантах реализации изобретения

расположенные против хода транскрипции нуклеотидные последовательности относятся к последовательностям, находящимся со стороны 5'-конца от кодирующей области или точки начала транскрипции. Например, большинство промоторов расположены в направлении против хода транскрипции от сайта начала транскрипции.

**[0045]** В используемом в данном документе значении термин “регуляторная область” относится к нуклеотидным последовательностям, которые расположены в направлении против хода транскрипции (5'-некодирующие последовательности), внутри, или ниже по ходу транскрипции (3'-некодирующие последовательности) от кодирующей области, и которые оказывают влияние на транскрипцию, процессинг РНК, стабильность, или трансляция ассоциированной кодирующей области. Регуляторные области могут включать промоторы, лидерные последовательности трансляции, интроны, последовательности распознавания полиаденилирования, сайты процессинга РНК, эффекторные сайты связывания и структуры стебель-петля. Если кодирующая область предназначена для экспрессии в эукариотической клетке, то сигнал полиаденилирования и последовательность терминации транскрипции будут обычно расположены по направлению к 3'-концу от кодирующей последовательности.

**[0046]** Полинуклеотид, который кодирует генный продукт, например, полипептид, может включать промотор и/или другие контрольные элементы транскрипции или трансляции, функционально ассоциированные с одной или более кодирующими областями. При функциональной ассоциации кодирующая область генного продукта, например, полипептида, ассоциирована с одной или более регуляторными областями таким образом, чтобы поставить экспрессию генного продукта под влияние или контроль регуляторной области (областей). Например, кодирующая область и промотор являются "функционально ассоциированными", если индуцирование функции промотора приводит к транскрипции мРНК, кодирующей генный продукт, кодируемый кодирующей областью, и если природа связи между промотором и кодирующей областью не препятствует способности промотора направлять экспрессию генного продукта или не препятствует способности к транскрипции ДНК-матрицы. Другие контрольные элементы транскрипции, кроме промотора, например, энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминации транскрипции, также могут быть функционально ассоциированы с кодирующей областью для направления экспрессии генного продукта.

**[0047]** Различные контрольные области транскрипции известны квалифицированным специалистам в данной области техники. Они включают, без ограничений, контрольные области транскрипции, которые функционируют в клетках позвоночных, такие как, без ограничений, промоторные и энхансерные сегменты

цитомегаловирусов (непосредственный ранний промотор, в сочетании с интроном-А), вирус обезьян 40 (ранний промотор) и ретровирусы (такие как вирус саркомы Рауса). Другие контрольные области транскрипции включают области, выделенные из генов позвоночных, такие как актин, белок теплового шока, бычий гормон роста и  $\beta$ -глобин кролика, а также другие последовательности, способные контролировать экспрессию генов в эукариотических клетках. Дополнительно пригодные контрольные области транскрипции включают тканеспецифичные промоторы и энхансеры, а также лимфокин-индуцируемые промоторы (например, промоторы, индуцируемые интерферонами или интерлейкинами).

**[0048]** Аналогично, различные контрольные элементы трансляции известны рядовым специалистам в данной области техники. Они включают, без ограничений, сайты связывания рибосом, кодоны инициации и терминации трансляции и элементы, выделенные из пикорнавирусов (в частности, внутренний рибосомо-связывающий сайт, или IRES, также называемый последовательностью CITE).

**[0049]** Термин “экспрессия” в используемом в данном документе значении относится к процессу, в котором полинуклеотид продуцирует генный продукт, например, РНК или полипептид. Он включает, без ограничений, транскрипцию полинуклеотида в матричную РНК (мРНК), транспортную РНК (тРНК), малую шпилечную РНК (shРНК), малую интерферирующую РНК (siРНК) или любой другой РНК-продукт, и трансляцию мРНК в полипептид. Экспрессия дает “генный продукт.” В используемом в данном документе значении генный продукт может быть или нуклеиновой кислотой, например, матричной РНК, полученной в результате транскрипции гена или полипептида, который транслируется из транскрипта. Генные продукты, описанные в данном документе, дополнительно включают нуклеиновые кислоты с посттранскрипционными модификациями, например, полиаденилированием или сплайсингом, или полипептиды с посттрансляционными модификациями, например, метилированием, гликозилированием, добавлением липидов, ассоциацией с другими белковыми субъединицами или протеолитическим расщеплением.

**[0050]** “Вектор” относится к любому носителю для клонирования и/или переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Вектор может быть репликоном, к которому может быть присоединен другой сегмент нуклеиновой кислоты для осуществления репликации присоединенного сегмента. “Репликон” относится к любому генетическому элементу (например, плазмиде, фагу, космиде, хромосоме, вирусу), который функционирует в качестве автономной единицы репликации *in vivo*, т.е. способной к репликации под своим собственным контролем. Термин “вектор” включает как вирусные,

так и невирусные носители для введения нуклеиновой кислоты в клетку *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В данной области техники известно и используется большое число векторов, включая, например, плазмиды, модифицированные эукариотические вирусы, или модифицированные бактериальные вирусы. Вставка полинуклеотида в пригодный вектор может быть осуществлена путем лигирования соответствующих полинуклеотидных фрагментов в выбранный вектор, имеющий комплементарные липкие концы.

**[0051]** Векторы могут быть подвергнуты генетическим модификациям с целью кодирования селективируемых маркеров или репортеров, которые обеспечивают селекцию или идентификацию клеток со включенным вектором. Экспрессия селективируемых маркеров или репортеров обеспечивает возможность идентификации и/или селекции клеток-хозяев, которые включают и экспрессируют другие кодирующие области, содержащиеся в векторе. Примеры генов селективируемых маркеров, известных и используемых в данной области техники, включают: гены, обеспечивающие стойкость к ампициллину, стрептомицину, гентамицину, канамицин, гигромицин, гербициду биалафосу, сульфонамиду и т.п.; и гены, которые используют в качестве фенотипических маркеров, *т.е.* регуляторные гены антоцианина, ген изопентанилтрансферазы и т.п. Примеры репортеров, известных и используемых в данной области техники, включают: люциферазу (Luc), зеленый флуоресцентный белок (GFP), хлорамфениколацетилтрансферазу (CAT), -галактозидазу (LacZ), -глюкуронидазу (Gus) и т.п. Селективируемые маркеры могут также считаться репортерами.

**[0052]** Термин “плазида” относится к внехромосомальному элементу, часто несущему ген, не являющийся частью центрального метаболизма клетки и обычно имеющий форму кольцевой двухцепочечной молекулы ДНК. Такие элементы могут быть автономно реплицирующимися последовательностями, геном-интегрирующими последовательностями, фагом или нуклеотидными последовательностями, линейной, кольцевой или сверхспиральной, одно- или двухцепочечной ДНК или РНК, выделенными из любого источника, в котором ряд нуклеотидных последовательностей был соединен или рекомбинирован в уникальную конструкцию, способную вводить промоторный фрагмент и последовательность ДНК выбранного генного продукта вместе с соответствующей 3'-нетранслированной последовательностью в клетку.

**[0053]** Эукариотические вирусные векторы, которые могут быть использованы, включают, без ограничений, аденовирусные векторы, ретровирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, поксвирус, например, векторы на основе вируса коровьей оспы, бакуловирусные векторы или векторы на основе вируса герпеса.

Невирусные векторы включают плазмиды, липосомы, электрически заряженные липиды (цитофектины), комплексы ДНК-белок и биополимеры.

**[0054]** "Клонирующий вектор" относится к "репликону", представляющему собой единственный отрезок нуклеиновой кислоты, который реплицируется последовательно, и который содержит точку начала репликации, такой как плазида, фаг или космида, к которому может быть присоединен другой сегмент нуклеиновой кислоты для осуществления репликации присоединенного сегмента. Определенные клонирующие векторы способны к репликации в одном типе клеток, например, бактериях, и экспрессии в другом, например, эукариотических клетках. Клонирующие векторы типично содержат одну или более последовательностей, которые могут быть использованы для селекции клеток, содержащих вектор, и/или один или более множественных сайтов клонирования для вставки последовательностей нуклеиновой кислоты, представляющих интерес.

**[0055]** Термин "экспрессионный вектор" относится к носителю, сконструированному для обеспечения возможности экспрессии вставленной последовательности нуклеиновой кислоты после введения в клетку-хозяина. Вставленная последовательность нуклеиновой кислоты функционально ассоциируется с регуляторными областями, как описано выше.

**[0056]** Векторы вводятся в клетки-хозяева способами, хорошо известными в данной области техники, например, трансфекцией, электропорацией, микроинъекцией, трансдукцией, слиянием клеток, с помощью DEAE-декстрана, осаждением фосфата кальция, липофекцией (слияние с лизосомами), с использованием генной пушки или вектора-переносчика ДНК.

**[0057]** "Культура", "культивировать" и "культивация", в используемом в данном документе значении, означают инкубирование клеток в условиях *in vitro*, обеспечивающих возможность роста или деления клеток или поддержание клеток в жизнеспособном состоянии. "Культивируемые клетки", в используемом в данном документе значении, означает клетки, размножающиеся *in vitro*.

**[0058]** В используемом в данном документе значении, термин "полипептид" рассматривается как охватывающий форму единственного числа "полипептид", а также форму множественного числа "полипептиды", и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислоты), линейно соединенных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" относится к любой цепи или цепям, состоящим из двух или более аминокислот, и не указывает на определенную длину продукта. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, "белок", "аминокислотная цепь" или любой другой термин, используемый для обозначения цепи

или цепей, состоящих из двух или больше аминокислот, включены в определение "полипептида", и термин "полипептид" может быть использован вместо, или взаимозаменяемо с любым из этих терминов. Также предусматривается, что термин "полипептид" относится к продуктам постэкспрессионной модификации полипептида, включая, без ограничений гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию с помощью известных защитных/блокирующих групп, протеолитическое расщепление, или модификация неприродными аминокислотами. Полипептид может быть выделен из природного биологического источника или получен с использованием рекомбинантной технологии, но не обязательно транслирован из указанной последовательности нуклеиновой кислоты. Он может быть получен любым способом, включая химический синтез.

**[0059]** "Выделенный" полипептид или его фрагмент, вариант или производное относится к полипептиду, не находящемуся в его природном окружении. Никакой конкретной степени очистки не требуется. Например, выделенный полипептид может быть просто извлечен из его нативного или природного окружения. Рекомбинантно полученные полипептиды и белки, экспрессируемые в клетках-хозяевах, считаются выделенными в целях изобретения, так же, как и нативные или рекомбинантные полипептиды, которые были отделены, фракционированы, или частично или в значительной степени очищены любым пригодным методом.

**[0060]** Настоящее изобретение также включает фрагменты или варианты полипептидов и любую их комбинацию. Термины "фрагмент" или "вариант" по отношению к полипептид-связывающим доменам или связывающим молекулам по настоящему изобретению включают любые полипептиды, которые сохраняют по меньшей мере некоторые свойства (например, аффинность связывания FcRn по отношению к FcRn-связывающему домену или варианту Fc, коагулирующую активность по отношению к варианту FVIII, или активность связывания FVIII по отношению к белку VWF) референтного полипептида. Фрагменты полипептидов включают протеолитические фрагменты, а также фрагменты с делециями, в дополнение к специфическим фрагментам антител, описанным в других разделах данного документа, но не включают природный полноразмерный полипептид (или зрелый полипептид). Варианты полипептид-связывающих доменов или связывающих молекул по настоящему изобретению включают фрагменты, как описано выше, а также полипептиды с измененными аминокислотными последовательностями в результате аминокислотных замещений, делеций или вставок. Варианты могут встречаться или не встречаться в природных условиях. Неприродные варианты могут быть получены с использованием известных в данной области техники

методов мутагенеза. Варианты полипептидов могут содержать консервативные или неконсервативные аминокислотные замещения, делеции или добавления.

**[0061]** Термин “фрагмент VWF” или “фрагменты VWF”, используемый в данном документе, означает любые фрагменты VWF, которые взаимодействуют с FVIII и сохраняют по меньшей мере одно или более свойств, нормально обеспечиваемых для FVIII полноразмерным VWF, например, предотвращение преждевременной активации к FVIIIa, предотвращение преждевременного протеолиза, предотвращение ассоциации с фосфолипидными мембранами, что может приводить к преждевременному клиренсу, предотвращение связывания с клиренс-рецепторами FVIII, которые могут связывать “голый” FVIII, но не связанный с VWF FVIII, и/или стабилизацию взаимодействий тяжелой цепи и легкой цепи FVIII. В конкретном варианте реализации изобретения “фрагмент VWF”, в используемом в данном документе значении, содержит домен D’ и домен D3 белка VWF, но не включает домен A1, домен A2, домен A3, домен D4, домен B1, домен B2, домен B3, домен C1, домен C2 и домен CK белка VWF.

**[0062]** Термин “фактор, ограничивающий период полувыведения” или “фактор, ограничивающий период полувыведения FVIII”, в используемом в данном документе значении, обозначает фактор, который препятствует увеличению период полувыведения белка FVIII более чем в 1,5 или в 2 раза по сравнению с FVIII дикого типа (например, ADVATE<sup>®</sup> или REFACTO<sup>®</sup>). Например, полноразмерный или зрелый VWF может действовать как фактор, ограничивающий период полувыведения FVIII, путем индуцирования выведения комплекса FVIII и VWF из системы по одному или более путям клиренса VWF. В одном примере эндогенный VWF представляет собой фактор, ограничивающий период полувыведения FVIII. В другом примере полноразмерная рекомбинантная молекула VWF, нековалентно связанная с белком FVIII, представляет собой фактор, ограничивающий период полувыведения FVIII.

**[0063]** Термин “эндогенный VWF”, в используемом в данном документе значении, обозначает молекулы VWF, в природных условиях присутствующие в плазме. Эндогенная молекула VWF может быть мультимером, но может быть мономером или димером. Эндогенный VWF в плазме связывается с FVIII и образует нековалентный комплекс с FVIII.

**[0064]** “Консервативное аминокислотное замещение” представляет собой замещение, при котором аминокислотный остаток замещается на аминокислотный остаток, имеющий схожую боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих схожие боковые цепи, были определены в данной области техники, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например,

аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, если аминокислота в полипептиде замещена на другую аминокислоту из того же семейства боковых цепей, такое замещение считается консервативным. В другом варианте реализации изобретения цепочка аминокислот может быть консервативно замещена на структурно схожую цепочку, отличающуюся по порядку и/или по составу членов семейств боковых цепей.

**[0065]** Как известно в данной области техники, "идентичность последовательностей" между двумя полипептидами определяется путем сравнения аминокислотной последовательности одного полипептида с последовательностью второго полипептида. При обсуждении в данном документе, вопрос о том, является ли какой-либо конкретный полипептид на по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% или 100% идентичным другому полипептиду, может быть определен с использованием способов и компьютерных программ/прикладного программного обеспечения, известных в данной области техники, таких как, без ограничений, программа BESTFIT (Wisconsin Sequence Analysis Package (программный пакет для анализа последовательностей, Университет Висконсина), версия 8 для операционной системы Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). BESTFIT использует алгоритм локальной гомологии Смита и Уотермана (Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2:482-489 (1981)), для нахождения сегмента с наилучшей гомологией между двумя последовательностями. При использовании BESTFIT или любой другой программы для выравнивания последовательностей с целью определения того, является ли определенная последовательность, например, идентичной на 95% референтной последовательности в соответствии с настоящим изобретением, параметры задаются, конечно, таким образом, чтобы процент идентичности рассчитывался по полной длине референтной полипептидной последовательности, и чтобы были дозволены пробелы в гомологии, составляющие до 5% от общего числа аминокислот в референтной последовательности.

**[0066]** В используемом в данном документе значении "аминокислота, соответствующая" или "эквивалентная аминокислота" в последовательности VWF или последовательности белка FVIII определяется путем выравнивания для максимального увеличения идентичности или подобия между первой последовательностью VWF или

FVIII и второй последовательностью VWF или FVIII. Число, используемое для идентификации эквивалентной аминокислоты во второй последовательности VWF или FVIII, основано на числе, используемом для идентификации соответствующей аминокислоты в первой последовательности VWF или FVIII.

**[0067]** “Слитая” или "химерная" молекула содержит первую аминокислотную последовательность, связанную со второй аминокислотной последовательностью, с которой она обычно не соединена в природных условиях. Аминокислотные последовательности, нормально присутствующие в разных белках, могут быть объединены в слитом полипептиде, или аминокислотные последовательности, нормально присутствующие в одном и том же белке, могут быть размещены в другом порядке в слитом полипептиде, например, в результате слияния домена фактора VIII по изобретению с доменом иммуноглобулина Fc. Слитый белок получают, например, путем химического синтеза, или путем создания и трансляции полинуклеотида, в котором пептидные области кодируются с желательным взаимным расположением. Химерный белок может дополнительно содержать вторую аминокислотную последовательность, ассоциированную с первой аминокислотной последовательностью с помощью ковалентной непептидной связи или нековалентной связи.

**[0068]** В используемом в данном документе значении термин “период полувыведения” относится к биологическому периоду полувыведения конкретного полипептида *in vivo*. Период полувыведения может быть представлен как время, необходимое для выведения половины количества, введенного субъекту, из циркуляции и/или других тканей животного. Если кривая клиренса для данного полипептида строится как функция времени, то эта кривая обычно является двухфазной, с быстрой  $\alpha$ -фазой и более длительной  $\beta$ -фазой.  $\alpha$ -Фаза типично соответствует равновесию введенного полипептида между внутри- и внесосудистым пространством и, частично, определяется размером полипептида.  $\beta$ -Фаза типично соответствует катаболизму полипептида во внутрисосудистом пространстве. В некоторых вариантах реализации изобретения химерная молекула по изобретению является монофазной и, таким образом, не имеет альфа-фазы, а только одну бета-фазу. Таким образом, в определенных вариантах реализации изобретения термин период полувыведения в используемом в данном документе значении относится к периоду полувыведения полипептида в  $\beta$ -фазе. Типичный  $\beta$ -фазовый период полувыведения человеческого антитела у людей составляет 21 день.

**[0069]** Термин "гетерологичный" по отношению к полинуклеотиду или полипептиду означает, что полинуклеотид или полипептид выделены из объекта,

отличного от того объекта, с которым он сравнивается. Таким образом, гетерологичный полипептид, связанный с белком VWF, означает полипептидную цепь, которая соединена с белком VWF и не является встречающейся в природе частью белка VWF. Например, гетерологичный полинуклеотид или антиген может быть получен от разных видов, из разных типов клеток индивидуума, или из одних и тех же или разных типов клеток разных индивидуумов.

**[0070]** Термин "связанный", "слитый" или "соединенный" в используемом в данном документе значении, относится к первой аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, присоединенной ко второй аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности (например, с помощью пептидной связи или фосфодиэфирной связи, соответственно). Термин "ковалентно связанный" или "ковалентное соединение" относится к ковалентной связи, например, дисульфидной связи, пептидной связи, или к одной или более аминокислотам, например, линкеру, между двумя фрагментами, связанными вместе. Первая аминокислота или нуклеотидная последовательность может быть непосредственно присоединена ко второй аминокислотной или нуклеотидной последовательности, или, альтернативно, промежуточная последовательность может связывать первую последовательность со второй последовательностью. Термин "связанный", "слитый", или "соединенный" означает не только слияние первой аминокислотной последовательности со второй аминокислотной последовательностью на С-конце или N-конце, но также включает вставку целой первой аминокислотной последовательности (или второй аминокислотной последовательности) между любыми двумя аминокислотами второй аминокислотной последовательности (или первой аминокислотной последовательности, соответственно). В одном варианте реализации изобретения первая аминокислотная последовательность может быть присоединена ко второй аминокислотной последовательности с помощью пептидной связи или линкера. Первая нуклеотидная последовательность может быть присоединена ко второй нуклеотидной последовательности с помощью фосфодиэфирной связи или линкера. Линкер может быть пептидом или полипептидом (для полипептидных цепей) или нуклеотидом или нуклеотидной цепью (для нуклеотидных цепей) или любым химическим фрагментом (как для полипептидных, так и для полинуклеотидных цепей). Ковалентная связь иногда обозначается как (-) или черточка.

**[0071]** В используемом в данном документе значении термин "ассоциированный с" относится к ковалентной или нековалентной связи, образованной между первой аминокислотной цепью и второй аминокислотной цепью. В одном варианте реализации изобретения термин "ассоциированный с" означает ковалентную непептидную связь или

нековалентную связь. В некоторых вариантах реализации такая связь обозначается двоеточием, *т.е.* (:). В другом варианте реализации изобретения он означает ковалентную связь, за исключением пептидной связи. В других вариантах реализации изобретения термин "ковалентно ассоциированный", в используемом в данном документе значении, означает ассоциацию между двумя фрагментами с помощью ковалентной связи, например, дисульфидной связи, пептидной связи, или одной или более аминокислот (например, линкера). Например, аминокислота цистеин содержит тиольную группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик с тиольной группой второго цистеинового остатка. У большинства природных молекул IgG, области CH1 и CL соединены дисульфидной связью, и две тяжелые цепи соединены двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих 239 и 242 по системе нумерации Кабат (положения 226 или 229, система нумерации EU). Примеры ковалентных связей включают, без ограничений, пептидную связь, металлическую связь, водородную связь, дисульфидную связь, сигма-связь, пи-связь, дельта-связь, гликозидную связь, агностическую связь, изогнутую связь, диполярную связь, пи-дативное взаимодействие, двойную связь, тройную связь, четверную связь, пятикратную связь, шестикратную связь, конъюгацию, гиперконъюгацию, ароматичность, гаптность или антисвязывание. Неограничивающие примеры нековалентных связей включают ионную связь (например, катион-пи-связь или солевую связь), металлическую связь, водородную связь (например, диводородную связь, диводородный комплекс, низкобарьерную водородную связь, или симметричную водородную связь), вандерваальсовы силы, лондоновские дисперсионные силы, механическую связь, галогенную связь, ауофильность, интеркаляцию, стекнинг (stacking), энтропийные силы или химическую полярность.

**[0072]** В используемом в данном документе значении, термин "сайт расщепления" или "сайт ферментативного расщепления" относится к сайту, распознаваемому ферментом. В одном варианте реализации изобретения полипептид имеет сайт ферментативного расщепления, расщепляемый ферментом, который активируется в каскаде свертывания, так, чтобы расщепление таких сайтов происходило в месте образования сгустка. В другом варианте реализации изобретения линкер FVIII соединяющий белок FVIII и второй гетерологичный фрагмент, может содержать сайт расщепления. Типичные примеры таких сайтов включают например, сайты, распознаваемые тромбином, фактором XIa или фактором Xa. Типичные примеры сайтов расщепления FXIa включают, например, TQSFNDFTR (SEQ ID NO: 27) и SVSQTSKLTR (SEQ ID NO: 28). Типичные примеры сайтов расщепления тромбином включают, например, DFLAEGGGVR (SEQ ID NO: 29), TTKIKPR (SEQ ID NO: 30), LVPRG (SEQ ID

NO: 31) и ALRPR (аминокислоты 1-5 SEQ ID NO: 26). Другие сайты ферментативного расщепления известны в данной области техники. Сайт расщепления, который может расщепляться тромбином, называется в данном документе “сайт расщепления тромбином.”

**[0073]** В используемом в данном документе значении, термин “сайт процессинга” или “внутриклеточный сайт процессинга” относится к типу сайта ферментативного расщепления в полипептиде, являющегося мишенью для ферментов, которые функционируют после трансляции полипептида. В одном варианте реализации изобретения такие ферменты функционируют во время транспортировки из полости Гольджи в транс-Гольджи компартмент. Ферменты внутриклеточного процессинга расщепляют полипептиды перед секрецией белка из клетки. Примеры таких сайтов процессинга включают, например, сайты, являющиеся мишенями для семейства эндопептидаз PACE/фурин (где PACE является акронимом от Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme (фермент, расщепляющий спаренные основные аминокислоты)). Эти ферменты локализованы в мембране Гольджи и расщепляют белки со стороны карбоксильного конца от мотива последовательности Arg-[любой остаток]-(Lys или Arg)-Arg. В используемом в данном документе значении семейство “фуриновых” ферментов включает, например, PCSK1 (также известен как PC1/PC3), PCSK2 (также известен как PC2), PCSK3 (также известен как фурин или PACE), PCSK4 (также известен как PC4), PCSK5 (также известен как PC5 или PC6), PCSK6 (также известен как PACE4) или PCSK7 (также известен как PC7/LPC, PC8 или SPC7). Другие сайты процессинга известны в данной области техники. Термин “процессируемый линкер”, упоминаемый в данном документе, означает линкер, содержащий сайт внутриклеточного процессинга.

**[0074]** Термин “фурин” относится к ферментам, классифицированным в соответствии с ЕС (Классификация ферментов) как № 3.4.21.75. Фурин представляет собой субтилизин-подобную пропротеинконвертазу, которая также известна как PACE (Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme (фермент, расщепляющий спаренные основные аминокислоты)). Фурин делетирует участки неактивных прекурсорных белков, превращая их в биологически активные белки. Во время внутриклеточной транспортировки, пропептид отщепляется от зрелой молекулы VWF ферментом фурином в (аппарате) Гольджи.

**[0075]** Следует понимать, что в конструктах, содержащих несколько сайтов процессинга или расщепления, такие сайты могут быть одинаковыми или разными.

**[0076]** Нарушение гемостаза, в используемом в данном документе значении, означает генетически унаследованное или приобретенное состояние, характеризующееся

склонностью к кровоизлиянию, спонтанно или в результате травмы, вследствие нарушенной способности или неспособности образовывать фибриновый сгусток. Примеры таких расстройств включают гемофилии. Тремя основными формами являются гемофилия А (дефицит фактора VIII), гемофилия В (дефицит фактора IX или "болезнь Кристмаса") и гемофилия С (дефицит фактора XI, слабая склонность к кровотечению). Другие расстройства гемостаза включают, например, болезнь фон Виллебранда, дефицит фактора XI (дефицит PTA), дефицит фактора XII, недостаточности или структурные аномалии фибриногена, протромбина, фактора V, фактора VII, фактора X или фактора XIII, синдром Бернара-Сулье, который представляет собой дефект или дефицит GPIb. GPIb, представляющий собой рецептор VWF, может быть дефектным и приводить к недостаточности первичного образования сгустка (первичный гемостаз) и повышенной склонности к кровотечениям) и тромбастении Гланцманна-Негели (тромбастения Гланцманна). При печеночной недостаточности (острая и хроническая формы) наблюдается недостаточное продуцирование коагулирующих факторов печенью; это может увеличивать риск кровотечения.

**[0077]** Химерные молекулы по изобретению могут быть использованы профилактично. В используемом в данном документе значении термин "профилактическое лечение" относится к введению молекулы до эпизода кровотечения. В одном варианте реализации изобретения субъект, нуждающийся в гемостатическом средстве общего действия, подвергается, или должен быть подвергнут, хирургии. Химерный белок по изобретению может быть введен до или после хирургии в качестве профилактики. Химерный белок по изобретению может быть введен во время или после хирургии для остановки острого эпизода кровотечения. Хирургия может включать, без ограничений, трансплантацию печени, резекцию печени, зубоврачебные процедуры или трансплантацию стволовых клеток.

**[0078]** Химерная молекула по изобретению также используется для лечения "по требованию" (также называемого "эпизодическим"). Термин "лечение "по требованию"" или "эпизодическое лечение" относится к введению химерной молекулы в ответ на симптомы эпизода кровотечения или перед активностью, которая может вызвать кровотечение. В одном аспекте лечение "по требованию" (эпизодическое) может быть предоставлено субъекту при начале кровотечения, например, после травмы, или при ожидаемом кровотечении, например, перед хирургией. В другом аспекте лечение "по требованию" может быть предоставлено до активностей, которые увеличивают риск кровотечения, таких как контактные виды спорта.

**[0079]** В используемом в данном документе значении термин "острое кровотечение" относится к эпизоду кровотечения независимо от вызвавшей его причины. Например, субъект может иметь травму, уремию, наследственное нарушение, сопровождающееся повышенной кровоточивостью (например, дефицит фактора VII), тромбоцитарное расстройство или резистентность вследствие выработки антител к факторам свертывания крови.

**[0080]** Лечить, лечение, лечащий, в используемом в данном документе значении, относятся, например, к снижению тяжести болезни или состояния; уменьшению продолжительности течения болезни; облегчению одного или более симптомов, ассоциированных с болезнью или состоянием; обеспечению полезных эффектов для субъекта с болезнью или состоянием, без обязательного исцеления болезни или состояния, или профилактике одного или более симптомов, ассоциированных с болезнью или состоянием. В одном варианте реализации изобретения термин "лечить" или "лечение" означает поддержание у субъекта минимального уровня перед введением очередной дозы FVIII, равного по меньшей мере около 1 МЕ/дл, 2 МЕ/дл, 3 МЕ/дл, 4 МЕ/дл, 5 МЕ/дл, 6 МЕ/дл, 7 МЕ/дл, 8 МЕ/дл, 9 МЕ/дл, 10 МЕ/дл, 11 МЕ/дл, 12 МЕ/дл, 13 МЕ/дл, 14 МЕ/дл, 15 МЕ/дл, 16 МЕ/дл, 17 МЕ/дл, 18 МЕ/дл, 19 МЕ/дл или 20 МЕ/дл путем введения химерной молекулы по изобретению. В другом варианте реализации изобретения лечить или лечение означает поддержание минимального уровня FVIII перед введением очередной дозы, имеющего значение между около 1 и около 20 МЕ/дл, около 2 и около 20 МЕ/дл, около 3 и около 20 МЕ/дл, около 4 и около 20 МЕ/дл, около 5 и около 20 МЕ/дл, около 6 и около 20 МЕ/дл, около 7 и около 20 МЕ/дл, около 8 и около 20 МЕ/дл, около 9 и около 20 МЕ/дл или около 10 и около 20 МЕ/дл. Лечение или терапия болезни или состояния может также включать поддержание у субъекта активности FVIII на уровне, сопоставимом с по меньшей мере около 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20% активности FVIII у субъекта без гемофилии. Минимальный уровень перед введением очередной дозы, необходимый для лечения, может быть измерен одним или более известными способами и может быть отрегулирован (увеличен или уменьшен) для каждого субъекта.

## **II. Химерные молекулы**

**[0081]** Химерные молекулы по изобретению предназначены для улучшения высвобождения белка VWF или белка FVIII от другого фрагмента, с которым связан белок VWF или белок FVIII. Изобретение обеспечивает расщепляемый тромбином линкер, который может быстро и эффективно расщепляться в месте повреждения. В одном

аспекте изобретения химерная молекула может содержать белок фактора фон Виллебранда (VWF), гетерологичный фрагмент (H1), последовательность XTEN и линкер VWF, соединяющий белок VWF с гетерологичным фрагментом, причем линкер VWF содержит полипептид, выбранный из: (i) области a2 из фактора VIII (FVIII); (ii) области a1 из FVIII; (iii) области a3 из FVIII; (iv) сайта расщепления тромбином, содержащего X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любую их комбинацию, и последовательность XTEN соединена с белком VWF, гетерологичным фрагментом (H1), линкером VWF или любой их комбинацией. В другом аспекте изобретения химерная молекула может содержать первую полипептидную цепь, которая содержит белок VWF, гетерологичный фрагмент (H1) и линкер VWF, соединяющий белок VWF и гетерологичный фрагмент (H1), и вторую полипептидную цепь, содержащую белок FVIII и последовательность XTEN, причем линкер VWF в первой полипептидной цепи содержит: (i) область a2 из FVIII; (ii) область a1 из FVIII; (iii) область a3 из FVIII; (iv) сайт расщепления тромбином, содержащий X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любую их комбинацию, и первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь ассоциированы друг с другом.

**[0082]** В других аспектах изобретения химерная молекула содержит полипептидную цепь, содержащую белок FVIII, соединенный с гетерологичным фрагментом с помощью линкера FVIII, причем линкер FVIII содержит: (i) область a2 из FVIII; (ii) область a1 из FVIII; (iii) область a3 из FVIII; (iv) сайт расщепления тромбином, содержащий X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любую их комбинацию.

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

**[0083]** Настоящее изобретение предусматривает химерную молекулу, содержащую белок VWF, слитый с последовательностью XTEN с помощью линкера VWF, причем линкер VWF содержит полипептид, выбранный из: (i) области a2 из FVIII; (ii) области a1 из FVIII; (iii) области a3 из FVIII; (iv) сайта расщепления тромбином, содержащего X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотива экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любой их комбинации.

**[0084]** В одном варианте реализации изобретения химерная молекула содержит белок VWF, гетерологичный фрагмент (H1), последовательность XTEN и линкер VWF, соединяющий белок VWF с гетерологичным фрагментом, причем последовательность XTEN расположена между белком VWF и линкером VWF, и линкер VWF содержит

полипептид, выбранный из: (i) области a2 из фактора VIII (FVIII); (ii) области a1 из FVIII; (iii) области a3 из FVIII; (iv) сайта расщепления тромбином, содержащего X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любой их комбинации. В другом варианте реализации изобретения химерная молекула содержит белок VWF, гетерологичный фрагмент (H1), последовательность XTEN и линкер VWF, соединяющий белок VWF с гетерологичным фрагментом, причем последовательность XTEN расположена между линкером VWF и гетерологичным фрагментом, и линкер VWF содержит полипептид, выбранный из: (i) области a2 из FVIII; (ii) области a1 из FVIII; (iii) области a3 из FVIII; (iv) сайта расщепления тромбином, содержащего X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любой их комбинации.

**[0085]** В других вариантах реализации изобретения химерная молекула дополнительно содержит полипептидную цепь, содержащую белок FVIII, причем первая цепь, содержащая белок VWF, и вторая цепь, содержащая белок FVIII, ассоциированы друг с другом. В одном примере ассоциация может быть ковалентной ассоциацией, например, дисульфидной связью. В еще других вариантах реализации изобретения полипептидная цепь, содержащая белок FVIII дополнительно содержит дополнительную последовательность XTEN. Дополнительная последовательность XTEN может быть связана с N-концом или C-концом белка FVIII или вставлена между двумя соседними аминокислотами FVIII. В других вариантах реализации изобретения цепь, содержащая белок FVIII, дополнительно содержит второй гетерологичный фрагмент (H2). В некоторых вариантах реализации изобретения белок FVIII соединен со вторым гетерологичным фрагментом с помощью линкера FVIII. В определенных вариантах реализации изобретения линкер FVIII идентичен линкеру VWF, соединяющему белок VWF и гетерологичный фрагмент. В других вариантах реализации изобретения линкер FVIII отличается от линкера VWF, соединяющего белок VWF и гетерологичный фрагмент.

**[0086]** В определенных вариантах реализации изобретения химерная молекула имеет формулу, выбранную из: (i) V-L1-X1-H1:H2-L2-X2-C; (ii) V-X1-L1-H1:H2-L2-X2-C; (iii) V-L1-X1-H1:H2-X2-L2-C; (iv) V-X1-L1-H1:H2-X2-L2-C; (v) V-L1-X1-H1:H2-L2-C(X2); (vi) V-X1-L1-H1:H2-L2-C(X2); (vii) C-X2-L2-H2:H1-X1-L1-V; (viii) C-X2-L2-H2:H1-L1-X1-V; (ix) C-L2-X2-H2:H1-L1-X1-V; (x) C-L2-X2-H2:H1-L1-X1-V; (xi) C(X2)-L2-H2:H1-X1-L1-V; или (xii) C(X2)-L2-H2:H1-L1-X1-V; где V обозначает белок VWF; L1 обозначает линкер VWF; L2 обозначает необязательный линкер FVIII; H1 представляет собой первый

гетерологичный фрагмент; H2 обозначает второй гетерологичный фрагмент; X1 обозначает последовательность XTEN; X2 обозначает необязательную последовательность XTEN; C обозначает белок FVIII; C(X2) обозначает белок FVIII, слитый с последовательностью XTEN, причем последовательность XTEN вставлена между двумя соседними аминокислотами FVIII; (-) обозначает пептидную связь или одну или более аминокислот; и (:) обозначает ковалентную связь между H1 и H2.

**[0087]** В некоторых вариантах реализации изобретения белок FVIII в химерной молекуле содержит третий гетерологичный фрагмент (H3), который может быть последовательностью XTEN. В других вариантах реализации изобретения белок FVIII химерной молекулы содержит четвертый гетерологичный фрагмент (H4), который может быть последовательностью XTEN. В еще одних вариантах реализации изобретения белок FVIII химерной молекулы содержит пятый гетерологичный фрагмент (H5), который может быть последовательностью XTEN. В других вариантах реализации изобретения белок FVIII химерной молекулы содержит шестой гетерологичный фрагмент (H6), который может быть последовательностью XTEN. В определенных вариантах реализации изобретения один или более из третьего гетерологичного фрагмента (H3), четвертого гетерологичного фрагмента (H4), пятого гетерологичного фрагмента (H5) и шестого гетерологичного фрагмента (H6) способны увеличивать период полувыведения химерной молекулы. В некоторых вариантах реализации изобретения третий гетерологичный фрагмент (H3), четвертый гетерологичный фрагмент (H4), пятый гетерологичный фрагмент (H5) и шестой гетерологичный фрагмент (H6) присоединены к С-концу или N-концу FVIII или вставлены между двумя аминокислотами белка FVIII.

## **II.B. химерные молекулы с FVIII, XTEN, белком VWF, линкером VWF**

**[0088]** Настоящее изобретение также предусматривает химерную молекулу, содержащую первую полипептидную цепь, которая содержит белок VWF, гетерологичный фрагмент (H1) и линкер VWF, соединяющий белок VWF и гетерологичный фрагмент (H1), и вторую полипептидную цепь, содержащую белок FVIII и последовательность XTEN, причем линкер VWF в первой полипептидной цепи содержит: (i) область a2 из FVIII; (ii) область a1 из FVIII; (iii) область a3 из FVIII; (iv) сайт расщепления тромбином, содержащий X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любую их комбинацию, и первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь ассоциированы друг с другом. В одном варианте реализации последовательность XTEN

присоединена к N-концу или C-концу белка FVIII или вставлена между двумя соседними аминокислотами FVIII. В другом варианте реализации изобретения химерная молекула дополнительно содержит дополнительную последовательность XTEN, которая связана с белком VWF, гетерологичным фрагментом, линкером VWF, или любой их комбинацией. В других вариантах реализации изобретения химерная молекула дополнительно содержит второй гетерологичный фрагмент (H2). В других вариантах реализации изобретения второй гетерологичный фрагмент химерной молекулы соединен с белком FVIII, последовательностью XTEN или обоими. В других вариантах реализации изобретения второй гетерологичный фрагмент химерной молекулы соединен с белком FVIII или последовательностью XTEN с помощью линкера FVIII. В других вариантах реализации изобретения линкер FVIII идентичен линкеру VWF. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер FVIII отличается от линкера VWF.

**[0089]** В определенных вариантах реализации изобретения химерная молекула имеет формулу, выбранную из: (i) V-L1-X1-H1:H2-L2-X2-C; (ii) V-X1-L1-H1:H2-L2-X2-C; (iii) V-L1-X1-H1:H2-X2-L2-C; (iv) V-X1-L1-H1:H2-X2-L2-C; (v) V-L1-X1-H1:H2-L2-C(X2); (vi) V-X1-L1-H1:H2-L2-C(X2); (vii) C-X2-L2-H2:H1-X1-L1-V; (viii) C-X2-L2-H2:H1-L1-X1-V; (ix) C-L2-X2-H2:H1-L1-X1-V; (x) C-L2-X2-H2:H1-L1-X1-V; (xi) C(X2)-L2-H2:H1-X1-L1-V; или (xii) C(X2)-L2-H2:H1-L1-X1-V; где V обозначает белок VWF; L1 обозначает линкер VWF; L2 обозначает необязательный линкер FVIII; H1 представляет собой первый гетерологичный фрагмент; H2 обозначает второй гетерологичный фрагмент; X1 обозначает необязательную последовательность XTEN; X2 обозначает последовательность XTEN; C обозначает белок FVIII; C(X2) обозначает белок FVIII, слитый с последовательностью XTEN, причем последовательность XTEN вставлена между двумя соседними аминокислотами FVIII; (-) обозначает пептидную связь или одну или более аминокислот; и (:) обозначает ковалентную связь между H1 и H2. В одном варианте реализации изобретения линкер VWF и линкер FVIII могут быть одинаковыми. В другом варианте реализации изобретения линкер VWF и линкер FVIII являются разными.

**[0090]** В определенных вариантах реализации изобретения белок FVIII химерной молекулы содержит третий гетерологичный фрагмент (H3), который может быть последовательностью XTEN. В других вариантах реализации изобретения белок FVIII химерной молекулы содержит четвертый гетерологичный фрагмент (H4), который является последовательностью XTEN. В еще одних вариантах реализации изобретения белок FVIII химерной молекулы содержит пятый гетерологичный фрагмент (H5), который может быть последовательностью XTEN. В других вариантах реализации изобретения

белок FVIII содержит шестой гетерологичный фрагмент (Н6), который может быть последовательностью XTEN. В определенных вариантах реализации изобретения один или более из третьего гетерологичного фрагмента (Н3), четвертого гетерологичного фрагмента (Н4), пятого гетерологичного фрагмента (Н5) и шестого гетерологичного фрагмента (Н6) способны увеличивать период полувыведения химерной молекулы. В некоторых вариантах реализации изобретения третий гетерологичный фрагмент (Н3), четвертый гетерологичный фрагмент (Н4), пятый гетерологичный фрагмент (Н5) и/или шестой гетерологичный фрагмент (Н6) присоединены к С-концу или N-концу FVIII или вставлены между двумя аминокислотами белка FVIII.

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

**[0091]** Химерная молекула по изобретению может содержать белок FVIII, последовательность XTEN и гетерологичный фрагмент, присоединенный с помощью линкера FVIII, который содержит (i) область a2 из FVIII; (ii) область a1 из FVIII; (iii) область a3 из FVIII; (iv) сайт расщепления тромбином, содержащий X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любую их комбинацию. В определенных вариантах реализации изобретения химерная молекула содержит две полипептидные цепи - первую цепь, содержащую белок FVIII, соединенный с первой Fc-областью с помощью линкера FVIII, и вторую цепь, содержащую белок VWF (например, домен D' и домен D3 VWF), соединенную с Fc-областью, причем линкер FVIII в первой полипептидной цепи содержит: (i) область a2 из FVIII; (ii) область a1 из FVIII; (iii) область a3 из FVIII; (iv) сайт расщепления тромбином, содержащий X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любую их комбинацию, и первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь ассоциированы друг с другом, и последовательность XTEN присоединена к первому полипептиду (например, к N-концу или С-концу белка FVIII, линкеру или первой Fc-области или внутри белка FVIII), ко второму полипептиду (например, к N-концу или С-концу белка VWF или Fc-области или внутри белка FVIII) или к обоим. В конкретном варианте реализации линкер в первой полипептидной цепи содержит область a2 из FVIII.

**[0092]** В определенных вариантах реализации изобретения химерная молекула имеет формулу, выбранную из: (i) V-L2-X2-H2: H1-L1-X1-C; (ii) V-X2-L2-H2: H1-L1-X1-C; (iii) V-L2-X2-H2: H1-X1-L1-C; (iv) V-X2-L2-H2: H1-X1-L1-C; (v) V-L2-X2-H2: H1-L1-C(X1); (vi) V-X2-L2-H2: H1-L1-C(X1); (vii) C-X1-L1-H1: H2-X2-L2-V; (viii) C-X1-L1-H1: H2-L2-X2-V; (ix) C-L1-X1-H1:H2-L2-X2-V; (x) C-L1-X1-H1:H2-L2-X2-V; (xi) C(X1)-L1-

H1:H2-X2-L2-V; или (xii) C(X1)-L1-H1:H2-L2-X2-V, где V обозначает белок VWF; L1 представляет собой линкер FVIII; L2 обозначает необязательный линкер VWF; H1 представляет собой первый гетерологичный фрагмент; H2 обозначает второй гетерологичный фрагмент; X1 обозначает необязательную последовательность XTEN; X2 обозначает необязательную последовательность XTEN; C обозначает белок FVIII; C(X1) обозначает белок FVIII, слитый с последовательностью XTEN, причем последовательность XTEN вставлена между двумя соседними аминокислотами FVIII; (-) обозначает пептидную связь или одну или более аминокислот; и (:) обозначает ковалентную связь между H1 и H2, и где в химерной молекуле присутствует по меньшей мере одна последовательность XTEN. В одном варианте реализации изобретения линкер VWF и линкер FVIII являются одинаковыми. В другом варианте реализации изобретения линкер VWF и линкер FVIII являются разными.

## **II.D. Компоненты химерных молекул**

### **II.C.1. Линкер VWF или линкер FVIII**

**[0093]** Линкер VWF или линкер FVIII, пригодный для химерной молекулы по изобретению, представляет собой расщепляемый тромбином линкер, соединяющий белок VWF с гетерологичным фрагментом или белок FVIII с гетерологичным фрагментом. В одном варианте реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит область a1 FVIII. В другом варианте реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит область a2 FVIII. В других вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит область a3 FVIII. В других вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит сайт расщепления тромбином, содержащий X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту.

**[0094]** В одном варианте реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит область a1, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или 100% идентичную участку от Met337 до Arg372, соответствующему полноразмерному зрелому FVIII, где область a1 способна расщепляться тромбином. В другом варианте реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит область a1, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или 100% идентичную аминокислотам 337-374, соответствующим полноразмерному

зрелому FVIII, где область a1 способна расщепляться тромбином. В других вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII дополнительно содержит дополнительные аминокислоты, например, одну, две, три, четыре, пять, десять или больше. В конкретном варианте реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит ISMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNDDNSPSFIQIRSV (SEQ ID NO: 5).

**[0095]** В некоторых вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит область a2, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или 100% идентичную участку от Glu720 до Arg740, соответствующему полноразмерному зрелому FVIII, где область a2 способна расщепляться тромбином. В других вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит область a2, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или 100% идентичную аминокислотам 712-743, соответствующим полноразмерному зрелому FVIII. В еще одних вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII дополнительно содержит дополнительные аминокислоты, например, одну, две, три, четыре, пять, десять или больше. В конкретном варианте реализации изобретения линкер VWF содержит ISDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRFS (SEQ ID NO: 4).

**[0096]** В определенных вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит область a3, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или 100% идентичную участку от Glu1649 до Arg1689, соответствующему полноразмерному зрелому FVIII, где область a3 способна расщепляться тромбином. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит область a3, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или 100% идентичную аминокислотам 1649-1692, соответствующим полноразмерному зрелому FVIII, где область a3 способна расщепляться тромбином. В других вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII дополнительно содержит дополнительные аминокислоты, например, одну, две, три, четыре, пять, десять или больше. В конкретном варианте реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит ISEITRTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQ (SEQ ID NO: 6).

**[0097]** В других вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII содержит сайт расщепления тромбином, содержащий X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где мотив экзосайта взаимодействия PAR1 содержит S-F-L-L-R-N (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах реализации изобретения мотив экзосайта взаимодействия PAR1 дополнительно содержит аминокислотную последовательность, выбранную из P, P-N, P-N-D, P-N-D-K (SEQ ID NO: 8), P-N-D-K-Y (SEQ ID NO: 9), P-N-D-K-Y-E (SEQ ID NO: 10), P-N-D-K-Y-E-P (SEQ ID NO: 11), P-N-D-K-Y-E-P-F (SEQ ID NO: 12), P-N-D-K-Y-E-P-F-W (SEQ ID NO: 13), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E (SEQ ID NO: 14), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D (SEQ ID NO: 20), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D-E (SEQ ID NO: 21), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D-E-E (SEQ ID NO: 22), P-N-D-K-Y-E-P-F-W-E-D-E-E-S (SEQ ID NO: 23) или любой их комбинации. В других вариантах реализации изобретения алифатическую аминокислоту для сайта расщепления тромбином, содержащего X-V-P-R, выбирают из глицина, аланина, валина, лейцина или изолейцина. В конкретном варианте реализации изобретения сайт расщепления тромбином содержит L-V-P-R. В некоторых вариантах реализации изобретения тромбин расщепляет линкер VWF или линкер FVIII быстрее, чем тромбин расщеплял бы сайт расщепления тромбином (например, L-V-P-R), если бы сайт расщепления тромбином (L-V-P-R) замещал линкер VWF или линкер FVIII, соответственно (*т.е.* без мотива экзосайта взаимодействия PAR1). В некоторых вариантах реализации изобретения тромбин расщепляет линкер VWF или линкер FVIII по меньшей мере в около 10 раз, по меньшей мере в около 20 раз, по меньшей мере в около 30 раз, по меньшей мере в около 40 раз, по меньшей мере в около 50 раз, по меньшей мере в около 60 раз, по меньшей мере в около 70 раз, по меньшей мере в около 80 раз, по меньшей мере в около 90 раз или по меньшей мере в около 100 раз быстрее, чем тромбин расщеплял бы сайт расщепления тромбином (например, L-V-P-R), если бы сайт расщепления тромбином (например, L-V-P-R) замещал линкер VWF или линкер FVIII.

**[0098]** В некоторых вариантах реализации изобретения линкер VWF или линкер FVIII, содержащий (i) область a1, (ii) область a2, (iii) область a3 или (iv) сайт расщепления тромбином X-V-P-R и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, дополнительно содержит одну или более аминокислот, имеющих длину по меньшей мере около 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 или 2000 аминокислот. В одном варианте реализации изобретения одна или более аминокислот содержат пептид gly. В другом варианте реализации изобретения одна или более аминокислот содержат GlyGly. В других вариантах реализации изобретения

одна или более аминокислот содержат IleSer. В еще одних вариантах реализации изобретения одна или более аминокислот содержат пептид gly/ser. В других вариантах реализации изобретения одна или более аминокислот содержат пептид gly/ser, имеющий формулу  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$  или  $S(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ , где  $n$  обозначает положительное целое число, выбранное из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 100. В некоторых вариантах реализации изобретения одна или более аминокислот содержат  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$  (SEQ ID NO: 89) или  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_4$  (SEQ ID NO: 90).

### II.C.2. Белок VWF

**[0099]** VWF (также известен как F8VWF) представляет собой большой мультимерный гликопротеин, присутствующий в плазме крови и продуцируемый конститутивно в эндотелии (в тельцах Вейбеля–Паладе), мегакариоцитах ( $\alpha$ -гранулах тромбоцитов) и субэндотелиальной соединительной ткани. Основным мономером VWF представляет собой белок, состоящий из 2813 аминокислот. Каждый мономер содержит ряд специфических доменов со специфическими функциями - домен D'/D3 (который связывается с фактором VIII), домен A1 (который связывается с рецептором GPIb тромбоцитов, гепарином, и/или возможно коллагеном), домен A3 (который связывается с коллагеном), домен C1 (в котором домен RGD связывается с интегрином тромбоцитов  $\alpha\text{IIb}\beta_3$  при его активации) и домен "цистеинового узла" на С-конце белка (который VWF делит с фактором роста тромбоцитов (PDGF), трансформирующим фактором роста- $\beta$  (TGF $\beta$ ) и  $\beta$ -хорионическим гонадотропином человека ( $\beta\text{HCG}$ )).

**[00100]** Термин "белок VWF" в используемом в данном документе значении включает, без ограничений, полноразмерный белок VWF или функциональные фрагменты VWF, содержащие домен D' и домен D3, способные ингибировать связывание эндогенного VWF с FVIII. В одном варианте реализации изобретения белок VWF связывается с FVIII. В другом варианте реализации изобретения белок VWF блокирует сайт связывания VWF на FVIII, тем самым ингибируя взаимодействие FVIII с эндогенным VWF. В других вариантах реализации изобретения белок VWF не выводится путями клиренса VWF. Белки VWF включают производные, варианты, мутанты или аналоги, сохраняющие такие активности VWF.

**[00101]** Мономерная последовательность человеческого VWF из 2813 аминокислот депонирована в Genbank под номером доступа NP\_000543.2. Нуклеотидная последовательность, кодирующая человеческий VWF, депонирована в Genbank под номером доступа NM\_000552.3. Нуклеотидная последовательность человеческого VWF обозначена как SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 2 представляет собой аминокислотную

последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 1. Все домены VWF перечислены в Таблице 1.

**ТАБЛИЦА 1. Последовательности VWF**

Домены VWF	Аминокислотная последовательность
Сигнальный пептид VWF (аминокислоты 1-22 SEQ ID NO: 2)	1 <u>MIPARFAGVL LALALILPGT LC</u> 22
Область D1D2 VWF (аминокислоты 23-763 SEQ ID NO: 2)	23 <b>AEGTRGRS STARCSLFGS</b> <b>DFVNTFDGSM</b> 51 <b>YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE</b> <b>FFDIHLEFVNG</b> 101 <b>TVTQGDQRVSPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI</b> <b>DGSGNFQVLL</b> 151 <b>SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS</b> <b>WALSSGEQWC</b> 201 <b>ERASPPSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL</b> <b>VDPEPFVALC</b> 251 <b>EKTLCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWTDHSA</b> <b>CSPVCPAGME</b> 301 <b>YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG</b> <b>LCVESTPCPC</b> 351 <b>VHSGKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECV</b> <b>TGQSHFKSFD</b> 401 <b>NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFIVIVETV QCADDRDAVC</b> <b>TRSVTVRLPG</b> 451 <b>LHNSLVKLVK GAGVAMDGQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV</b> <b>RLSYGEDLQM</b> 501 <b>DWDGRGRLLV KLSVPYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG</b> <b>LAEPRVEDFG</b> 551 <b>NAWKLHGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP</b> <b>TFEACHRAVS</b> 601 <b>PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV</b> <b>AWREPGRCEL</b> 651 <b>NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP</b> <b>PGLYMDERGD</b> 701 <b>CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM</b> <b>SGVPGSLLPD</b> 751 <b>AVLSSPLSHR SKR</b> 763
Домен D' VWF	764 <u>SLSCRPP MVKLVC PADN LRAEGLECTK</u> <u>TCONYDLECM</u> 801 <u>SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HOGKEYAPGE</u> <u>TVKIGCNTCV</u> 851 <u>CRDRKWNCTD HVCDAT</u> 866
Домен D3 VWF	867 <u>CSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGE CQ</u> <u>YVLVQDYCGS</u> 901 <u>NP GTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE</u> <u>VNVKRP MKDE</u> 951 <u>THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWRHLSI SVVLKQTYQE</u> <u>KVCGLCGNFD</u> 1001 <u>GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPD</u> <u>SSPATCHNNI</u> 1051 <u>MKQTMVDSSC RILTSDFVQD CNKLVDP EPY LDVCIYDTCS</u> <u>CESIGDCACF</u>

	<p>1101 CDTIAAYAHV CAQHGVVVTW RTATLCPQSC EERNLRENGY ECEWRYNSCA</p> <p>1151 PACQVTCQHP EPLACPVQCV EGCHAHCPPG KILDELLOTC VDPEDCPVCE</p> <p>1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP</p> <p>1240</p>
Домен A1 VWF	<p>1241 GGLVVPPTDA</p> <p>1251 PVSPTTLYVE DISEPPLHDF YCSRLLDLVF LLDGSSRLSE AEFEVLKAFV</p> <p>1301 VDMMERLRIS QKWVRVAVVE YHDGSHAYIG LKDRKRPSEL RRIASQVKYA</p> <p>1351 GSQVASTSEV LKYTLFQIFS KIDRPEASRI ALLLMASQEP QRMSRNFVRY</p> <p>1401 VQGLKKKKVI VIPVGIGPHA NLKQIRLIEK QAPENKAFVL SSVDELEQQR</p> <p>1451 DEIVSYLCDL APEAPPPTLP PDMAQVTVG 1479</p>
	<b>Нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 1)</b>
Полноразмерный VWF	<p>1 ATGATTCCTG CCAGATTTGC CGGGGTGCTG CTTGCTCTGG CCCTCATTTT</p> <p>51 GCCAGGGACC CTTTGTGCAG AAGGAAC TCG CGGCAGGTCA TCCACGGCCC</p> <p>101 GATGCAGCCT TTTCGGAAGT GACTTCGTCA ACACCTTTGA TGGGAGCATG</p> <p>151 TACAGCTTTG CGGGATACTG CAGTTACCTC CTGGCAGGGG GCTGCCAGAA</p> <p>201 ACGCTCCTTC TCGATTATTG GGGACTTCCA GAATGGCAAG AGAGTGAGCC</p> <p>251 TCTCCGTGTA TCTTGGGGAA TTTTTTGACA TCCATTTGTT TGTCAATGGT</p> <p>301 ACCGTGACAC AGGGGGACCA AAGAGTCTCC ATGCCCTATG CCTCCAAAGG</p> <p>351 GCTGTATCTA GAAACTGAGG CTGGGTACTA CAAGCTGTCC GGTGAGGCCT</p> <p>401 ATGGCTTTGT GGCCAGGATC GATGGCAGCG GCAACTTTCA AGTCCTGCTG</p> <p>451 TCAGACAGAT ACTTCAACAA GACCTGCGGG CTGTGTGGCA ACTTTAACAT</p> <p>501 CTTTGCTGAA GATGACTTTA TGACCCAAGA AGGGACCTTG ACCTCGGACC</p> <p>551 CTTATGACTT TGCCAACTCA TGGGCTCTGA GCAGTGGAGA ACAGTGGTGT</p> <p>601 GAACGGGCAT CTCCTCCCAG CAGCTCATGC AACATCTCCT CTGGGGAAAT</p> <p>651 GCAGAAGGGC CTGTGGGAGC AGTGCCAGCT TCTGAAGAGC ACCTCGGTGT</p> <p>701 TTGCCCGCTG CCACCCTCTG GTGGACCCCG AGCCTTTTGT GGCCCTGTGT</p> <p>751 GAGAAGACTT TGTGTGAGTG TGCTGGGGGG CTGGAGTGCG CCTGCCCTGC</p> <p>801 CCTCCTGGAG TACGCCCGGA CCTGTGCCCA GGAGGGAAATG GTGCTGTACG</p> <p>851 GCTGGACCGA CCACAGCGCG TGCAGCCCAG TGTGCCCTGC TGGTATGGAG</p> <p>901 TATAGGCAGT GTGTGTCCCC TTGCGCCAGG ACCTGCCAGA GCCTGCACAT</p> <p>951 CAATGAAATG TGTCAAGAGC GATGCGTGGA TGGCTGCAGC TGCCCTGAGG</p> <p>1001 GACAGCTCCT GGATGAAGGC CTCTGCGTGG AGAGCACCGA GTGTCCCTGC</p> <p>1051 GTGCATTCCG GAAAGCGCTA CCCTCCCGGC ACCTCCCTCT CTCGAGACTG</p>

1101	CAACACCTGC	ATTTGCCGAA	ACAGCCAGTG
GATCTGCAGC	AATGAAGAAT		
1151	GTCCAGGGGA	GTGCCTTGTC	ACTGGTCAAT
CCCCTTCAA	GAGCTTTGAC		
1201	AACAGATACT	TCACCTTCAG	TGGGATCTGC
CAGTACCTGC	TGGCCCGGGA		
1251	TTGCCAGGAC	CACTCCTTCT	CCATTGTTCAT
TGAGACTGTC	CAGTGTGCTG		
1301	ATGACCGCGA	CGCTGTGTGC	ACCCGCTCCG
TCACCGTCCG	GCTGCCTGGC		
1351	CTGCACAACA	GCCTTGTGAA	ACTGAAGCAT
GGGGCAGGAG	TTGCCATGGA		
1401	TGGCCAGGAC	ATCCAGCTCC	CCCTCCTGAA
AGGTGACCTC	CGCATCCAGC		
1451	ATACAGTGAC	GGCCTCCGTG	CGCCTCAGCT
ACGGGGAGGA	CCTGCAGATG		
1501	GACTGGGATG	GCCGCGGGAG	GCTGCTGGTG
AAGCTGTCCC	CCGTCTATGC		
1551	CGGGAAGACC	TGCGGCCTGT	GTGGGAATTA
CAATGGCAAC	CAGGGCGACG		
1601	ACTTCCTTAC	CCCCTCTGGG	CTGGCRGAGC
CCCGGGTGA	GGACTTCGGG		
1651	AACGCCTGGA	AGCTGCACGG	GGACTGCCAG
GACCTGCAGA	AGCAGCACAG		
1701	CGATCCCTGC	GCCCTCAACC	CGCGCATGAC
CAGGTTCTCC	GAGGAGGCGT		
1751	GCGCGGTCCT	GACGTCCCCC	ACATTGAGGG
CCTGCCATCG	TGCCGTCAGC		
1801	CCGCTGCCCT	ACCTGCGGAA	CTGCCGCTAC
GACGTGTGCT	CCTGCTCGGA		
1851	CGGCCGCGAG	TGCCTGTGCG	GCGCCCTGGC
CAGCTATGCC	GCGGCCTGCG		
1901	CGGGGAGAGG	CGTGCGCGTC	GCGTGGCGCG
AGCCAGGCCG	CTGTGAGCTG		
1951	AACTGCCCGA	AAGGCCAGGT	GTACCTGCAG
TGCGGGACCC	CCTGCAACCT		
2001	GACCTGCCGC	TCTCTCTCTT	ACCCGGATGA
GGAATGCAAT	GAGGCCCTGCC		
2051	TGGAGGGCTG	CTTCTGCCCC	CCAGGGCTCT
ACATGGATGA	GAGGGGGGAC		
2101	TGCGTGCCCA	AGGCCAGTG	CCCCTGTTAC
TATGACGGTG	AGATCTTCCA		
2151	GCCAGAAGAC	ATCTTCTCAG	ACCATCACAC
CATGTGCTAC	TGTGAGGATG		
2201	GCTTCATGCA	CTGTACCATG	AGTGGAGTCC
CCGGAAGCTT	GCTGCCTGAC		
2251	GCTGTCCCTCA	GCAGTCCCCT	GTCTCATCGC
AGCAAAAGGA	GCCTATCCTG		
2301	TCGGCCCCC	ATGGTCAAGC	TGGTGTGTCC
CGCTGACAAC	CTGCGGGCTG		
2351	AAGGGCTCGA	GTGTACCAA	ACGTGCCAGA
ACTATGACCT	GGAGTGCATG		
2401	AGCATGGGCT	GTGTCTCTGG	CTGCCTCTGC
CCCCCGGGCA	TGGTCCGGCA		
2451	TGAGAACAGA	TGTGTGGCCC	TGAAAGGTG
TCCCTGCTTC	CATCAGGGCA		
2501	AGGAGTATGC	CCCTGGAGAA	ACAGTGAAGA
TTGGCTGCAA	CACTTGTGTC		
2551	TGTCGGGACC	GGAAGTGGAA	CTGCACAGAC
CATGTGTGTG	ATGCCACGTG		
2601	CTCCACGATC	GGCATGGCCC	ACTACCTCAC
CTTCGACGGG	CTCAAATACC		
2651	TGTTCCCCGG	GGAGTGCCAG	TACGTTCTGG
TGCAGGATTA	CTGCGGCAGT		

2701	AACCCTGGGA	CCTTTCGGAT	CCTAGTGGGG
AATAAGGGAT	GCAGCCACCC		
2751	CTCAGTGAAA	TGCAAGAAAC	GGGTCACCAT
CCTGGTGGAG	GGAGGAGAGA		
2801	TTGAGCTGTT	TGACGGGGAG	GTGAATGTGA
AGAGGCCCAT	GAAGGATGAG		
2851	ACTCACTTTG	AGGTGGTGGG	GTCTGGCCGG
TACATCATTC	TGCTGCTGGG		
2901	CAAAGCCCTC	TCCGTGGTCT	GGGACCGCCA
CCTGAGCATC	TCCGTGGTCC		
2951	TGAAGCAGAC	ATACCAGGAG	AAAGTGTGTG
GCCTGTGTGG	GAATTTTGAT		
3001	GGCATCCAGA	ACAATGACCT	CACCAGCAGC
AACCTCCAAG	TGGAGGAAGA		
3051	CCCTGTGGAC	TTTGGGAACT	CCTGGAAAGT
GAGCTCGCAG	TGTGCTGACA		
3101	CCAGAAAAGT	GCCTCTGGAC	TCATCCCCTG
CCACCTGCCA	TAACAACATC		
3151	ATGAAGCAGA	CGATGGTGGG	TTCCTCCTGT
AGAATCCTTA	CCAGTGACGT		
3201	CTTCCAGGAC	TGCAACAAGC	TGGTGGACCC
CGAGCCATAT	CTGGATGTCT		
3251	GCATTTACGA	CACCTGCTCC	TGTGAGTCCA
TTGGGGACTG	CGCCTGCTTC		
3301	TGCGACACCA	TTGCTGCCTA	TGCCACGTG
TGTGCCCAGC	ATGGCAAGGT		
3351	GGTGACCTGG	AGGACGGCCA	CATTGTGCC
CCAGAGCTGC	GAGGAGAGGA		
3401	ATCTCCGGGA	GAACGGGTAT	GAGTGTGAGT
GGCGCTATAA	CAGCTGTGCA		
3451	CCTGCCTGTC	AAGTCACGTG	TCAGCACCT
GAGCCACTGG	CCTGCCCTGT		
3501	GCAGTGTGTG	GAGGGCTGCC	ATGCCCACTG
CCCTCCAGGG	AAAATCCTGG		
3551	ATGAGCTTTT	GCAGACCTGC	GTTGACCCTG
AAGACTGTCC	AGTGTGTGAG		
3601	GTGGCTGGCC	GGCGTTTTGC	CTCAGGAAAG
AAAGTCACCT	TGAATCCCAG		
3651	TGACCCTGAG	CACTGCCAGA	TTTGCCACTG
TGATGTTGTC	AACCTCACCT		
3701	GTGAAGCCTG	CCAGGAGCCG	GGAGGCCTGG
TGGTGCCCTC	CACAGATGCC		
3751	CCGGTGAGCC	CCACCACTCT	GTATGTGGAG
GACATCTCGG	AACCGCCGTT		
3801	GCACGATTTT	TACTGCAGCA	GGCTACTGGA
CCTGGTCTTC	CTGCTGGATG		
3851	GCTCCTCCAG	GCTGTCCGAG	GCTGAGTTTG
AAGTGCTGAA	GGCCTTTGTG		
3901	GTGGACATGA	TGGAGCGGCT	GCGCATCTCC
CAGAAAGTGGG	TCCGCGTGGC		
3951	CGTGGTGGAG	TACCACGACG	GCTCCCACGC
CTACATCGGG	CTCAAGGACC		
4001	GGAAGCGACC	GTCAGAGCTG	CGGCGCATTG
CCAGCCAGGT	GAAGTATGCG		
4051	GGCAGCCAGG	TGGCCTCCAC	CAGCGAGGTC
TTGAAATACA	CACTGTTCCA		
4101	AATCTTCAGC	AAGATCGACC	GCCCTGAAGC
CTCCCGCATC	GCCCTGCTCC		
4151	TGATGGCCAG	CCAGGAGCCC	CAACGGATGT
CCCGGAACTT	TGTCCGCTAC		
4201	GTCCAGGGCC	TGAAGAAGAA	GAAGTTCATT
GTGATCCCCG	TGGGCATTGG		
4251	GCCCCATGCC	AACCTCAAGC	AGATCCGCCT
CATCGAGAAG	CAGGCCCTG		

4301	AGAACAAGGC	CTTCGTGCTG	AGCAGTGTGG
ATGAGCTGGA	GCAGCAAAGG		
4351	GACGAGATCG	TTAGCTACCT	CTGTGACCTT
GCCCCTGAAAG	CCCCTCCTCC		
4401	TACTCTGCCC	CCCACATGG	CACAAGTCAC
TGTGGGCCCCG	GGGCTCTTGG		
4451	GGTTTCGAC	CCTGGGGCCC	AAGAGGAACT
CCATGGTTCT	GGATGTGGCG		
4501	TTCGTCCTGG	AAGGATCGGA	CAAAATTGGT
GAAGCCGACT	TCAACAGGAG		
4551	CAAGGAGTTC	ATGGAGGAGG	TGATTCAGCG
GATGGATGTG	GGCCAGGACA		
4601	GCATCCACGT	CACGGTGCTG	CAGTACTCCT
ACATGGTGAC	CGTGGAGTAC		
4651	CCCTTCAGCG	AGGCACAGTC	CAAAGGGGAC
ATCCTGCAGC	GGGTGCGAGA		
4701	GATCCGCTAC	CAGGGCGGCA	ACAGGACCAA
CACTGGGCTG	GCCCTGCGGT		
4751	ACCTCTCTGA	CCACAGCTTC	TTGGTCAGCC
AGGGTGACCG	GGAGCAGGCG		
4801	CCCAACCTGG	TCTACATGGT	CACCGGAAAT
CCTGCCTCTG	ATGAGATCAA		
4851	GAGGCTGCCT	GGAGACATCC	AGGTGGTGCC
CATTGGAGTG	GGCCCTAATG		
4901	CCAACGTGCA	GGAGCTGGAG	AGGATTGGCT
GGCCCAATGC	CCCTATCCTC		
4951	ATCCAGGACT	TTGAGACGCT	CCCCGAGAG
GCTCCTGACC	TGGTGCTGCA		
5001	GAGGTGCTGC	TCCGGAGAGG	GGCTGCAGAT
CCCCACCCTC	TCCCCTGCAC		
5051	CTGACTGCAG	CCAGCCCCTG	GACGTGATCC
TTCTCCTGGA	TGGCTCCTCC		
5101	AGTTTCCCAG	CTTCTTATTT	TGATGAAATG
AAGAGTTTCG	CCAAGGCTTT		
5151	CATTTCAAAA	GCCAATATAG	GGCCTCGTCT
CACTCAGGTG	TCAGTGCTGC		
5201	AGTATGGAAG	CATCACCACC	ATTGACGTGC
CATGGAACGT	GGTCCCCGAG		
5251	AAAGCCCATT	TGCTGAGCCT	TGTGGACGTC
ATGCAGCGGG	AGGGAGGCCC		
5301	CAGCCAAATC	GGGGATGCCT	TGGGCTTTGC
TGTGCGATAC	TTGACTTCAG		
5351	AAATGCATGG	TGCCAGGCCG	GGAGCCTCAA
AGGCGGTGGT	CATCCTGGTC		
5401	ACGGACGTCT	CTGTGGATTC	AGTGGATGCA
GCAGCTGATG	CCGCCAGGTC		
5451	CAACAGAGTG	ACAGTGTTC	CTATTGGAAT
TGGAGATCGC	TACGATGCAG		
5501	CCCAGCTACG	GATCTTGCCA	GGCCCAGCAG
GCGACTCCAA	CGTGGTGAAG		
5551	CTCCAGCGAA	TCGAAGACCT	CCCTACCATG
GTCACCTTGG	GCAATTCCTT		
5601	CCTCCACAAA	CTGTGCTCTG	GATTTGTTAG
GATTTGCATG	GATGAGGATG		
5651	GGAATGAGAA	GAGGCCCGGG	GACGTCTGGA
CCTTGCCAGA	CCAGTGCCAC		
5701	ACCGTGACTT	GCCAGCCAGA	TGGCCAGACC
TTGCTGAAGA	GTCATCGGGT		
5751	CAACTGTGAC	CGGGGGCTGA	GGCCTTCGTG
CCCTAACAGC	CAGTCCCCTG		
5801	TTAAAGTGGG	AGAGACCTGT	GGCTGCCGCT
GGACCTGCCC	CTGYGTGTGC		
5851	ACAGGCAGCT	CCACTCGGCA	CATCGTGACC
TTTGATGGGC	AGAATTTCAA		

5901	GCTGACTGGC	AGCTGTTCTT	ATGTCCTATT
TCAAAACAAG	GAGCAGGACC		
5951	TGGAGGTGAT	TCTCCATAAT	GGTGCCTGCA
GCCCTGGAGC	AAGGCAGGGC		
6001	TGCATGAAAT	CCATCGAGGT	GAAGCACAGT
GCCCTCTCCG	TCGAGSTGCA		
6051	CAGTGACATG	GAGGTGACGG	TGAATGGGAG
ACTGGTCTCT	GTTCCCTTACG		
6101	TGGGTGGGAA	CATGGAAGTC	AACGTTTATG
GTGCCATCAT	GCATGAGGTC		
6151	AGATTCAATC	ACCTTGGTCA	CATCTTCACA
TTCACTCCAC	AAAACAATGA		
6201	GTTCCAAC TG	CAGCTCAGCC	CCAAGACTTT
TGCTTCAAAG	ACGTATGGTC		
6251	TGTGTGGGAT	CTGTGATGAG	AACGGAGCCA
ATGACTTCAT	GCTGAGGGAT		
6301	GGCACAGTCA	CCACAGACTG	GAAAACACTT
G TTCAGGAAT	GGACTGTGCA		
6351	GCGGCCAGGG	CAGACGTGCC	AGCCCATCCT
GGAGGAGCAG	TGTCTTGTCC		
6401	CCGACAGCTC	CCACTGCCAG	GTCCTCCTCT
TACCACTGTT	TGCTGAATGC		
6451	CACAAGGTCC	TGGCTCCAGC	CACATTCTAT
GCCATCTGCC	AGCAGGACAG		
6501	TTGCCACCAG	GAGCAAGTGT	GTGAGGTGAT
CGCCTCTTAT	GCCCACCTCT		
6551	GTCGGACCAA	CGGGGTCTGC	GTTGACTGGA
GGACACCTGA	TTTCTGTGCT		
6601	ATGTCATGCC	CACCATCTCT	GGTCTACAAC
CACTGTGAGC	ATGGCTGTCC		
6651	CCGGCACTGT	GATGGCAACG	TGAGCTCCTG
TGGGGACCAT	CCCTCCGAAG		
6701	GCTGTTTCTG	CCCTCCAGAT	AAAGTCATGT
TGGAAGGCAG	CTGTGTCCCT		
6751	GAAGAGGCCT	GCACTCAGTG	CATTGGTGAG
GATGGAGTCC	AGCACCAGTT		
6801	CCTGGAAGCC	TGGGTCCCGG	ACCACCAGCC
CTGTCAGATC	TGCACATGCC		
6851	TCAGCGGGCG	GAAGGTCAAC	TGCACAACGC
AGCCCTGCCC	CACGGCCAAA		
6901	GCTCCCACGT	GTGGCCTGTG	TGAAGTAGCC
CGCCTCCGCC	AGAATGCAGA		
6951	CCAGTGCTGC	CCCGAGTATG	AGTGTGTGTG
TGACCCAGTG	AGCTGTGACC		
7001	TGCCCCCAGT	GCCTCACTGT	GAACGTGGCC
TCCAGCCCAC	ACTGACCAAC		
7051	CCTGGCGAGT	GCAGACCCAA	CTTCACCTGC
GCCTGCAGGA	AGGAGGAGTG		
7101	CAAAAGAGTG	TCCCCACCCT	CCTGCCCCCC
GCACCGTTTG	CCCACCCTTC		
7151	GGAAGACCCA	GTGCTGTGAT	GAGTATGAGT
GTGCCTGCAA	CTGTGTCAAC		
7201	TCCACAGTGA	GCTGTCCCCT	TGGGTACTTG
GCCTCAACCG	CCACCAATGA		
7251	CTGTGGCTGT	ACCACAACCA	CCTGCCTTCC
CGACAAGGTG	TGTGTCCACC		
7301	GAAGCACCAT	CTACCCTGTG	GGCCAGTTCT
GGGAGGAGGG	CTGCGATGTG		
7351	TGCACCTGCA	CCGACATGGA	GGATGCCGTG
ATGGGCCTCC	GCGTGGCCCA		
7401	GTGCTCCCAG	AAGCCCTGTG	AGGACAGCTG
TCGGTCGGGC	TTCACTTACG		
7451	TTCTGCATGA	AGGCGAGTGC	TGTGGAAGGT
GCCTGCCATC	TGCCTGTGAG		

7501	GTGGTGA	CTG	CACCGCG	GGGGG	ACTCC
CAGTCTT	CCCT	GGAA	GAGTGT		
7551	CGGCTCC	CAG	TGGGCCT	CCC	CGGAGA
CTGCCTC	CATC	AATG	AAGTGTG		
7601	TCCGAGT	GAA	GGAGG	AGGTC	TTTATA
AAAGGA	ACGT	CTCCT	GCCCC		
7651	CAGCTGG	AGG	TCCCTGT	CTG	CCCCTC
TTTCAG	CTGA	GCTGT	AAGAC		
7701	CTCAGCG	TGC	TGCCCA	AGCT	GTCGCT
GCGCAT	GGAG	GCCTG	CATGC		
7751	TCAATGG	CAC	TGTCAT	TGGG	CCCGGA
CTGTG	A	TGC	TGC		
7801	ACGACCT	GCC	GCTGC	ATGGT	GCAGGT
GTCAT	CTCTG	GATTC	AAGCT		
7851	GGAGTGC	AGG	AAGACC	CACCT	GCAACCC
CCCC	TGGGT	TACA	AGGA		
7901	AAAATA	ACAC	AGGTG	AATGT	TGTGGG
GTTTGC	CTAC	GGCTT	GCACC		
7951	ATTCAG	CTAA	GAGG	AGACA	GATCAT
CTGA	AGCGT	ATG	AGCGT		
8001	CCAGG	ATGGC	TGTG	A	ACTTCT
GGTCA	A	TGC	A		
8051	ACTTCT	GGGA	GAAG	AGGGTC	ACAGGCT
CACC	TTTGA	TGA	ACACA		
8101	TGTCTG	CTG	AGGG	AGGTA	AATTAT
ATTCC	AGGCA	CCTG	CTGT		
8151	CACATG	TGAG	GAGCCT	GAGT	GCAACG
CACTG	CCAGG	CTGC	AGTAT		
8201	TCAAGG	TGGG	AAGCTG	TAAG	TCTGA
AGGTG	GATAT	CCACT	ACTGC		
8251	CAGGGC	AAAT	GTGCC	AGCAA	AGCCAT
TCCAT	TGACA	TCA	ACG	ATGT	
8301	GCAGG	ACCAG	TGCTC	CTGCT	GCTCTC
ACGG	ACGGAG	CCC	ATGC	AGG	
8351	TGGCC	CTGCA	CTGC	ACCAAT	GGCTCT
TGTAC	CAATGA	GGTT	CTCAAT		
8401	GCCATG	GAGT	GCAA	ATGCTC	CCCCAG
GA					GGAAG
					TGCAG
					CAAGT
					GA

**[00102]** Белок VWF, в используемом в данном документе значении, может содержать домен D' и домен D3 VWF, причем белок VWF связывается с FVIII и ингибирует связывание эндогенного VWF (полноразмерного VWF) с FVIII. Белок VWF, содержащий домен D' и домен D3, может дополнительно содержать домен VWF, выбранный из домена A1, домена A2, домена A3, домена D1, домена D2, домена D4, домена B1, домена B2, домена B3, домена C1, домена C2, домена CK, одного или более их фрагментов, или любую их комбинацию. В одном варианте реализации изобретения белок VWF содержит, состоит, по существу, из, или состоит из: (1) доменов D' и D3 VWF или их фрагментов; (2) доменов D1, D' и D3 VWF или их фрагментов; (3) доменов D2, D' и D3 VWF или их фрагментов; (4) доменов D1, D2, D' и D3 VWF или их фрагментов; или (5) доменов D1, D2, D', D3 или A1 VWF или их фрагментов. Белок VWF, описанный в данном документе, не содержит сайта связывания рецептора клиренса VWF. Белок VWF по настоящему изобретению может содержать любые другие последовательности, связанные

с или слитые с белком VWF. Например, белок VWF, описанный в данном документе, может дополнительно содержать сигнальный пептид.

**[00103]** В одном варианте реализации изобретения белок VWF связывается с или ассоциирован с белком FVIII. Благодаря связыванию с или ассоциации с белком FVIII, белок VWF по изобретению может защищать FVIII от расщепления протеазами и активации FVIII, стабилизирует тяжелую цепь и легкую цепь FVIII и предотвращает клиренс FVIII фагоцитарными рецепторами. В другом варианте реализации изобретения белок VWF связывается с или ассоциирует с белком FVIII и блокирует или предотвращает связывание белка FVIII с фосфолипидом и активированным белком С. В результате предотвращения или ингибирования связывания белка FVIII с эндогенным полноразмерным VWF, белок VWF по изобретению уменьшает клиренс FVIII рецепторами клиренса эндогенного VWF и, таким образом, увеличивает период полувыведения белка FVIII. Увеличение периода полувыведения белка FVIII, таким образом, вызвано ассоциацией белка FVIII с белком VWF с отсутствующим сайтом связывания рецептора клиренса VWF и, тем самым, экранирования и/или защиты белка FVIII от эндогенного VWF, который содержит сайт связывания рецептора клиренса VWF. Белок FVIII, связанный с или защищенный белком VWF, может также обеспечить возможность рециркуляции белка FVIII. Благодаря устранению сайтов связывания рецепторов пути клиренса VWF в полноразмерной молекуле VWF, гетеродимеры FVIII/VWF по изобретению защищены от пути клиренса VWF, что дополнительно увеличивает период полувыведения FVIII.

**[0100]** В одном варианте реализации изобретения белок VWF по настоящему изобретению содержит домен D' и домен D3 VWF, причем домен D' является по меньшей мере на около 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотам 764-866 SEQ ID NO: 2, и белок VWF предотвращает связывание эндогенного VWF с FVIII. В другом варианте реализации изобретения белок VWF содержит домен D' и домен D3 VWF, причем домен D3 является по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотам 867-1240 SEQ ID NO: 2, и белок VWF предотвращает связывание эндогенного VWF с FVIII. В некоторых вариантах реализации изобретения белок VWF, описанный в данном документе, содержит, состоит по существу из, или состоит из домена D' и домена D3 VWF, которые являются по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичными аминокислотам 764-1240 SEQ ID NO: 2, и белок VWF предотвращает связывание эндогенного VWF с FVIII. В других вариантах реализации изобретения белок VWF содержит, состоит, по существу, из, или состоит из

доменов D1, D2, D' и D3, по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичных аминокислотам 23-1240 SEQ ID NO: 2, и белок VWF предотвращает связывание эндогенного VWF с FVIII. В еще одних вариантах реализации изобретения белок VWF дополнительно содержит функционально связанный с ним сигнальный пептид.

**[0101]** В некоторых вариантах реализации изобретения белок VWF по изобретению состоит, по существу, из или состоит из (1) домена D'D3, домена D1D'D3, домена D2D'D3 или домена D1D2D'D3, и (2) дополнительной последовательности VWF, содержащей до около 10 аминокислот (например, любых последовательностей от аминокислоты 764-1240 SEQ ID NO: 2 до аминокислоты 764-1250 SEQ ID NO: 2), до около 15 аминокислот (например, любых последовательностей от аминокислоты 764-1240 SEQ ID NO: 2 до аминокислоты 764-1255 SEQ ID NO: 2), до около 20 аминокислот (например, любых последовательностей от аминокислоты 764-1240 SEQ ID NO: 2 до аминокислоты 764-1260 SEQ ID NO: 2), до около 25 аминокислот (например, любых последовательностей от аминокислоты 764-1240 SEQ ID NO: 2 до аминокислоты 764-1265 SEQ ID NO: 2), или до около 30 аминокислот (например, любых последовательностей от аминокислоты 764-1240 SEQ ID NO: 2 до аминокислоты 764-1260 SEQ ID NO: 2). В конкретном варианте реализации изобретения белок VWF, содержащий или состоящий по существу из домена D' и домена D3, не является аминокислотами 764-1274 SEQ ID NO: 2 или полноразмерным зрелым VWF. В некоторых вариантах реализации изобретения домен D1D2 экспрессируется в транс-конфигурации с доменом D'D3. В некоторых вариантах реализации изобретения домен D1D2 экспрессируется в цис-конфигурации с доменом D'D3.

**[0102]** В других вариантах реализации изобретения белок VWF, содержащий домены D'D3, связанные с доменами D1D2, дополнительно содержит внутриклеточный сайт процессинга, например, (сайт процессинга PACE (фурина) или PC5), что обеспечивает возможность отщепления доменов D1D2 от доменов D'D3 после экспрессии. Неограничивающие примеры внутриклеточных сайтов процессинга раскрыты в других разделах данного документа.

**[0103]** В других вариантах реализации изобретения белок VWF содержит домен D' и домен D3, но не содержит аминокислотной последовательности, выбранной из (1) аминокислот 1241-2813 SEQ ID NO: 2, (2) от аминокислоты 1270 до аминокислоты 2813 SEQ ID NO: 2, (3) от аминокислоты 1271 до аминокислоты 2813 SEQ ID NO: 2, (4) от аминокислоты 1272 до аминокислоты 2813 SEQ ID NO: 2, (5) от аминокислоты 1273 до

аминокислоты 2813 SEQ ID NO: 2, (6) от аминокислоты 1274 до аминокислоты 2813 SEQ ID NO: 2, или любую их комбинацию.

**[0104]** В еще одних вариантах реализации изобретения белок VWF по настоящему изобретению содержит, состоит, по существу, из, или состоит из аминокислотной последовательности, соответствующей домену D', домену D3 и домену A1, причем аминокислотная последовательность является по меньшей мере на 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотам 764-1479 SEQ ID NO: 2, и белок VWF предотвращает связывание эндогенного VWF с FVIII. В конкретном варианте реализации изобретения белок VWF не является аминокислотами 764-1274 SEQ ID NO: 2.

**[0105]** В некоторых вариантах реализации изобретения белок VWF по изобретению содержит домен D' и домен D3, но не содержит по меньшей мере одного домена VWF, выбранного из (1) домена A1, (2) домена A2, (3) домена A3, (4) домена D4, (5) домена B1, (6) домена B2, (7) домена B3, (8) домена C1, (9) домена C2, (10) домена СК, (11) домена СК и домена C2, (12) домена СК, домена C2 и домена C1, (13) домена СК, домена C2, домена C1, домена B3, (14) домена СК, домена C2, домена C1, домена B3, домена B2, (15) домена СК, домена C2, домена C1, домена B3, домена B2 и домена B1, (16) домена СК, домена C2, домена C1, домена B3, домена B2, домена B1 и домена D4, (17) домена СК, домена C2, домена C1, домена B3, домена B2, домена B1, домена D4 и домена A3, (18) домена СК, домена C2, домена C1, домена B3, домена B2, домена B1, домена D4, домена A3 и домена A2, (19) домена СК, домена C2, домена C1, домена B3, домена B2, домена B1, домена D4, домена A3, домена A2 и домена A1, или (20) любую их комбинацию.

**[0106]** В других вариантах реализации изобретения белок VWF содержит домены D'D3 и один или более доменов или модулей. Примеры таких доменов или модулей включают, без ограничений, домены и модули, раскрытые в Zhou et al., Blood, интернет-публикация 6 апреля 2012 г: DOI 10.1182/blood-2012-01-405134. Например, белок VWF, может содержать домен D'D3 и один или более доменов или модулей, выбранных из домена A1, домена A2, домена A3, модуля D4N, модуля VWD4, модуля C8-4, модуля TIL-4, модуля C1, модуля C2, модуля C3, модуля C4, модуля C5, модуля C5, модуля C6 или любую их комбинацию.

**[0107]** В определенных вариантах реализации изобретения белок VWF по изобретению образует мультимер, например, димер, тример, тетрамер, пентамер, гексамер, гептамер или мультимеры более высокого порядка. В других вариантах реализации изобретения белок VWF представляет собой мономер, содержащий только

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

**[0108]** В некоторых вариантах реализации изобретения белок VWF содержит аминокислотное замещение цистеина на аланин в положении остатка 336, соответствующего домену D'D3 VWF (остаток 1099 SEQ ID NO: 2) и аминокислотное замещение цистеина на аланин в положении остатка 379, соответствующего домену D'D3 VWF (остаток 1142 SEQ ID NO: 2), или оба.

**[0109]** В определенных вариантах реализации изобретения белок VWF, пригодный для использования по данному документу, может быть дополнительно модифицирован с целью улучшения его взаимодействия с FVIII, например, для улучшения аффинности связывания с FVIII. В качестве неограничивающего примера, белок VWF содержит остаток серина в положении остатка, соответствующего аминокислоте 764 SEQ ID NO: 2 и остаток лизина в положении остатка, соответствующего аминокислоте 773 SEQ ID NO: 2. Остатки 764 и/или 773 могут вносить свой вклад в аффинность связывания белков VWF с FVIII. В других вариантах реализации изобретения белок VWF, пригодный для использования по изобретению, может иметь другие модификации, например, белок может быть пегилированным, гликозилированным, гэкилированным или полисиалилированным.

### **II.C.3. Гетерологичный фрагмент**

**[0110]** Гетерологичный фрагмент, который может быть связан с белком VWF с помощью линкера VWF или с белком FVIII с помощью линкера FVIII, может быть гетерологичным полипептидом или гетерологичным неполипептидным фрагментом. В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент представляет собой молекулу, увеличивающую период полувыведения, которая известна в данной области техники и содержит полипептид, неполипептидный фрагмент, или комбинацию их обоих. Гетерологичный полипептидный фрагмент может содержать белок FVIII, константную область иммуноглобулина или ее участок, альбумин или его фрагмент, альбуминсвязывающий фрагмент, трансферрин или его фрагмент, последовательность PAS, последовательность NAR, их производное или вариант, С-концевой пептид (СТР)  $\beta$ -субъединицы хорионического гонадотропина человека, или любую их комбинацию. В некоторых вариантах реализации изобретения неполипептидный связывающий фрагмент содержит полиэтиленгликоль (ПЭГ), полисиаловую кислоту, гидроксипропилкрахмал (ГЭК), их производное, или любую их комбинацию. В определенных вариантах реализации изобретения могут присутствовать один, два, три или больше гетерологичных фрагментов, которые могут быть все одинаковыми или разными молекулами.

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

**[0111]** Константная область иммуноглобулина состоит из доменов, обозначенных как домены CH (Constant Heavy - константные тяжелые) (CH1, CH2 и т.д.). В зависимости от изоформа, (*m.e.* IgG, IgM, IgA, IgD или IgE), константная область может состоять из трех или четырех доменов CH. Константные области некоторых изоформ (например, IgG) также содержат шарнирную область. См. Janeway *et al.* 2001, *Immunobiology*, Garland Publishing, N.Y., N.Y.

**[0112]** Константная область иммуноглобулина или ее участок для получения химерного белка по настоящему изобретению могут быть получены из ряда разных источников. В некоторых вариантах реализации изобретения константную область иммуноглобулина или ее участок выделяют из человеческого иммуноглобулина. Следует понимать, однако, что константная область иммуноглобулина или ее часть может быть выделены из иммуноглобулина другого вида млекопитающих, включая, например, грызуна (например, мышь, крысу, кролика, морскую свинку) или вида не являющегося человеком примата (например, шимпанзе, макака). Кроме того, константная область иммуноглобулина или ее часть может быть выделены из иммуноглобулина любого класса, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изоформа иммуноглобулина, включая IgG1,

IgG2, IgG3 и IgG4. В одном варианте реализации изобретения используется человеческий изотип IgG1.

**[0113]** Различные генные последовательности константной области иммуноглобулина (например, генные последовательности человеческой константной области) являются доступными в форме публично доступных депозитариев. Могут быть выбраны последовательности доменов константной области, имеющие конкретную эффекторную функцию (или с отсутствующей конкретной эффекторной функцией), или с конкретной модификацией для снижения иммуногенности. Было опубликовано большое количество последовательностей антител и антитело-кодирующих генов, и пригодные последовательности константной области Ig (например, последовательности шарнира, СН2 и/или СН3, или их частей) могут быть выделены из таких последовательностей с использованием общепризнанных в данной области техники методов. Генетический материал, полученный с использованием любых из вышеописанных способов, может быть затем изменен или синтезирован для получения полипептидов по настоящему изобретению. Дополнительно следует понимать, что объем данного изобретения охватывает аллели, варианты и мутации последовательностей ДНК константной области.

**[0114]** Последовательности константной области иммуноглобулина или ее части могут быть клонированы, например, с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и праймеров, выбранных для амплификации домена, представляющего интерес. Для клонирования последовательности константной области иммуноглобулина или ее части из антитела, мРНК может быть выделена из гибридомы, селезенки или лимфатических клеток, подвергнута обратной транскрипции в ДНК, и гены антитела могут быть амплифицированы методом ПЦР. Способы амплификации с использованием ПЦР описаны подробно в патентах США №№ 4683195; 4683202; 4800159; 4965188; и, например, в “PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications” Innis et al. eds., Academic Press, San Diego, CA (1990); Ho et al. 1989. *Gene* 77:51; Horton et al. 1993. *Methods Enzymol.* 217:270).

**[0115]** Константная область иммуноглобулина, используемая в данном документе, может включать все домены и шарнирную область или их части. В одном варианте реализации изобретения константная область иммуноглобулина или ее часть содержит домен СН2, домен СН3 и шарнирную область, *т.е.* Fc-область или партнер связывания FcRn.

**[0116]** В используемом в данном документе значении термин “Fc-область” определен как часть полипептида, соответствующая Fc-области нативного иммуноглобулина, *т.е.* образующаяся в результате димерной ассоциации

соответствующих Fc-доменов ее двух тяжелых цепей. Нативная Fc-область образует гомодимер с другой Fc-областью.

**[0117]** В одном варианте реализации изобретения “Fc-область” относится к части одной тяжелой цепи иммуноглобулина, начинающейся в шарнирной области сразу за сайтом расщепления папаином против хода транскрипции (*m.e.* остатком 216 в IgG, считая 114 первым остатком константной области тяжелой цепи), и заканчивающейся на С-конце антитела. Соответственно, полный домен Fc содержит по меньшей мере шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3.

**[0118]** Fc-область константной области иммуноглобулина, в зависимости от изоформа иммуноглобулина, может включать домены CH2, CH3 и CH4, а также шарнирную область. Химерные белки, содержащие Fc-область иммуноглобулина, обладают несколькими желательными для химерных белков свойствами, включая повышенную стабильность, увеличенный период полувыведения из сыворотки (см. Caron *et al.*, 1989, *Nature* 337:525), а также связывание с Fc-рецепторами, такими как неонатальный Fc-рецептор (FcRn) (патенты США №№ 6086875, 6485726, 6030613; WO 03/077834; US2003-0235536A1), которые включены в данный документ в качестве ссылок в полном объеме.

**[0119]** Константная область иммуноглобулина или ее часть может быть партнером связывания FcRn. FcRn является активным в эпителиальных тканях взрослых и экспрессируется в полости кишечника, дыхательных путях легких, на носовых поверхностях, влажных поверхностях, поверхностях ободочной и прямой кишки (патент США № 6485726). Партнер связывания FcRn представляет собой часть иммуноглобулина, которая связывается с FcRn.

**[0120]** Рецептор FcRn был выделен у нескольких видов млекопитающих, включая человека. Последовательности FcRn человека, FcRn обезьяны, FcRn крысы и FcRn мыши являются известными (Story *et al.* 1994, *J. Exp. Med.* 180:2377). Рецептор FcRn связывает IgG (но не другие классы иммуноглобулина, такие как IgA, IgM, IgD и IgE) при относительно низких pH, активно транспортирует IgG трансцеллюлярно в направлении от полости к сыворотке и затем высвобождает IgG при относительно более высоком pH, наблюдающемся во внутритканевых жидкостях. Он экспрессируется в эпителиальной ткани взрослых особей (патенты США №№ 6485726, 6030613, 6086875; WO 03/077834; US2003-0235536A1), включая эпителий легкого и кишечника (Israel *et al.* 1997, *Immunology* 92:69), эпителий проксимальных почечных канальцев (Kobayashi *et al.* 2002, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282:F358), а также назальный эпителий, вагинальные поверхности и поверхности желчных протоков.

**[0121]** Партнеры связывания FcRn, пригодные для использования по настоящему изобретению, охватывают молекулы, которые могут специфически связываться FcRn-рецептором, включая цельный IgG, Fc-фрагмент IgG и другие фрагменты, которые включают полную область связывания рецептора FcRn. Область Fc-участка IgG, которая связывается с FcRn-рецептором, была описана на основе данных рентгеновской кристаллографии (Burmeister et al. 1994, Nature 372:379). Основной участок контакта Fc с FcRn находится возле места соединения доменов CH2 и CH3. Все контакты Fc-FcRn находятся на одной тяжелой цепи Ig. Партнеры связывания FcRn включают цельный IgG, Fc-фрагмент IgG и другие фрагменты IgG, которые включают полную область связывания FcRn. Основные контактные сайты включают аминокислотные остатки 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 и 314 домена CH2 и аминокислотные остатки 385-387, 428 и 433-436 домена CH3. Все приведенные указания нумерации аминокислот иммуноглобулинов или фрагментов или областей иммуноглобулинов основаны на системе Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md.

**[0122]** Fc-области или партнеры связывания FcRn, связанные с FcRn, могут быть эффективно перемещены через эпителиальные барьеры с помощью FcRn, тем самым обеспечивая неинвазивные средства для системного введения желательной терапевтической молекулы. Дополнительно, слитые белки, содержащие Fc-область или партнера связывания FcRn, подвергаются эндоцитозу клетками, экспрессирующими FcRn. Но вместо того, чтобы служить метками для деградации, такие слитые белки снова высвобождаются в циркуляцию, тем самым увеличивая *in vivo* период полувыведения таких белков. В определенных вариантах реализации изобретения частями константной области иммуноглобулинов являются Fc-область или партнер связывания FcRn, которые типично ассоциируются, с помощью дисульфидных связей и других неспецифических взаимодействий, с другой Fc-областью или другим партнером связывания FcRn с образованием димеров и мультимеров более высокого порядка.

**[0123]** Область партнера связывания FcRn представляет собой молекулу или ее часть, которая может специфически связываться рецептором FcRn с последующим активным транспортом рецептором FcRn Fc-области. Специфически связанный относится к двум молекулам, образующим комплекс, являющийся относительно стабильным в физиологических условиях. Специфическое связывание характеризуется высокой аффинностью и от низкой до умеренной емкостью, в отличие от неспецифического связывания, которое обычно имеет низкую аффинность с емкостью от умеренной до высокой. Типично, связывание считается специфическим, если константа аффинности

КА имеет значение выше  $10^6 \text{ M}^{-1}$ , или выше  $10^8 \text{ M}^{-1}$ . При необходимости, неспецифическое связывание может быть снижено без существенного влияния на специфическое связывание путем изменения условий связывания. Соответствующие условия связывания, такие как концентрация молекул, ионная сила раствора, температура, время связывания, концентрация блокирующего агента (например, сывороточный альбумин, казеин молока) и т.д., могут быть оптимизированы квалифицированным специалистом с использованием обычных методик.

**[0124]** Множество мутантов, фрагментов, вариантов и производных описаны, например, в публикациях РСТ №№ WO 2011/069164 A2, WO 2012/006623 A2, WO 2012/006635 A2 или WO 2012/006633 A2, которые все включены в данный документ в качестве ссылок в полном объеме.

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

**[0125]** В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент, связанный с белком VWF с помощью линкера VWF или связанный с белком FVIII с помощью линкера FVIII, представляет собой альбумин или его функциональный фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения альбумин, слитый с белком VWF, ковалентно ассоциирован с альбумином, слитым с белком FVIII.

**[0126]** Человеческий сывороточный альбумин (HSA или HA), белок, состоящий из 609 аминокислот в его полноразмерной форме, отвечает за значительную часть осмотического давления сыворотки, а также выполняет функции носителя эндогенных и экзогенных лигандов. Термин “альбумин”, в используемом в данном документе значении, включает полноразмерный альбумин или его функциональный фрагмент, вариант, производное или аналог. Примеры альбумина или его фрагментов или вариантов раскрыты в публикациях патентов США №№ 2008/0194481 A1, 2008/0004206 A1, 2008/0161243 A1, 2008/0261877 A1 или 2008/0153751 A1 или публикациях заявок РСТ №№ 2008/033413 A2, 2009/058322 A1 или 2007/021494 A2, которые включены в данный документ в качестве ссылок в полном объеме.

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

**[0127]** В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент, связанный с белком VWF с помощью линкера VWF или с белком FVIII с помощью линкера FVIII, представляет собой альбуминсвязывающий фрагмент, который содержит альбуминсвязывающий пептид, бактериальный альбуминсвязывающий домен, альбуминсвязывающий фрагмент антитела, или любую их комбинацию. Например,

альбуминсвязывающий белок может быть бактериальным альбуминсвязывающим белком, антителом или фрагментом антитела, включая домен антитела (см. патент США № 6696245). Альбуминсвязывающий белок, например, может быть бактериальным альбуминсвязывающим доменом, таким как принадлежащий стрептококковому белку G (Konig, T. and Skerra, A. (1998) *J. Immunol. Methods* 218, 73-83). Другими примерами альбуминсвязывающих пептидов, которые могут быть использованы в качестве партнера конъюгации, являются, например, пептиды, имеющие консенсусную последовательность Cys-Хаа<sub>1</sub>-Хаа<sub>2</sub>-Хаа<sub>3</sub>-Хаа<sub>4</sub>-Cys, где Хаа<sub>1</sub> обозначает Asp, Asn, Ser, Thr или Trp; Хаа<sub>2</sub> обозначает Asn, Gln, His, Ile, Leu или Lys; Хаа<sub>3</sub> обозначает Ala, Asp, Phe, Trp или Tyr; и Хаа<sub>4</sub> обозначает Asp, Gly, Leu, Phe, Ser или Thr, как описано в патентной заявке США 2003/0069395 или Dennis et al. (Dennis et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 35035-35043).

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

**[0128]** В других вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент, связанный с белком VWF с помощью линкера VWF или с белком FVIII с помощью линкера FVIII, представляет собой последовательность PAS. В одном варианте реализации изобретения химерная молекула содержит белок VWF, описанный в данном документе, слитый с последовательностью PAS с помощью линкера VWF. В другом варианте реализации изобретения химерная молекула по изобретению содержит первую цепь, содержащую белок VWF, слитый с последовательностью PAS с помощью линкера VWF, и вторую цепь, содержащую белок FVIII и дополнительную необязательную последовательность PAS, причем последовательность PAS экранирует или защищает сайт связывания VWF белка FVIII, тем самым ингибируя или предотвращая взаимодействие белка FVIII с эндогенным VWF. Две последовательности PAS могут быть ковалентно ассоциированы друг с другом.

**[0129]** Последовательность PAS, в используемом в данном документе значении, означает аминокислотную последовательность, содержащую преимущественно остатки аланина и серина, или содержащую преимущественно остатки аланина, серина и пролина, причем аминокислотная последовательность имеет в физиологических условиях конформацию случайного клубка. Соответственно, последовательность PAS представляет собой функциональный блок, аминокислотный полимер, или кассету последовательностей, содержащие, состоящие по существу из, или состоящие из аланина, серина и пролина, которые могут быть использованы как часть гетерологичного фрагмента в химерном белке. При этом, квалифицированный специалист понимает, что аминокислотный полимер также может принимать конформацию случайного клубка, если

в последовательность PAS добавить остатки, отличные от аланина, серина и пролина в качестве неосновного компонента. Термин “неосновной компонент”, в используемом в данном документе значении, означает, что аминокислоты, отличные от аланина, серина и пролина, могут быть добавлены в последовательность PAS до определенной степени, например, до около 12%, *т.е.* около 12 из 100 аминокислот последовательности PAS, до около 10%, *т.е.* около 10 из 100 аминокислот последовательности PAS, до около 9%, *т.е.* около 9 из 100 аминокислот, до около 8%, *т.е.* около 8 из 100 аминокислот, около 6%, *т.е.* около 6 из 100 аминокислот, около 5%, *т.е.* около 5 из 100 аминокислот, около 4%, *т.е.* около 4 из 100 аминокислот, около 3%, *т.е.* около 3 из 100 аминокислот, около 2%, *т.е.* около 2 из 100 аминокислот, около 1%, *т.е.* около 1 из 100 аминокислот. Аминокислоты, отличные от аланина, серина и пролина, могут быть выбраны из группы, состоящей из Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr и Val.

**[0130]** В физиологических условиях, отрезок последовательности PAS образует конформацию случайного клубка и, тем самым, может медиировать повышенную *in vivo* и/или *in vitro* стабильность VWF фактора или белка, проявляющего активность при коагуляции. Поскольку домен случайного клубка сам по себе не образует стабильной структуры или не проявляет функции, то биологическая активность, медируемая белком VWF или белком FVIII, с которым он связан, в значительной степени сохраняется. В других вариантах реализации изобретения последовательности PAS, которые образуют домен случайного клубка, являются биологически инертными, особенно по отношению к протеолизу в плазме крови, иммуногенности, изоэлектрической точке/электростатическим свойствам, связыванию с рецепторами клеточной поверхности или интернализации изобретения, но остаются биodeградируемыми, что обеспечивает явные преимущества по сравнению с синтетическими полимерами, такими как ПЭГ.

**[0131]** Неограничивающи примеры последовательностей PAS, образующих конформацию случайного клубка, включают аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из ASPAAPAPASPAAPACKPA (SEQ ID NO: 32), AAPASPARAAPCKPARAAPS (SEQ ID NO: 33), APSSPSICKPSSPASPSS (SEQ ID NO: 34), APSSPSICKPSSPASPSS (SEQ ID NO: 35), SSPICKPSSPASPSSPA (SEQ ID NO: 36), AASPAAPCKPPAAASPAAPCKPPA (SEQ ID NO: 37) и ASAAAPAAASAAASAPCKAA (SEQ ID NO: 38) или любую их комбинацию. Дополнительные примеры последовательностей PAS известны, например, из публикации патента США № 2010/0292130 A1 и публикации заявки PCT № WO 2008/155134 A1.

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

**[0132]** В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент, связанный с белком VWF с помощью линкера VWF или с белком FVIII с помощью линкера FVIII, представляет собой глицин-богатый гомоаминокислотный полимер (НАР). Последовательность НАР может содержать повторяющуюся последовательность глицина, имеющую длину по меньшей мере 50 аминокислот, по меньшей мере 100 аминокислот, 120 аминокислот, 140 аминокислот, 160 аминокислот, 180 аминокислот, 200 аминокислот, 250 аминокислот, 300 аминокислот, 350 аминокислот, 400 аминокислот, 450 аминокислот или 500 аминокислот. В одном варианте реализации изобретения последовательность НАР способна увеличивать период полувыведения фрагмента, слитого с или связанного с последовательностью НАР. Неограничивающие примеры последовательности НАР включают, без ограничений,  $(\text{Gly})_n$ ,  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$  или  $\text{S}(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ , где  $n$  равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В одном варианте реализации изобретения  $n$  равен 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40. В другом варианте реализации изобретения  $n$  равен 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200. См., например, Schlapschy M *et al.*, Protein Eng. Design Selection, 20: 273-284 (2007).

### **II.C.3.f. Трансферрин или его фрагмент**

**[0133]** В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент, связанный с белком VWF с помощью линкера VWF или с белком FVIII с помощью линкера FVIII, представляет собой трансферрин или его фрагмент. Любой трансферрин может быть использован для получения химерных молекул по изобретению. В качестве примера, человеческий Tf (Tf) дикого типа представляет собой белок из 679 аминокислот, около 75 кДа (без учета гликозилирования), с двумя основными доменами - N (около 330 аминокислот) и C (около 340 аминокислот), который, по-видимому, образуется в результате дубликации гена. См. GenBank, номера доступа NM001063, XM002793, M12530, XM039845, XM 039847 и S95936 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)), которые все включены в данный документ в качестве ссылок в полном объеме. Трансферрин содержит два домена - N-домен и C-домен. N-домен содержит два субдомена - домен N1 и домен N2, и C-домен содержит два субдомена - домен C1 и домен C2.

**[0134]** В одном варианте реализации изобретения трансферриновая часть химерной молекулы включает сплайсинговый вариант трансферрина. В одном примере, сплайсинговый вариант трансферрина может быть сплайсинговым вариантом человеческого трансферрина, например, Genbank, номер доступа AAA61140. В другом

варианте реализации изобретения трансферриновая часть химерной молекулы включает один или более доменов последовательности трансферрина, например, N-домен, С-домен, домен N1, домен N2, домен С1, домен С2 или любую их комбинацию.

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

**[0135]** В других вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент, соединенный с белком VWF с помощью линкера VWF или с белком FVIII с помощью линкера FVIII, представляет собой растворимый полимер, известный в данной области техники, включая, без ограничений, полиэтиленгликоль, сополимеры этиленгликоль/пропиленгликоль, карбоксиметилцеллюлозу, декстран или поливиниловый спирт. Гетерологичный фрагмент, такой как растворимый полимер, может быть присоединен к любому положению в химерной молекуле.

**[0136]** В определенных вариантах реализации изобретения химерная молекула содержит белок VWF, связанный с гетерологичным фрагментом (например, Fc-областью) с помощью линкера VWF, причем белок VWF дополнительно связан с ПЭГ. В другом варианте реализации изобретения химерная молекула содержит белок VWF, соединенный с Fc-областью с помощью линкера VWF, и белок FVIII, которые ассоциированы друг с другом, причем белок FVIII соединен с ПЭГ.

**[0137]** Изобретение также предусматривает химически модифицированные производные химерной молекулы по изобретению, которые могут обеспечивать дополнительные преимущества, такие как повышенная растворимость, стабильность и время циркуляции полипептида, или пониженная иммуногенность (см. патент США № 4179337). Химические фрагменты для модификации могут быть выбраны из водорастворимых полимеров, включая, без ограничений, полиэтиленгликоль, сополимеры этиленгликоля/пропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлозу, декстран или поливиниловый спирт. Химерная молекула может быть модифицирована в случайных положениях внутри молекулы или на N- или С-конце, или в предварительно определенных положениях внутри молекулы, и могут включать один, два, три или больше присоединенных химических фрагментов.

**[0138]** Полимер может иметь любой молекулярный вес и могут быть разветвленным или неразветвленным. Для полиэтиленгликоля, в одном варианте реализации изобретения молекулярный вес имеет значение между около 1 кДа и около 100 кДа для простоты обращения и производства. Могут быть использованы другие размеры, в зависимости от желательного профиля (например, продолжительности желательного пролонгированного высвобождения, влияния, если оно наблюдается, на

биологическую активность, простоты обращения, степени антигенности или ее отсутствия и других известных эффектов воздействия полиэтиленгликоля на белок или аналог). Например, полиэтиленгликоль может иметь средний молекулярный вес около 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 8500, 9000, 9500, 10000, 10500, 11000, 11500, 12000, 12500, 13000, 13500, 14000, 14500, 15000, 15500, 16000, 16500, 17000, 17500, 18000, 18500, 19000, 19500, 20000, 25000, 30000, 35000, 40000, 45000, 50000, 55000, 60000, 65000, 70000, 75000, 80000, 85000, 90000, 95000 или 100000 кДа.

**[0139]** В некоторых вариантах реализации изобретения полиэтиленгликоль может иметь разветвленное строение. Разветвленные полиэтиленгликоли описаны, например, в патенте США № 5643575; Morpurgo *et al.*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 56:59-72 (1996); Vorobjev *et al.*, *Nucleosides Nucleotides* 18:2745-2750 (1999); и Caliceti *et al.*, *Bioconjug. Chem.* 10:638-646 (1999), которые все включены в данный документ в качестве ссылок в полном объеме.

**[0140]** Число фрагментов полиэтиленгликоля, присоединенных к каждой химерной молекуле (*m.e.* степень замещения) также может меняться. Например, пегилированные белки по изобретению могут быть связаны в среднем с 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 20 или больше молекулами полиэтиленгликоля. Аналогично, средняя степень замещения (может иметь значение) в диапазоне, таком как 1-3, 2-4, 3-5, 4-6, 5-7, 6-8, 7-9, 8-10, 9-11, 10-12, 11-13, 12-14, 13-15, 14-16, 15-17, 16-18, 17-19, или 18-20 фрагментов полиэтиленгликоль на молекулу белка. Способы определения степени замещения описаны, например, в Delgado *et al.*, *Crit. Rev. Thera. Drug Carrier Sys.* 9:249-304 (1992).

**[0141]** В других вариантах реализации изобретения белок FVIII, используемый в изобретении, конъюгирован с одним или более полимерами. Полимер может быть водорастворимым и ковалентно или нековалентно присоединенным к фактору VIII или другим фрагментам, конъюгированным с фактором VIII. Неограничивающими примерами полимера могут быть полиалкиленоксид, поливинилпирролидон, поливиниловый спирт, полиоксазолин или полиакрилоилморфолин. Дополнительные типы полимер-конъюгированного FVIII раскрыты в патенте США № 7199223.

### **II.C.3.h. Гидроксиэтилкрахмал (ГЭК)**

**[0142]** В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент, связанный с белком VWF с помощью линкера VWF или с белком FVIII с помощью линкера FVIII, представляет собой полимер, например, гидроксиэтилкрахмал (ГЭК) или его производное.

**[0143]** Гидроксиэтилкрахмал (ГЭК) представляет собой производное природного амилопектина и деградируется в организме альфа-амилазой. ГЭК представляет собой замещенное производное углеводного полимера амилопектина, который присутствует в кукурузном крахмале в концентрации до 95% мас. ГЭК проявляет полезные биологические свойства и используется как объемный кровезаменитель и в гемодилюционной терапии в клинических условиях (Sommermeyer *et al.*, *Krankenhauspharmazie*, 8(8), 271-278 (1987); и Weidler *et al.*, *Arzneim.-Forschung/Drug Res.*, 41, 494-498 (1991)).

**[0144]** Амилопектин содержит фрагменты глюкозы, причем в основной цепи присутствуют альфа-1,4-гликозидные связи, а в узлах ветвления находятся альфа-1,6-гликозидные связи. Физико-химические свойства этой молекулы преимущественно определяются типом гликозидных связей. Вследствие одноцепочечных разрывов альфа-1,4-гликозидных связей образуются спиральные структуры с около шестью глюкозными мономерами на виток. Физико-химические, а также биохимические свойства полимера могут быть модифицированы путем замещения. Введение гидроксиэтильной группы может быть осуществлено путем щелочного гидроксиэтилирования. Изменяя реакционные условия, можно использовать разную реакционную способность соответствующей гидроксильной группы в незамещенном глюкозном мономере по отношению к гидроксиэтилированию. Благодаря этому, квалифицированный специалист способен, в ограниченной степени, влиять на характер замещения.

**[0145]** ГЭК преимущественно характеризуется распределением молекулярного веса и степенью замещения. Степень замещения, обозначаемая как DS, относится к молярному замещению, как известно квалифицированным специалистам. См. Sommermeyer *et al.*, *Krankenhauspharmazie*, 8(8), 271-278 (1987), указанный выше, особенно на с. 273.

**[0146]** В одном варианте реализации изобретения гидроксиэтилкрахмал имеет средний молекулярный вес (средневзвешенный) от 1 до 300 кДа, от 2 до 200 кДа, от 3 до 100 кДа, или от 4 до 70 кДа. Гидроксиэтилкрахмал может дополнительно обладать молярной степенью замещения от 0,1 до 3, предпочтительно от 0,1 до 2, более предпочтительно от 0,1 до 0,9, предпочтительно от 0,1 до 0,8, и соотношением между C2:C6 замещением в диапазоне значений от 2 до 20 по отношению к гидроксиэтильным группам. Неограничивающим примером ГЭК, имеющего средний молекулярный вес около 130 кДа, является ГЭК со степенью замещения от 0,2 до 0,8, такой как 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 или 0,8, предпочтительно от 0,4 до 0,7, такой как 0,4, 0,5, 0,6 или 0,7. В конкретном варианте реализации изобретения ГЭК со средним молекулярным весом

около 130 кДа является продуктом VOLUVEN<sup>®</sup> фирмы Fresenius. VOLUVEN<sup>®</sup> представляет собой искусственный коллоид, применяемый, например, для объемного замещения, используемый по терапевтическим показаниям в терапии и профилактике гиповолемии. VOLUVEN<sup>®</sup> характеризуется средним молекулярным весом 130000+/-20000 Да, молярным замещением 0,4 и соотношением C2:C6, равным около 9:1. В других вариантах реализации изобретения диапазоны значений среднего молекулярного веса гидроксиэтилкрахмала составляют, например, от 4 до 70 кДа, или от 10 до 70 кДа, или от 12 до 70 кДа, или от 18 до 70 кДа, или от 50 до 70 кДа, или от 4 до 50 кДа, или от 10 до 50 кДа, или от 12 до 50 кДа, или от 18 до 50 кДа, или от 4 до 18 кДа, или от 10 до 18 кДа, или от 12 до 18 кДа, или от 4 до 12 кДа, или от 10 до 12 кДа, или от 4 до 10 кДа. В еще одних вариантах реализации изобретения средний молекулярный вес используемого гидроксиэтилкрахмала находится в диапазоне значений от более чем 4 кДа до менее чем 70 кДа, например, около 10 кДа, или в диапазоне значений от 9 до 10 кДа или от 10 до 11 кДа или от 9 до 11 кДа, или около 12 кДа, или в диапазоне значений от 11 до 12 кДа) или от 12 до 13 кДа или от 11 до 13 кДа, или около 18 кДа, или в диапазоне значений от 17 до 18 кДа или от 18 до 19 кДа или от 17 до 19 кДа, или около 30 кДа, или в диапазоне значений от 29 до 30 или от 30 до 31 кДа, или около 50 кДа, или в диапазоне значений от 49 до 50 кДа или от 50 до 51 кДа или от 49 до 51 кДа.

**[0147]** В определенных вариантах реализации изобретения гетерологичный фрагмент может быть смесями гидроксиэтилкрахмалов, имеющих разные средние молекулярные веса и/или разные степени замещения и/или разные соотношения C2:C6 замещения. Таким образом, могут быть использованы смеси гидроксиэтилкрахмалов, имеющих разные средние молекулярные веса и разные степени замещения и разные соотношения C2:C6 замещения, или имеющих имеющих разные средние молекулярные веса и разные степени замещения и одинаковые или примерно одинаковые соотношения C2:C6 замещения, или имеющих имеющих разные средние молекулярные веса и разные степени замещения и одинаковые или примерно одинаковые соотношения C2:C6 замещения, или имеющих имеющих разные средние молекулярные веса и одинаковые или примерно одинаковые соотношения C2:C6 замещения, или имеющих имеющих одинаковый или примерно одинаковый средний молекулярный вес и разные степени замещения и разные соотношения C2:C6 замещения, или имеющих имеющих одинаковый или примерно одинаковый средний молекулярный вес и одинаковые или примерно одинаковые соотношения C2:C6 замещения, или имеющих имеющих одинаковые или примерно одинаковые средние молекулярные веса и разные степени замещения и одинаковые или примерно одинаковые соотношения C2:C6 замещения, или имеющих имеющих одинаковый или примерно одинаковый средний молекулярный вес и одинаковые или примерно одинаковые степени замещения и разные соотношения C2:C6

замещения, или имеющих примерно одинаковый средний молекулярный вес и примерно одинаковую степень замещения и примерно одинаковое соотношение C2:C6 замещения.

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

**[0148]** В определенных вариантах реализации изобретения неполипептидный гетерологичный фрагмент, связанный с белком VWF с помощью линкера VWF или с белком FVIII с помощью линкера FVIII, представляет собой полимер, например, полисиаловые кислоты (ПСК) или их производное. Полисиаловые кислоты (ПСК) являются природными неразветвленными полимерами сиаловой кислоты, продуцируемыми определенными бактериальными штаммами и у млекопитающих в определенных клетках. Roth J., et al. (1993) in *Polysialic Acid: From Microbes to Man*, eds. Roth J., Rutishauser U., Troy F. A. (Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland), pp 335–348. Они могут быть получены с различными степенями полимеризации от  $n \approx 80$  или больше остатков сиаловой кислоты и в меньшую сторону до  $n=2$ , путем ограниченного кислотного гидролиза, или путем ферментативного разложения нейраминидазами, или фракционированием природных бактериально вырабатываемых форм полимера. Композиция разных полисиаловых кислот также меняется таким образом, что существуют гомополимерные формы, *т.е.* альфа-2,8-связанная полисиаловая кислота, содержащая капсульный полисахарид штамма K1 *E. coli* и менингококков группы В, который также присутствует в эмбриональной форме молекулы адгезии нервных клеток (N-CAM). Существуют также гетерополимерные формы - такие как чередующаяся альфа-2,8 альфа-2,9 полисиаловая кислота штамма K92 *E. coli* и полисахариды группы С *N. meningitidis*. Сиаловая кислота может также присутствовать в чередующихся сополимерах с мономерами, отличными от сиаловой кислоты, такими как группа W135 или группа Y *N. meningitidis*. Полисиаловые кислоты обладают важными биологическими функциями, включая избежание воздействия иммунной системы и системы комплемента патогенными бактериями и регуляцию глиальной адгезивности незрелых нейронов во время развития плода (в которой полимер выполняет антиадгезивную функцию) Cho and Troy, *P.N.A.S., USA*, 91 (1994) 11427-11431, хотя рецепторы полисиаловой кислоты у млекопитающих неизвестны. Альфа-2,8-связанная полисиаловая кислота штамма K1 *E. coli* также известна как "коломиновая кислота" и используется (с различными длинами) для иллюстрации настоящего изобретения. Были описаны различные способы присоединения или конъюгации полисиаловых кислот к полипептиду (например, см. патент США № 5846951; WO-A-0187922 и US 2007/0191597 A1, которые включены в данный документ в качестве ссылок в полном объеме.

**II.C.4. Последовательность XTEN.**

**[0149]** В используемом в данном документе значении, "последовательность XTEN" относится к полипептидам увеличенной длины с неприродными, по существу неповторяющимися последовательностями, которые состоят преимущественно из малых гидрофильных аминокислот, с последовательностью, имеющей низкую степень или не имеющей вторичной или третичной структуры в физиологических условиях. В качестве партнера химерного белка, XTEN может служить носителем, обеспечивая определенные желательные фармакокинетические, физико-химические и фармацевтические свойства при связывании с белком VWF или белком FVIII по изобретению для получения химерного белка. Такие желательные свойства включают, без ограничений, улучшенные фармакокинетические параметры и характеристики растворимости. В используемом в данном документе значении, "XTEN" определено исключает антитела или фрагменты антител, такие как одноцепочечные антитела или Fc-фрагменты легкой цепи или тяжелой цепи.

**[0150]** В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность XTEN по изобретению представляет собой пептид или полипептид, содержащий более чем около 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 или 2000 аминокислотных остатков. В определенных вариантах реализации изобретения XTEN представляет собой пептид или полипептид, содержащий от более чем около 20 до около 3000 аминокислотных остатков, от более чем 30 до около 2500 остатков, от более чем 40 до около 2000 остатков, от более чем 50 до около 1500 остатков, от более чем 60 до около 1000 остатков, от более чем 70 до около 900 остатков, от более чем 80 до около 800 остатков, от более чем 90 до около 700 остатков, от более чем 100 до около 600 остатков, от более чем 110 до около 500 остатков, или от более чем 120 до около 400 остатков.

**[0151]** Последовательность XTEN по изобретению, может содержать один или более мотивов последовательности, состоящих из от 9 до 14 аминокислотных остатков, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную мотиву последовательности, причем мотив содержит, состоит, по существу, из, или состоит из 4-6 типов аминокислот, выбранных из группы, состоящей из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P). См. US 2010-0239554 A1.

**[0152]** В некоторых вариантах реализации изобретения XTEN содержит неперекрывающиеся мотивы последовательности, в которых около 80%, или по меньшей мере около 85%, или по меньшей мере около 90%, или около 91%, или около 92%, или

около 93%, или около 94%, или около 95%, или около 96%, или около 97%, или около 98%, или около 99% или около 100% последовательности состоит из множества звеньев неперекрывающихся последовательностей, выбранных из одного семейства мотивов, выбранных из Таблицы 2А, с образованием последовательности семейства. В используемом в данном документе значении, “семейство” означает, что ХТЕН имеет мотивы, выбранные только из одной категории мотивов из Таблицы 2А; т.е. ХТЕН AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC или BD, и что любые другие аминокислоты в ХТЕН, не принадлежащие к мотивам семейства, выбирают для достижения требуемого свойства, такого как обеспечение возможности включения сайта рестрикции с помощью кодирующих нуклеотидов, включения расщепляемой последовательности, или достижение лучшей связи с FVIII или VWF. В некоторых вариантах реализации семейств ХТЕН, последовательность ХТЕН содержит множество звеньев неперекрывающиеся мотивов последовательности семейства мотивов AD, или семейства мотивов AE, или семейства мотивов AF, или семейства мотивов AG, или семейства мотивов AM, или семейства мотивов AQ, или семейства BC, или семейства BD, причем полученный ХТЕН демонстрирует диапазон значений гомологии, описанный выше. В других вариантах реализации изобретения ХТЕН содержит множество звеньев последовательностей мотива из двух или больше семейств мотивов из Таблицы 2А. Такие последовательности могут быть выбраны для достижения желательных физических/химических характеристик, включая такие свойства, как суммарный заряд, гидрофильность, отсутствие вторичной структуры, или отсутствие повторяемости, которые обеспечиваются аминокислотным составом мотивов, описанных более подробно ниже. В вариантах реализации изобретения описанных выше в данном абзаце, мотивы, включенные в ХТЕН, могут быть выбраны и собраны с использованием способов, описанных в данном документе, для получения ХТЕН, состоящего из от около 36 до около 3000 аминокислотных остатков.

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

<b>Семейство мотива*</b>	<b>Последовательность мотива</b>
AD	GESPGGSSGSES (SEQ ID NO: 49)
AD	GSEGSSGPGESS (SEQ ID NO: 50)
AD	GSSESGSSEGGP (SEQ ID NO: 51)
AD	GSGGEPSESGSS (SEQ ID NO: 52)
AE, AM	GSPAGSPTSTEE (SEQ ID NO: 53)
AE, AM, AQ	GSEPATSGSETP (SEQ ID NO: 54)
AE, AM, AQ	GTSESATPESGP (SEQ ID NO: 55)
AE, AM, AQ	GTSTEPSEGSAP (SEQ ID NO: 56)

Семейство мотива*	Последовательность мотива
AF, AM	GSTSESPSGTAP (SEQ ID NO: 57)
AF, AM	GTSTPESGSASP (SEQ ID NO: 58)
AF, AM	GTSPSGESSTAP (SEQ ID NO: 59)
AF, AM	GSTSSTAESP GP (SEQ ID NO: 60)
AG, AM	GTPGSGTASSSP (SEQ ID NO: 61)
AG, AM	GSSTPSGATGSP (SEQ ID NO: 62)
AG, AM	GSSPSASTGTGP (SEQ ID NO: 63)
AG, AM	GASPGTSSTGSP (SEQ ID NO: 64)
AQ	GEPAGSPTSTSE (SEQ ID NO: 65)
AQ	GTGEPSSTPASE (SEQ ID NO: 66)
AQ	GSGPSTESAPTE (SEQ ID NO: 67)
AQ	GSETPSGPSETA (SEQ ID NO: 68)
AQ	GPSETSTSEPGA (SEQ ID NO: 69)
AQ	GSPSEPTEGTSA (SEQ ID NO: 70)
BC	GSGASEPTSTEP (SEQ ID NO: 71)
BC	GSEPATSGTEPS (SEQ ID NO: 72)
BC	GTSEPSTSEPGA (SEQ ID NO: 73)
BC	GTSTEPSEPGSA (SEQ ID NO: 74)
BD	GSTAGSETSTEA (SEQ ID NO: 75)
BD	GSETATSGSETA (SEQ ID NO: 76)
BD	GTSESATSESGA (SEQ ID NO: 77)
BD	GTSTEASEGSAS (SEQ ID NO: 78)

- Обозначает последовательности индивидуальных мотивов, которые, при использовании вместе с различными перестановками, приводят к “последовательности семейства”

**[0153]** XTEN могут также иметь различную длину для вставки в или связывания с FVIII или VWF, или любыми другими компонентами химерной молекулы. В одном варианте реализации изобретения длину последовательности (последовательностей) XTEN выбирают на основании свойства или функции, которые должны быть достигнуты у слитого белка. В зависимости от предполагаемого свойства или функции, XTEN может быть последовательностью короткой или промежуточной длины или более длинной последовательностью, которые могут служить носителями. В определенных вариантах реализации изобретения XTEN включает короткие сегменты, состоящие из от около 6 до около 99 аминокислотных остатков, с промежуточной длиной от около 100 до около 399 аминокислотных остатков, и с еще большими длинами от около 400 до около 1000 и до около 3000 аминокислотных остатков. Таким образом, XTEN, вставленный в или связанный с FVIII или VWF, может иметь длину около 6, около 12, около 36, около 40, около 42, около 72, около 96, около 144, около 288, около 400, около 500, около 576, около 600, около 700, около 800, около 864, около 900, около 1000, около 1500, около 2000, около 2500 или до около 3000 аминокислотных остатков. В других вариантах реализации изобретения последовательности XTEN имеют длину от около 6 до около 50, около от 50 до 100, около от 100 до 150, около от 150 до 250, около от 250 до 400, от около 400 до

около 500, от около 500 до около 900, около от 900 до 1500, около от 1500 до 2000 или от около 2000 до около 3000 аминокислотных остатков. Точная длина XTEN, вставленного в или связанного с FVIII или VWF, может меняться без нежелательного влияния на активность FVIII или VWF. В одном варианте реализации изобретения один или более из XTEN, используемых в данном документе, имеет длину 36 аминокислот, 42 аминокислоты, 72 аминокислоты, 144 аминокислоты, 288 аминокислот, 576 аминокислот или 864 аминокислоты, и может быть выбран из одной или более из последовательностей семейства XTEN; т.е. AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC или BD.

**[0154]** В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность XTEN, используемая в изобретении, является по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной последовательности, выбранной из группы, состоящей из AE42, AG42, AE48, AM48, AE72, AG72, AE108, AG108, AE144, AF144, AG144, AE180, AG180, AE216, AG216, AE252, AG252, AE288, AG288, AE324, AG324, AE360, AG360, AE396, AG396, AE432, AG432, AE468, AG468, AE504, AG504, AF504, AE540, AG540, AF540, AD576, AE576, AF576, AG576, AE612, AG612, AE624, AE648, AG648, AG684, AE720, AG720, AE756, AG756, AE792, AG792, AE828, AG828, AD836, AE864, AF864, AG864, AM875, AE912, AM923, AM1318, BC864, BD864, AE948, AE1044, AE1140, AE1236, AE1332, AE1428, AE1524, AE1620, AE1716, AE1812, AE1908, AE2004A, AG948, AG1044, AG1140, AG1236, AG1332, AG1428, AG1524, AG1620, AG1716, AG1812, AG1908 и AG2004. См. US 2010-0239554 A1.

**[0155]** В одном варианте реализации изобретения последовательность XTEN является по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из AE42, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288, AG144 и любых их комбинаций. В другом варианте реализации изобретения последовательность XTEN выбирают из группы, состоящей из AE42, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288, AG144 и любых их комбинаций. В конкретном варианте реализации изобретения последовательность XTEN представляет собой AE288. Аминокислотные последовательности для определенных последовательностей XTEN по изобретению приведены в Таблице 2В.

Таблица 2В. Последовательности ХТЕН

ХТЕН	Аминокислотная последовательность
AE42 SEQ ID NO: 39	GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS
AE72 SEQ ID NO: 40	GAP TSESATPESG PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG TSTEPSEGSA PGASS
AE144 SEQ ID NO: 41	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESA PESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
AG144 SEQ ID NO: 42	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP
AE288 SEQ ID NO: 43	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG288 SEQ ID NO: 44	PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS
AE576 SEQ ID NO: 45	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG576 SEQ ID NO: 46	PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGS
AE864 SEQ ID NO: 47	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS

	EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG864 SEQ ID NO: 48	GASPPTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTSGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP

**[0156]** В тех вариантах реализации изобретения, где в используемом компоненте XTEN менее 100% аминокислот состоит из 4, 5 или 6 типов аминокислот, выбранных из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), или менее 100% последовательностей, состоящих из последовательностей мотивов из Таблицы 2A или последовательностей XTEN Таблицы 2B, а другие аминокислотные остатки XTEN выбраны из любых других 14 природных L-аминокислот, но предпочтительно выбраны из гидрофильных аминокислот таким образом, чтобы последовательность XTEN содержала по меньшей мере около 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или по меньшей мере около 99% гидрофильных аминокислот. Аминокислоты XTEN, не являющиеся глицином (G), аланином (A), серином (S), треонином (T), глутаматом (E) и пролином (P) или разбросаны по последовательности XTEN, или расположены внутри или между мотивами последовательностей, или сконцентрированы в одном или более коротких отрезках последовательности XTEN, например, для создания линкера между XTEN и другими компонентами; например, белком VWF. В тех случаях, когда компонент XTEN содержит аминокислоты, отличные от глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), предпочтительно менее чем около 2% или менее около 1% аминокислот являются гидрофобными остатками так, чтобы полученные последовательности в общем не имели вторичной структуры, например, имели не более 2% альфа-спиралей или 2% бета-листов, при определении способами, раскрытыми в данном документе. Гидрофобные остатки, являющиеся менее благоприятными для конструирования XTEN, включают триптофан, фенилаланин, тирозин, лейцин, изолейцин, валин и метионин. Дополнительно, можно спроектировать последовательности XTEN, которая содержит менее 5%, или менее 4%, или менее 3%, или менее 2%, или менее 1%,

или вообще не содержит следующие аминокислоты: цистеин (чтобы избежать образования дисульфидных связей и окисления), метионин (во избежание окисления), аспарагин и глутамин (во избежание дезамидирования). Таким образом, в некоторых вариантах реализации изобретения ХТЕН, содержащий другие аминокислоты помимо глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P), имеет последовательность с менее чем 5% остатков, участвующих в образовании альфа-спиралей и бета-листов, при измерении по алгоритму Чоу-Фасмана, и на по меньшей мере 90%, или по меньшей мере около 95% или больше образуют случайный клубок, при измерении по алгоритму GOR.

**[0157]** В дополнительных вариантах реализации изобретения последовательность ХТЕН, используемая в изобретении, влияет на физическое или химическое свойство, например, фармакокинетическую, химерного белка по настоящему изобретению. Последовательность ХТЕН, используемая в настоящем изобретении, может проявлять одно или более из следующих предпочтительных свойств: конформационная гибкость, повышенная растворимость в воде, высокая степень стойкости к протеазе, низкая иммуногенность, низкое связывание с рецепторами млекопитающего, или увеличенные гидродинамические (или стоксовы) радиусы. В конкретном варианте реализации изобретения последовательность ХТЕН, связанная с белком FVIII в данном изобретении улучшает фармакокинетические свойства, такие как более длительный период полувыведения в конечной фазе или увеличенная площадь под кривой (AUC), так чтобы химерный белок, описанный в данном документе, оставался *in vivo* в течение более длительного периода времени по сравнению с FVIII дикого типа. В дополнительных вариантах реализации изобретения последовательность ХТЕН, используемая в данном изобретении, улучшает фармакокинетические свойства, такие как более длительный период полувыведения в конечной фазе или увеличенная площадь под кривой (AUC), так чтобы белок FVIII оставался *in vivo* в течение более длительного периода времени по сравнению с FVIII дикого типа.

**[0158]** Различные способы и методы анализа могут применяться для определения физических/химических свойств белков, содержащих последовательность ХТЕН. Такие способы включают, без ограничений, аналитическое центрифугирование, ЭПР, ВЭЖХ-ионный обмен, ВЭЖХ-эксклюзионную хроматографию, ВЭЖХ-обращенная фаза, светорассеяние, капиллярный электрофорез, круговой дихроизм, дифференциальную сканирующую калориметрию, флуоресценцию, ВЭЖХ-ионный обмен, ВЭЖХ-эксклюзионную хроматографию, ИК, ЯМР, рамановскую спектроскопию,

рефрактометрию и УФ/видимую спектроскопию. Дополнительные способы раскрыты в Amau *et al.*, *Prot Expr and Purif* 48, 1-13 (2006).

**[0159]** Дополнительные примеры последовательностей ХТЕН, которые могут быть использованы в соответствии с настоящим изобретением, раскрыты в публикациях патентов США №№ 2010/0239554 А1, 2010/0323956 А1, 2011/0046060 А1, 2011/0046061 А1, 2011/0077199 А1 или 2011/0172146 А1, или международных патентных публикациях №№ WO 2010091122 А1, WO 2010144502 А2, WO 2010144508 А1, WO 2011028228 А1, WO 2011028229 А1, WO 2011028344 А2 или WO2013123457 А1, или международных заявках №№ PCT/US2013/049989.

### **II.C.5. Белок FVIII**

**[0160]** “Белок FVIII”, в используемом в данном документе значении, означает функциональный полипептид FVIII в его нормальной роли в коагуляции, если не указано иное. Термин белок FVIII включает его функциональный фрагмент, вариант, аналог или производное, которые сохраняют функцию полноразмерного фактора VIII дикого типа в пути коагуляции. “Белок FVIII” используется взаимозаменяемо с полипептидом (или протеином) FVIII или FVIII. Примеры функций FVIII включают, без ограничений, способность активировать коагуляцию, способность выступать в роли кофактора для фактора IX, или способность образовывать теназный комплекс с фактором IX в присутствии  $Ca^{2+}$  и фосфолипидов, который затем превращает фактор X в активированную форму Xa. Белок FVIII может быть человеческим, свиным, собачьим, крысиным или мышинным белком FVIII. Кроме того, сравнения между FVIII, полученным от людей и от других видов, позволили идентифицировать консервативные остатки, которые вероятно необходимы для обеспечения его функции (Cameron *et al.*, *Thromb. Haemost.* 79:317-22 (1998); US 6251632).

**[0161]** Имеется ряд тестов для оценки функции системы коагуляции: тест на активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), хромогенный анализ, анализ методом ротационной тромбоэластометрии (ROTEM), тест на протромбиновое время (PT) (также используемый для определения INR), тестирование на фибриноген (часто по методу Клауса), подсчет тромбоцитов, тестирование функции тромбоцитов (часто методом PFA-100), ТСТ, время кровотечения, тест на смешение (исправляется ли аномалия, если плазму пациента смешивают с нормальной плазмой), анализы коагулирующего фактора, антифосфолипидные антитела, D-димер, генетические тесты (например фактор V Лейдена, мутация протромбина G20210A), время разбавленного яда гадюки Рассела (dRVVT), различные тесты функции тромбоцитов, тромбоэластография

(ТЭГ или Sonoclot), тромбозластометрия (ТЭМ<sup>®</sup>, например, ROTEM<sup>®</sup>), или эуглобулиновое время лизиса (ELT).

**[0162]** Тест АЧТВ представляет собой показатель эффективности, измеряющий эффективность как "внутреннего" (также называемого контактным путем активации), так и общего путей коагуляции. Этот тест обычно используется для измерения активности свертывания коммерчески доступных рекомбинантных факторов свертывания крови, например, FVIII или FIX. Он используется в сочетании с протромбиновым временем (PT), которое измеряет внешний путь.

**[0163]** Анализ ROTEM дает информацию о кинетике гемостаза в целом: время свертывания, образование сгустка, стабильность сгустка и лизис. Разные параметры в тромбозластометрии зависят от активности системы плазматической коагуляции, функции тромбоцитов, фибринолиза или большого количества факторов, влияющих на эти взаимодействия. Этот анализ может обеспечить целостную картину вторичного гемостаза.

**[0164]** Полипептид FVIII и полинуклеотидные последовательности известны, как и многие функциональные фрагменты, мутанты и модифицированные варианты. Примеры человеческих последовательностей FVIII (полноразмерных) приведены как субпоследовательности в SEQ ID NO: 16 или 18.

**[0165]** Таблица 3. Полноразмерный FVIII (сигнальный пептид FVIII подчеркнут; тяжелая цепь FVIII подчеркнута двойной линией; В-домен выделен наклонным шрифтом; и легкая цепь FVIII представлена обычным шрифтом)

Сигнальный пептид: (SEQ ID NO: 15)  
MQIELSTCFFLCLLRFCFS

Зрелый фактор VIII (SEQ ID NO: 16)\*

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFRVPKSFNFNTSVVYKKTFLVEFTDHLFENIAKPRPPWMGLLGPTIQ  
AEVYDVTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCL  
TYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMODRDAASARAWPKM  
HTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLLMDLGQFL  
FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSPFIQIRSVAKKHPKTWVHY  
IAAEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQIRIGRKYKQVRFMAYTDETFKTRAIQHESGILGPLYGEVGDPLL  
IIFKNOASRPYNIYPHGITDVRPLYRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNM  
ERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNOIMSDKRNVI LFSVFDENRSWYL TENIQRF LNPAGVQLEDPEFQASNIMHS  
INGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYIILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVEYEDTLTLFPFSGETVFMSEMPGLWILGCH  
NSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD  
PWFAHRTMPKIQNVSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKEYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDM  
VFTPESGLQRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSPMPVHYDSQLDITLFGK  
KSSPLTESGGPLSLSEENNSKLLSGLMNSQESSWGNVSTESGRLFKGKRAHGPAALLTKDNALFKVSLKLTN  
KTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNI LESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTSSKNMEMVQ

QKKEGPIPPDAQNPDMSEFFKMLFLPESARWIQORTHGKNSLNSGQGPSKQQLVSLGPEKSVQGNFLSEKNKVVVGKG  
 EFTKDVGLKEMVFPSSRNLFNLNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGKTNFMKNLFLLS  
 RQNVESYDYGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTO  
 RSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPDCLTRSHSIPQANRS  
 PLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGS LG  
 TSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSQKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLQGTGEGAIKWNEANR  
 PGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSOEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQ  
 NKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPVVKRHRQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKK  
 TRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVQFKKVVVFQFTDGSFTQFLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNI  
 MVTFRNQASRPYSFYSSLI SYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKTYFWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVH  
 SGLIGPLLVCHTNLTNPAHGRQVTVQEFALFFTI FDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYI  
 MDTLPLGLVMAQDQIRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLI  
 GEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPGLMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPM  
 I IHGIKTQGARQKFSLSYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPPPIARYIRLHPHY  
 SIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAI SDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVD  
 FQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHP  
 QSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

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

661					ATG CAAATAGAGC TCTCCACCTG
721	CTTCTTTCTG	TGCCTTTTGC	GATTCTGCTT	TAGTGCCACC	AGAAGATACT ACCTGGGTGC
781	AGTGGAACTG	TCATGGGACT	ATATGCAAAG	TGATCTCGGT	GAGCTGCCTG TGGACGCAAG
841	ATTTCTCCT	AGAGTGCCAA	AATCTTTTCC	ATTCAACACC	TCAGTCGTGT ACAAAAAGAC
901	TCTGTTTGTA	GAATTCACGG	ATCACCTTTT	CAACATCGCT	AAGCCAAGGC CACCCTGGAT
961	GGGTCTGCTA	GGTCCTACCA	TCCAGGCTGA	GGTTTATGAT	ACAGTGGTCA TTACACTTAA
1021	GAACATGGCT	TCCCATCCTG	TCAGTCTTCA	TGCTGTTGGT	GTATCCTACT GGAAAGCTTC
1081	TGAGGGAGCT	GAATATGATG	ATCAGACCAG	TCAAAGGGAG	AAAGAAGATG ATAAAAGTCTT
1141	CCCTGGTGGA	AGCCATACAT	ATGTCTGGCA	GGTCTGAAA	GAGAATGGTC CAATGGCCCTC
1201	TGACCCACTG	TGCCTTACCT	ACTCATATCT	TTCTCATGTG	GACCTGGTAA AAGACTTGAA
1261	TTCAGGCCTC	ATTGGAGCCC	TACTAGTATG	TAGAGAAGGG	AGTCTGGCCA AGGAAAAGAC
1321	ACAGACCTTG	CACAAATTTA	TACTACTTTT	TGCTGTATTT	GATGAAGGGA AAAGTTGGCA
1381	CTCAGAAACA	AAGAACTCCT	TGATGCAGGA	TAGGGATGCT	GCATCTGCTC GGGCTGGCC
1441	TAAAATGCAC	ACAGTCAATG	GTTATGTAAA	CAGGTCTCTG	CCAGTCTGTA TTGGATGCCA
1501	CAGGAAATCA	GTCTATTGGC	ATGTGATTGG	AATGGGCACC	ACTCCTGAAG TGCATCAAT
1561	ATTCTCGAA	GGTCACACAT	TTCTTGTGAG	GAACCATCGC	CAGGCGTCTC TGGAAATCTC
1621	GCCAATAACT	TTCTTACTG	CTCAAACACT	CTTGATGGAC	CTTGGACAGT TTCTACTGTT
1681	TTGTCATATC	TCTTCCCACC	AACATGATGG	CATGGAAGCT	TATGTCAAAG TAGACAGCTG
1741	TCCAGAGGAA	CCCCAACTAC	GAATGAAAAA	TAATGAAGAA	GCGGAAGACT ATGATGATGA
1801	TCTTACTGAT	TCTGAAATGG	ATGTGGTCAG	GTTTGATGAT	GACAACTCTC CTTCCTTTAT
1861	CCAAATTCGC	TCAGTTGCCA	AGAAGCATCC	TAAAACCTGG	GTACATTACA TTGCTGCTGA
1921	AGAGGAGGAC	TGGGACTATG	CTCCCTTAGT	CCTCGCCCCC	GATGACAGAA GTTATAAAAG
1981	TCAATATTTG	AACAATGGCC	CTCAGCGGAT	TGGTAGGAAG	TACAAAAAAG TCCGATTTAT
2041	GGCATAACA	GATGAAACCT	TAAAGACTCG	TGAAGCTATT	CAGCATGAAT CAGGAATCTT
2101	GGGACCTTTA	CTTTATGGGG	AAGTTGGAGA	CACACTGTTG	ATTATATTTA AGAATCAAGC
2161	AAGCAGACCA	TATAACATCT	ACCCTCACGG	AATCACTGAT	GTCCGTCTTT TGATTTCAAG
2221	GAGATTACCA	AAAGGTGTAA	AACATTTGAA	GGATTTTCCA	ATTCTGCCAG GAGAAATATT
2281	CAAATATAAA	TGGACAGTGA	CTGTAGAAGA	TGGGCCAACT	AAATCAGATC CTCGGTGCCT
2341	GACCCGCTAT	TACTCTAGTT	TCGTTAATAT	GGAGAGAGAT	CTAGCTTCAG GACTCATTGG
2401	CCCTCTCTC	ATCTGTCTACA	AAGAATCTGT	AGATCAAAGA	GGAAACCAGA TAATGTCAGA
2461	CAAGAGGAAT	GTCATCTGT	TTTCTGTATT	TGATGAGAAC	CGAAGCTGGT ACCTCACAGA
2521	GAATATACAA	CGCTTCTCC	CCAAATCCAG	TGGAGTGCAG	CTTGAGATC CAGAGTTCCA
2581	AGCCTCCAAC	ATCATGCACA	GCATCAATGG	CTATGTTTTT	GATAGTTTTG AGTTGTCACT
2641	TTGTTTGCAT	GAGGTGGCAT	ACTGGTACAT	TCTAAGCATT	GGAGCACAGA CTGACTTCCT
2701	TTCTGTCTTC	TTCTCTGGAT	ATACCTTCAA	ACACAAAATG	GTCTATGAAG ACACACTCAC

2761 CCTATTCCCA TTCTCAGGAG AAACGTGCTT CATGTTCGATG GAAAACCCAG GTCTATGGAT  
 2821 TCTGGGGTGC CACAACCTCAG ACTTTTCGGAA CAGAGGCATG ACCGCTTAC TGAAGGTTTC  
 2881 TAGTTGTGAC AAGAACACTG GTGATTATTA CGAGGACAGT TATGAAGATA TTTTCAGCATA  
 2941 CTTGTCTGAGT AAAAACAATG CCATTGAACC AAGAAGCTTC TCCCAGAATT CAAGACACCC  
 3001 TAGCCTAGG CAAAAGCAAT TTAATGCCAC CACAATTCCA CAAAGTACA TAGAGAACCC  
 3061 TGACCCCTGG TTTGCACACA GAACACCTAT GCCTAAAATA CAAAATGTCT CCTCTAGTGA  
 3121 TTTGTTGATG CTCTTGCGAC AGAGTCCTAC TCCACATGGG CTATCCTTAT CTGATCTCCA  
 3181 AGAAGCCAAA TATGAGACTT TTTCTGATGA TCCATCACCT GGAGCAATAG ACAGTAATAA  
 3241 CAGCCTGTCT GAAATGACAC ACTTCAGGCC ACAGCTCCAT CACAGTGGGG ACATGGTATT  
 3301 TACCCCTGAG TCAGGCCTCC AATTAAGATT AAATGAGAAA CTGGGGACAA CTGCAGCAAC  
 3361 AGAGTTGAAG AAACCTGATT TCAAAGTTTC TAGTACATCA AATAATCTGA TTTCAACAAT  
 3421 TCCATCAGAC AATTTGGCAG CAGGTAAGTA TAATACAAGT TCCTTAGGAC CCCCAAGTAT  
 3481 GCCAGTTCAT TATGATAGTC AATTAGATAC CACTCTATTT GGCAAAAAGT CATCTCCCCT  
 3541 TACTGAGTCT GGTGGACCTC TGAGCTTGAG TGAAGAAAAT AATGATTCAA AGTTGTTAGA  
 3601 ATCAGGTTTA ATGAATAGCC AAGAAAGTTC ATGGGGAAAA AATGTATCGT CAACAGAGAG  
 3661 TGGTAGGTTA TTTAAAGGGA AAAGAGCTCA TGGACCTGCT TTGTTGACTA AAGATAATGC  
 3721 CTTATTCAAA GTTAGCATCT CTTTGTAAA GACAAAACAAA ACTTCCAATA ATTCAGCAAC  
 3781 TAATAGAAAG ACTCACATTG ATGGCCCATC ATTATTAATT GAGAATAGTC CATCAGTCTG  
 3841 GCAAAATATA TTAGAAAGTG AACTGAGTT TAAAAAGTG ACACCTTTGA TTCATGACAG  
 3901 AATGCTTATG GACAAAATG CTACAGCTTT GAGGCTAAAT CATATGTCAA ATAAAACTAC  
 3961 TTCATCAAAA AACATGGAAA TGGTCCAACA GAAAAAGAG GGCCCATTC CACCAGATGC  
 4021 ACAAAGTCCA GATATGTCGT TCTTTAAGAT GCTATTCTTG CCAGATCAG CAAGGTGGAT  
 4081 ACAAAGGACT CATGGAAAGA ACTCTGAA CTCTGGGCAA GGCCCAAGT CAAAGCAATT  
 4141 AGTATCCTTA GGACCAGAAA AACTCTGGA AGGTCAGAAT TTCTGTCTG AGAAAAACAA  
 4201 AGTGGTAGTA GGAAAGGGTG AATTTACAAA GGACGTAGGA CTCAAAGAGA TGGTTTTTCC  
 4261 AAGCAGCAGA AACCTATTTT TACTAACTT GGATAATTTA CATGAAAATA ATACACACAA  
 4321 TCAAGAAAAA AAAATTCAGG AAGAAATAGA AAAGAAGGAA ACATTAATCC AAGAGAATGT  
 4381 AGTTTTGCCT CAGATACATA CAGTGAAGTG CACTAAGAAT TTCATGAAGA ACCTTTTCTT  
 4441 ACTGAGCACT AGGCAAAATG TAGAAGGTTT ATATGACGGG GCATATGCTC CAGTACTTCA  
 4501 AGATTTTAGG TCATTAATG ATTCAACAAA TAGAACAAAG AAACACACAG CTCATTTCTC  
 4561 AAAAAAGGG GAGGAAGAAA ACTTGAAGG CTTGGGAAAT CAAACCAAGC AAATGTGAGA  
 4621 GAAATATGCA TGCACCACAA GGATATCTCC TAATACAAGC CAGCAGAATT TTGTACGCA  
 4681 ACGTAGTAAG AGAGCTTTGA AACAATTCAG ACTCCCCTA GAAGAAACAG AACTTGAAAA  
 4741 AAGGATAATT GTGGATGACA CCTCAACCCA GTGGTCCAAA AACATGAAAC ATTTGACCCC  
 4801 GAGCACCTC ACACAGATAG ACTACAATGA GAAGGAGAAA GGGGCCATTA CTCAGTCTCC  
 4861 CTTATCAGAT TGCCTTACGA GGAGTCATAG CATCCCTCAA GCAAATAGAT CTCCATTACC  
 4921 CATTGCAAAG GTATCATCAT TTCCATCTAT TAGACCTATA TATCTGACCA GGGTCTATT  
 4981 CCAAGACAAC TCTTCTCATC TTCCAGCAGC ATCTTATAGA AAGAAAGATT CTGGGGTCCA  
 5041 AGAAAGCAGT CATTTCTTAC AAGGAGCCAA AAAAAATAAC CTTTCTTTAG CCATTTCTAC  
 5101 CTTGGAGATG ACTGGTGATC AAAGAGAGTT TGGCTCCCTG GGACAAGT GCACAAATTC  
 5161 AGTCACATAC AAGAAAGTTG AGAACACTGT TCTCCCGAAA CCAGACTTGC CCAAAACATC  
 5221 TGGCAAAGTT GAATTGCTTC CAAAAGTTCA CATTTATCAG AAGGACCTAT TCCCTACGGA  
 5281 AACTAGCAAT GGGTCTCCTG GCCATCTGGA TCTCGTGGAA GGGAGCCTTC TTCAGGGAAC  
 5341 AGAGGGAGCG ATTAAGTGGA ATGAAGCAAA CAGACCTGGA AAAGTTCCCT TTCTGAGAGT  
 5401 AGCAACAGAA AGCTCTGCAA AGACTCCCTC CAAGCTATTG GATCCTCTTG CTTGGGATAA  
 5461 CCACTATGGT ACTCAGATAC CAAAAGAAGA GTGGAAATCC CAAGAGAAGT CACCAGAAAA  
 5521 AACAGCTTTT AAGAAAAGG ATACCATTTT GTCCCTGAAC GCTTGTGAAA GCAATCATGC  
 5581 AATAGCAGCA ATAAATGAGG GACAAAATAA GCCCGAAATA GAAGTCACCT GGGCAAAGCA  
 5641 AGGTAGGACT GAAAGGCTGT GCTCTCAAAA CCCACCAGTC TTGAAACGCC ATCAACGGGA  
 5701 AATAACTCGT ACTACTCTTC AGTCAGATCA AGAGGAAATT GACTATGATG ATACCATATC  
 5761 AGTTGAAATG AAGAAGGAAG ATTTTGGACAT TTATGATGAG GATGAAAATC AGAGCCCCCG  
 5821 CAGCTTTCAA AAGAAAACAC GACACTATTT TATTGCTGCA GTGGAGAGGC TCTGGGATTA  
 5881 TGGGATGAGT AGCTCCCCAC ATGTTCTAAG AAACAGGGCT CAGAGTGGCA GTGTCCCTCA  
 5941 GTTCAAGAAA GTTGTTTTCC AGGAATTTAC TGATGGCTCC TTTACTCAGC CCTTATACCG  
 6001 TGGAGAACTA AATGAACATT TGGGACTCCT GGGGCCATAT ATAAGAGCAG AAGTTGAAGA  
 6061 TAATATCATG GTAACCTTCA GAAATCAGG CTCTCGTCCC TATTCCTTCT ATTCTAGCCT  
 6121 TATTTCTTAT GAGGAAGATC AGAGCAAGG AGCAGAACCT AGAAAAACT TTGTCAAGCC  
 6181 TAATGAAACC AAAACTTACT TTTGGAAAGT GCAACATCAT ATGGACCCCA CTAAGATGA  
 6241 GTTTGACTGC AAAGCCTGGG CTTATTTCTC TGATGTTGAC CTGGAAAAAG ATGTGACTC  
 6301 AGGCCTGATT GGACCCCTTC TGGTCTGCCA CACTAACACA CTGAACCTTG CTCATGGGAG  
 6361 ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT TTTACCATC TTTGATGAGA CCAAAAGCTG  
 6421 GTAATTTACT GAAAATATGG AAAGAACTG CAGGGCTCCC TGCAATATCC AGATGGAAGA  
 6481 TCCCCTTTT AAAGAGAATT ATCGCTTCCA TGCAATCAAT GGCTACATAA TGGATACACT  
 6541 ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG GATTTCGATG TATCTGCTCA GCATGGGCAG

```

6601 CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTTCAG TGGACATGTG TTCACTGTAC GAAAAAAGA
6661 GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA TCCAGGTGTT TTTGAGACAG TGGAAATGTT
6721 ACCATCCAAA GCTGGAATTT GCGGGGTGGA ATGCCTTATT GCGGAGCATC TACATGCTGG
6781 GATGAGCACA CTTTTTCTGG TGTACAGCAA TAAGTGTGAG ACTCCCCTGG GAATGGCTTC
6841 TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA TATGGACAGT GGGCCCCAAA
6901 GCTGGCCAGA CTTCATTTAT CCGGATCAAT CAATGCCTGG AGCACCAAGG AGCCCTTTTC
6961 TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACCAAT GATTATTCAC GGCATCAAGA CCCAGGGTGC
7021 CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC ATCATGTATA GTCTTGATGG
7081 GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC TTAATGGTCT TCTTTGGCAA
7141 TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTTAACCCT CCAATTATTG CTCGATACAT
7201 CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTTC CAGCACTCTT CGCATGGAGT TGATGGGCTG
7261 TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG AATGGAGAGT AAAGCAATAT CAGATGCACA
7321 GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC TGGTCTCCTT CAAAAGCTCG
7381 ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG GTGAATAATC CAAAAGAGTG
7441 GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA GTAACACTC AGGGAGTAAA
7501 ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC TCCAGCAGTC AAGATGGCCA
7561 TCAGTGGACT CTCTTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTTCAGGGAA ATCAAGACTC
7621 CTTACACACT GTGGTGAACST CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGCTACC TTCGAATTCA
7681 CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT GCGAGGCACA
7741 GGACCTCTAC

```

\*Подчеркнутые нуклеиновые кислоты кодируют сигнальный пептид.

**[0166]** Полипептиды FVIII включают полноразмерный FVIII, полноразмерный FVIII минус Met на N-конце, зрелый FVIII (минус сигнальная последовательность), зрелый FVIII с дополнительным Met на N-конце и/или FVIII с полной или частичной делецией В-домена. В определенных вариантах реализации изобретения варианты FVIII включают делеции В-домена, которые могут быть частичными или полными делециями.

**[0167]** Человеческий ген FVIII был выделен и экспрессирован в клетках млекопитающих (Toole, J. J., *et al.*, *Nature* 312:342-347 (1984); Gitschier, J., *et al.*, *Nature* 312:326-330 (1984); Wood, W. I., *et al.*, *Nature* 312:330-337 (1984); Vehar, G. A., *et al.*, *Nature* 312:337-342 (1984); WO 87/04187; WO 88/08035; WO 88/03558; и патент США № 4757006). Аминокислотная последовательность FVIII была определена по кДНК, как показано в патенте США № 4965199. Кроме того, FVIII с частичной или полной делецией В-домена представлена в патентах США №№ 4994371 и 4868112. В некоторых вариантах реализации изобретения В-домен человеческого FVIII замещен на В-домен человеческого фактора V, как описано в патенте США № 5004803. Последовательность кДНК, кодирующая человеческий фактор VIII, и его аминокислотная последовательность приведены в SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно, в патенте США № 7211559.

**[0168]** Свинная последовательность FVIII опубликована в Toole, J. J., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5939-5942 (1986). Дополнительно, полная последовательность свиной кДНК, полученной в результате ПЦР-амплификации последовательности FVIII из библиотеки кДНК свиной селезенки была описана у Healey, J. F., *et al.*, *Blood* 88:4209-4214 (1996). Гибридный человеческий/свиной FVIII, имеющий замещения во всех доменах, всех субъединицах, и специфические аминокислотные последовательности были

раскрыты в патенте США № 5364771, на имя Lollar и Runge, и в WO 93/20093. Недавно, нуклеотидные и соответствующие аминокислотные последовательности доменов A1 и A2 свиного FVIII и химерного FVIII со свинными доменами A1 и/или A2, замещающими соответствующие человеческие домены, были описаны в WO 94/11503. Патент США № 5859204, на имя Lollar, J. S., также раскрывает свиную кДНК и расшифрованные аминокислотные последовательности. Патент США № 6458563 раскрывает свинной FVIII с делецией В-домена.

**[0169]** Патент США № 5859204, на имя Lollar, J. S., описывает функциональные мутанты FVIII, имеющие пониженную антигенность и пониженную иммунореактивность. Патент США № 6376463, на имя Lollar, J. S., также описывает мутанты FVIII, имеющие пониженную иммунореактивность. Публикация заявки США № 2005/0100990, на имя Saenko *et al.*, описывает функциональные мутации в домене A2 FVIII.

**[0170]** В одном варианте реализации изобретения белок FVIII (или относящаяся к FVIII часть химерного белка) может быть по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичным аминокислотной последовательности FVIII, представленной аминокислотами 1-1438 SEQ ID NO: 18 или аминокислотами 1-2332 SEQ ID NO: 16 (без сигнальной последовательности), причем FVIII обладает свертывающей активностью, например, активировывает фактор IX в качестве кофактора для превращения фактора X в активированный фактор X. FVIII (или относящаяся к FVIII часть химерного белка) может быть идентичным аминокислотной последовательности FVIII, представленной аминокислотами 1-1438 SEQ ID NO: 18 или аминокислотами 1-2332 SEQ ID NO: 16 (без сигнальной последовательности). Белок FVIII может дополнительно содержать сигнальную последовательность.

**[0171]** "В-домен" FVIII, в используемом в данном документе значении, является таким же, как и В-домен, известный в данной области техники, определенный по идентичности внутренних аминокислотных последовательностей и сайтов протеолитического расщепления, например, остатков Ser741-Arg1648 полноразмерного человеческого FVIII. Другие домены человеческого FVIII определяются по следующим аминокислотным остаткам: A1 - остатки Ala1-Arg372; A2 - остатки Ser373-Arg740; A3 - остатки Ser1690-Asn2019; C1 - остатки Lys2020-Asn2172; C2 - остатки Ser2173-Tyr2332. Последовательность A3-C1-C2 включает остатки Ser1690-Tyr2332. Оставшаяся часть последовательности, остатки Glu1649-Arg1689, обычно называется кислотной областью a3. Положения границ всех доменов, включая В-домены, для свинной, мышьиной и собачьей FVIII также известны в данной области техники. В одном варианте реализации изобретения В-домен FVIII делетирован ("фактор VIII с делецией В-домена" или "BDD

FVIII"). Примером BDD FVIII является REFACTO® (рекомбинантный BDD FVIII), имеющий такую же последовательность, как и относящаяся к фактору VIII часть последовательности в Таблице 5. (тяжелая цепь BDD FVIII подчеркнута двойной линией; В-домен выделен наклонным шрифтом; и легкая цепь BDD FVIII представлена обычным шрифтом).

Таблица 5. BDD FVIII (SEQ ID NO: 18)

ATTRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFRVPKSFPEFNTSVVYKKTLEFVEFTDHLFENIAKPRPPWMLLGPTIO  
AEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSOREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCL  
TYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKM  
HTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLMLDGLQFL  
FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPFSFIQIRSVAKKHPKTWVHY  
IAAEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLL  
IIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNM  
ERDLASGLIGPLLICYKESVDORGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHS  
INGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCH  
NSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDY  
DDTISVEMKKEDFDIYDEENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPQFKKVVFQEFTDG  
SFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWK  
VQHNMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTFIDETKSWYFTENM  
ERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPLGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNIHSIHFSGHVFTVRKKEEYK  
MALYNLYPGVFFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYQWAPK  
LARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVF  
FGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFFATW  
SPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKV  
KVFQGNQDSFTPVNSLDPLLTRYLRIHPQSVWHQIALRMEVLGCEAQDLY

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

661	A TGCAAATAGA GCTCTCCACC TGCTTCTTTT						
721	TGTGCCTTTT	CGGATTCTGC	TTTAGTGCCA	CCAGAAGATA	CTACCTGGGT	GCAGTGGAAC	
781	TGTCATGGGA	CTATATGCAA	AGTGATCTCG	GTGAGCTGCC	TGTGGACGCA	AGATTTCCTC	
841	CTAGAGTGCC	AAAATCTTTT	CCATTCAACA	CCTCAGTCGT	GTACAAAAAG	ACTCTGTTTG	
901	TAGAATTCAC	GGATCACSTT	TCAACATCG	CTAAGCCAAG	GCCACCCTGG	ATGGGTCTGC	
961	TAGGTCCTAC	CATCCAGGCT	GAGGTTTATG	ATACAGTGGT	CATTACACTT	AAGAACATGG	
1021	STTCCCATCC	TGTCAGTCTT	CATGCTGTTG	GTGTATCCTA	CTGGAAAAGCT	TCTGAGGGAG	
1081	CTGAATATGA	TGATCAGACC	AGTCAAAGGG	AGAAAAGAAGA	TGATAAAAGTC	TTCCCTGGTG	
1141	GAAGCCATAC	ATATGTCTGG	CAGGTCCTGA	AAGAGAATGG	TCCAATGGCC	TCTGACCCAC	
1201	TGTGCSTTAC	CTACTCATAT	CTTTCTCATG	TGGACCTGGT	AAAAGACTTG	AATTCAGGCC	
1261	TCATTGGAGC	CCTACTAGTA	TGTAGAGAAG	GGAGTCTGGC	CAAGGAAAAG	ACACAGACCT	
1321	TGCACAAATT	TATACTACTT	TTTGCTGTAT	TTGATGAAGG	GAAAAGTTGG	CACTCAGAAA	
1381	CAAAGAACTC	CTTGATGCAG	GATAGGGATG	CTGCATCTGC	TGGGGCCTGC	CCTAAAATGC	
1441	ACACAGTCAA	TGGTTATGTA	AACAGGTCTC	TGCCAGGTCT	GATTGGATGC	CACAGGAAAT	
1501	CAGTCTATTG	GCATGTGATT	GGAATGGGCA	CCACTCCTGA	AGTGCAC	TCAATATCTCG	
1561	AAGGTCACAC	ATTTCTTG	AGGAACCATC	GCCAGGCGTC	CTTGAAAATC	TCGCCAATAA	
1621	CTTTCTTAC	TGCTCAAACA	CTCTTGATGG	ACCTTGAC	ACATTTCTACTG	TTTTGTGCATA	
1681	TCTCTTCCCA	CCAACATGAT	GGCATGGAAG	CTTATGTCAA	AGTAGACAGC	TGTCCAGAGG	
1741	AACCCCAACT	ACGAATGAAA	AATAATGAAG	AAGCGGAAGA	CTATGATGAT	GATCTTACTG	
1801	ATTCTGAAAT	GGATGTGGTC	AGGTTTGATG	ATGACAAC	TCTTCTCTT	ATCCAAATTC	
1861	GCTCAGTTGC	CAAGAAGCAT	CCTAAAAC	TGTTACATTA	CATTGCTGCT	GAAGAGGAGG	

1921 ACTGGGACTA TGCTCCCTTA GTCCTCGCCC CCGATGACAG AAGTTATAAAA AGTCAATATF  
1981 TGAACAATGG CCCTCAGCGG ATTGGTAGGA AGTACAAAAA AGTCCGATTT ATGGCATAACA  
2041 CAGATGAAAC CTTTAAGACT CGTGAAGCTA TTCAGCATGA ATCAGGAATC TTGGGACCTT  
2101 TACTTTATGG GGAAGTTGGA GACACACTGT TGATTATATT TAAGAATCAA GCAAGCAGAC  
2161 CATATAACAT CTACCCTCAC GGAATCACTG ATGTCCGTCC TTTGTATTCA AGGAGATTAC  
2221 CAAAAGGTGT AAAACATTTG AAGGATTTTC CAATTCTGCC AGGAGAAATA TTCAAATATA  
2281 AATGGACAGT GACTGTAGAA GATGGGCCAA CTAAATCAGA TCCTCGGTGC CTGACCCGCT  
2341 ATTACTCTAG TTTTCGTTAAT ATGGAGAGAG ATCTAGCTTC AGGACTCATT GGCCCTCTCC  
2401 TCATCTGCTA CAAAGAATCT GTAGATCAAA GAGGAAAACA GATAATGTCA GACAAGAGGA  
2461 ATGTCATCCT GTTTTCTGTA TTTGATGAGA ACCGAAGCTG GTACCTCACA GAGAATATAC  
2521 AACGCTTTCT CCCCATCCA GCTGGAGTGC AGCTTGAGGA TCCAGAGTTC CAAGCCTCCA  
2581 ACATCATGCA CAGCATCAAT GGCTATGTTT TTGATAGTTT GCAGTTGTCA GTTTGTTTGC  
2641 ATGAGGTGGC ATACTGGTAC ATTCTAAGCA TTGGAGCACA GACTGACTTC CTTTCTGTCT  
2701 TCTTCTCTGG ATATACCTTC AAACACAAAA TGGTCTATGA AGACACACTC ACCCTATTCC  
2761 CATTCTCAGG AGAACTGTC TTCATGTCTG TGGAAAACCC AGGTCTATGG ATTCTGGGGT  
2821 GCCACAACCT AGACTTTCGG AACAGAGGCA TGACCGCCTT ACTGAAGGTT TCTAGTTGTG  
2881 ACAAGAACAC TGGTGATTAT TACGAGGACA GTTATGAAGA TATTTTCAGCA TACTTGCTGA  
2941 GTAAAAACAA TGCCATTGAA CCAAGAAGCT TCTCTCAAAA CCCACCAGTC TTGAAACGCC  
3001 ATCAACGGGA AATAACTCGT ACTACTCTTC AGTCAGATCA AGAGGAAATF GACTATGATG  
3061 ATACCATATC AGTTGAAATG AAGAAGGAAG ATTTTGACAT TTATGATGAG GATGAAAATC  
3121 AGAGCCCCCG CAGCTTTCOA AAGAAAACAC GACACTATTT TATTGCTGCA GTGGAGAGGC  
3181 TCTGGGATTA TGGGATGAGT AGCTCCCCAC ATGTTCTAAG AAACAGGGCT CAGATGGCA  
3241 GTGTCCCTCA GTTCAAGAAA GTTGTTTTCC AGGAATTTAC TGATGGCTCC TTTACTCAGC  
3301 CCTTATACCG TGGAGAATA AATGAACATT TGGGACTCCT GGGGCCATAT ATAAGAGCAG  
3361 AAGTTGAAGA TAATATCATG GTAACCTTCA GAAATCAGGC CTCTCGTCCC TATTCCTTCT  
3421 ATTCTAGCCT TATTTCTTAT GAGGAAGATC AGAGGCAAGG AGCAGAACCT AGAAAAAAT  
3481 TTGTCAAGCC TAATGAAACC AAAACTTACT TTTGGAAAGT GCAACATCAT ATGGCACCCA  
3541 CTAAAGATGA GTTTGACTGC AAAGCCTGGG CTTATTTCTC TGATGTTGAC CTGGAAAAAG  
3601 ATGTGCACTC AGGCCTGATT GGACCCCTTC TGGTCTGCCA CACTAACACA CTGAACCCTG  
3661 CTCATGGGAG ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT TTTACCATC TTTGATGAGA  
3721 CCAAAGCTG GTACTTCACT GAAAATATGG AAAGAACTG CAGGGCTCCC TGCAATATCC  
3781 AGATGGAAGA TCCCACTTTT AAAGAGAATT ATCGCTTCCA TGCAATCAAT GGCTACATAA  
3841 TGGATACACT ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG GATTCGATGG TATCTGCTCA  
3901 GCATGGGCAG CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTTCA TGGACATGTG TTCACTGTAC  
3961 GAAAAAAGA GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA TCCAGGTGTT TTTGAGACAG  
4021 TGGAAATGTT ACCATCCAAA GCTGGAATTT GGCGGGTGGG ATGCCTTATF GGCGAGCATC  
4081 TACATGCTGG GATGAGCACA CTTTTTCTGG TGTACAGCAA TAAGTGTGAG ACTCCCCTGG  
4141 GAATGGCTTC TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA TATGGACAGT  
4201 GGGCCCCAAA GCTGGCCAGA STTCATTATT CCGGATCAAT CAATGCCTGG AGCACCAAG  
4261 AGCCCTTTTC TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACCAT GATTATTCAC GGCATCAAGA  
4321 CCCAGGGTGC CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC ATCATGTATA  
4381 GTCTTGATGG GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC TTAATGGTCT  
4441 TCTTTGGCAA TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTTAAACCCT CCAATTATTG  
4501 CTCGATACAT CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCG CAGCACTCTT CGCATGGAGT  
4561 TGATGGGCTG TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG AATGGAGAGT AAAGCAATAT  
4621 CAGATGCACA GATTAAGTCT TCATCCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC TGGTCTCCTT  
4681 CAAAAGCTCG ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG GTGAATAATC  
4741 CAAAAGAGTG GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA GТААСТACTC  
4801 AGGGAGTAAA ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC TCCAGCAGTC  
4861 AAGATGGCCA TCAGTGGACT CTCTTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTAGGGGAA  
4921 ATCAAGACTC STTCACACCT GTGGTGAACT CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGCTACC  
4981 TTCGAATTCA CCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT  
5041 GCGAGGCACA GGACCTCTAC

\*Подчеркнутые нуклеиновые кислоты кодируют сигнальный пептид.

[0172] "FVIII с делецией В-домена" может иметь полные или частичные делеции, раскрытые в патентах США №№ 6316226, 6346513, 7041635, 5789203, 6060447, 5595886, 6228620, 5972885, 6048720, 5543502, 5610278, 5171844, 5112950, 4868112 и 6458563. В некоторых вариантах реализации изобретения последовательность FVIII с делецией В-

домена по настоящему изобретению содержит любую из делеций, раскрытых от колонки 4, строка 4, до колонки 5, строка 28, и в примерах 1-5 патента США № 6316226 (также в US 6346513). В другом варианте реализации изобретения фактор VIII с делецией В-домена представляет собой фактор VIII с делецией В-домена S743/Q1638 (SQ BDD FVIII) (например, фактор VIII, имеющий делецию от аминокислоты 744 до аминокислоты 1637, например, фактор VIII, содержащий аминокислоты 1-743 и аминокислоты 1638-2332 SEQ ID NO: 16, *m.e.* SEQ ID NO: 18). В некоторых вариантах реализации изобретения FVIII с делецией В-домена по настоящему изобретению имеет делецию, раскрытую в колонке 2, строки 26-51, и примерах 5-8 патента США № 5789203 (также US 6060447, US 5595886 и US 6228620). В некоторых вариантах реализации изобретения фактор VIII с делецией В-домена имеет делецию, описанную от колонки 1, строка 25, до колонки 2, строка 40 патента США № 5972885; в колонке 6, строки 1-22, и примере 1 патента США № 6048720; в колонке 2, строки 17-46, патента США № 5543502; от колонки 4, строка 22, до колонки 5, строка 36, патента США № 5171844; в колонке 2, строки 55-68, на фигуре 2 и в примере 1 патента США № 5112950; от колонки 2, строка 2, до колонки 19, строка 21, и в таблице 2 патента США № 4868112; от колонки 2, строка 1, до колонки 3, строка 19, от колонки 3, строка 40, до колонки 4, строка 67, от колонки 7, строка 43, до колонки 8, строка 26, и от колонки 11, строка 5, до колонки 13, строка 39, патента США № 7041635; или в колонке 4, строки 25-53, патента США № 6458563.

**[0173]** В некоторых вариантах реализации изобретения FVIII с делецией В-домена имеет делецию большей части В-домена, но при этом содержит аминоконцевые последовательности В-домена, являющиеся существенными для *in vivo* протеолитического процессинга первичного продукта трансляции в две полипептидные цепи, как раскрыто в WO 91/09122. В некоторых вариантах реализации изобретения FVIII с делецией В-домена сконструирован с делецией аминокислот 747-1638, *m.e.* по существу, с полной делецией В-домена. Hoesben R.C., *et al. J. Biol. Chem.* 265 (13): 7318-7323 (1990). Фактор VIII с делецией В-домена может также содержать делецию аминокислот 771-1666 или аминокислот 868-1562 FVIII. Meulien P., *et al. Protein Eng.* 2(4): 301-6 (1988). Дополнительные делеции В-домена, являющиеся частью изобретения, включают: делеция аминокислот 982-1562 или 760-1639 (Toole *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1986) 83, 5939-5942)), 797-1562 (Eaton, *et al. Biochemistry* (1986) 25:8343-8347)), 741-1646 (Kaufman (опубликованная заявка РСТ № WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver, *et al., DNA* (1987) 6:553-564)), 741-1648 (Pasek (заявка РСТ № 88/00831)), или 816-1598 или 741-1648 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988) No 82:16-25, EP 295597)). В других вариантах реализации изобретения BDD FVIII включает полипептид FVIII, содержащий фрагменты В-домена,

сохраняющие один или более N-связанных сайтов гликозилирования, например, остатки 757, 784, 828, 900, 963 или, необязательно, 943, которые соответствуют аминокислотной последовательности полноразмерной последовательности FVIII. Примеры фрагментов В-домена включают 226 аминокислот или 163 аминокислоты В-домена, как раскрыто в Miao, H.Z., *et al.*, *Blood* 103(a): 3412-3419 (2004), Kasuda, A., *et al.*, *J. Thromb. Haemost.* 6: 1352-1359 (2008) и Pipe, S.W., *et al.*, *J. Thromb. Haemost.* 9: 2235-2242 (2011) (*m.e.* сохраняются первые 226 аминокислот или 163 аминокислоты В-домена). В некоторых вариантах реализации изобретения FVIII с частичным В-доменом представляет собой FVIII198. FVIII198 представляет собой одноцепочечную молекулу FVIII<sub>Fc</sub>-226N<sub>6</sub>, содержащую частичный В-домен. 226 обозначает N-концевую аминокислоту 226 В-домена FVIII, и N<sub>6</sub> обозначает шесть сайтов N-гликозилирования в В-доме. В еще одних вариантах реализации изобретения BDD FVIII дополнительно содержит точковую мутацию в положении остатка 309 (от Phe до Ser) для улучшения экспрессии BDD-белка FVIII. См. Miao, H.Z., *et al.*, *Blood* 103(a): 3412-3419 (2004). В еще одних вариантах реализации изобретения BDD FVIII включает полипептид FVIII, содержащий часть В-домена, но не содержащий одного или более фуриновых сайтов расщепления (например, Arg1313 и Arg 1648). См. Pipe, S.W., *et al.*, *J. Thromb. Haemost.* 9: 2235-2242 (2011). Каждая из вышеупомянутых делеций может быть выполнена в любой последовательности FVIII.

**[0174]** Белок FVIII, пригодный для использования по настоящему изобретению, может включать FVIII, имеющий одну или более дополнительных гетерологичных последовательностей или химических или физических модификаций в нем, которые не влияют на коагулирующую активность FVIII. Такие гетерологичные последовательности или химические или физические модификации могут быть слиты с С-концом или N-концом белка FVIII или вставлены между одной или более парами аминокислотных остатков в белке FVIII. Такие вставки в белке FVIII не влияют на коагулирующую активность FVIII или функцию FVIII. В одном варианте реализации изобретения вставки улучшают фармакокинетические свойства белка FVIII (например, период полувыведения). В другом варианте реализации изобретения вставки могут быть сделаны в более чем двух, трех, четырех, пяти или шести сайтах.

**[0175]** В одном варианте реализации изобретения FVIII расщепляется сразу за аргинином в положении аминокислоты 1648 (в полноразмерном факторе VIII или SEQ ID NO: 16), аминокислоты 754 (в факторе VIII с делецией В-домена S743/Q1638 или SEQ ID NO: 16), или соответствующим аргининовым остатком (в других вариантах), с образованием в результате тяжелой цепи и легкой цепи. В другом варианте реализации

изобретения FVIII содержит тяжелую цепь и легкую цепь, которые связаны или ассоциированы с помощью медируемой ионом металла нековалентной связи.

**[0176]** В других вариантах реализации изобретения FVIII представляет собой одноцепочечный FVIII, который не был расщеплен сразу за аргинином в положении аминокислоты 1648 (в полноразмерном FVIII или SEQ ID NO: 16), аминокислоты 754 (в FVIII с делецией В-домена S743/Q1638 или SEQ ID NO: 18), или соответствующим аргининовым остатком (в других вариантах). Одноцепочечный FVIII может содержать одно или более аминокислотных замещений. В одном варианте реализации изобретения аминокислотное замещение находится в остатке, соответствующем остатку 1648, остатку 1645, или обоим, полноразмерного зрелого полипептида фактора VIII (SEQ ID NO: 16) или остатку 754, остатку 751, или обоим, SQ BDD фактора VIII (SEQ ID NO: 18). Аминокислотное замещение может быть любыми аминокислотами, отличными от аргинина, например, изолейцином, лейцином, лизином, метионином, фенилаланином, треонином, триптофаном, валином, аланином, аспарагином, аспарагиновой кислотой, цистеином, глутаминовой кислотой, глутамином, глицином, пролином, селеноцистеином, серином, тирозином, гистидином, орнитинном, пирролизинном или таурином.

**[0177]** FVIII дополнительно может быть расщеплен тромбином и затем активирован как FVIIIa, служащий кофактором для активированного фактора IX (FIXa). Активированный FIX вместе с активированным FVIII образует комплекс Xase и превращает фактор X в активированный фактор X (FXa). Для активации, FVIII расщепляется тромбином после трех аргининовых остатков, в положениях аминокислот 372, 740 и 1689 (соответствующих аминокислотам 372, 740 и 795 в последовательности FVIII с делецией В-домена), образуя в результате расщепления FVIIIa, имеющий цепи 50 кДа A1, 43 кДа A2 и 73 кДа A3-C1-C2. В одном варианте реализации изобретения белок FVIII, пригодный для использования в настоящем изобретении, представляет собой неактивный FVIII. В другом варианте реализации изобретения белок FVIII представляет собой активированный FVIII.

**[0178]** Белок, имеющий полипептид FVIII, связанный с или ассоциированный с белком VWF, может содержать последовательность, по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную SEQ ID NO: 16 или 18, причем последовательность обладает свертывающей активностью FVIII, например, активирует фактор IX в качестве кофактора для превращения фактора X в активированный фактор X (FXa).

**[0179]** В некоторых вариантах реализации изобретения белок FVIII дополнительно содержит один или более гетерологичных фрагментов, слитых с С-концом или N-концом

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

**[0180]** Другие типичные примеры вариантов FVIII также раскрыты в публикации США № US2013/0017997, опубликованной 17 января 2013 г., международной публикации № WO 2013/122617, опубликованной 22 августа 2013 г., или международной публикации № WO 2014/011819, опубликованной 16 января 2014 г., или международной публикации № WO2013123457 A1, или международной заявке № PCT/US2013/049989.

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

**[0181]** Изобретение также предусматривает полинуклеотид, кодирующий химерную молекулу, описанную в данном документе. В тех случаях, когда белок VWF соединен с гетерологичным фрагментом с помощью линкера VWF и с белком FVIII и последовательностью XTEN в химерном белке в виде одной полипептидной цепи, изобретение относится к одному полинуклеотиду, кодирующему одну полипептидную цепь. В тех случаях, когда химерный белок содержит первую и вторую полипептидные цепи, первая полипептидная цепь, содержащая белок VWF, последовательность XTEN и первый гетерологичный фрагмент (например, первую Fc-область), присоединенный с

помощью линкера VWF, и вторая полипептидная цепь, содержащая белок FVIII и второй гетерологичный фрагмент (например, вторую Fc-область), полинуклеотид может содержать первую нуклеотидную область и вторую нуклеотидную область. В одном варианте реализации изобретения первая нуклеотидная область и вторая нуклеотидная область находятся в одном и том же полинуклеотиде. В другом варианте реализации изобретения первая нуклеотидная область и вторая нуклеотидная область находятся в двух разных полинуклеотидах (например, разных векторах). В определенных вариантах реализации изобретения настоящее изобретение касается набора полинуклеотидов, содержащих первую нуклеотидную цепь и вторую нуклеотидную цепь, причем первая нуклеотидная цепь кодирует белок VWF, последовательность XTEN, линкер VWF и гетерологичный фрагмент химерного белка, и вторая нуклеотидная цепь кодирует белок FVIII и второй гетерологичный фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения настоящее изобретение касается набора полинуклеотидов, содержащих первую нуклеотидную цепь и вторую нуклеотидную цепь, причем первая нуклеотидная цепь кодирует белок VWF и гетерологичный фрагмент химерного белка, и вторая нуклеотидная цепь кодирует белок FVIII, соединенный со вторым гетерологичным фрагментом с помощью линкера FVIII, причем по меньшей мере одна последовательность XTEN слита с химерным белком. В других вариантах реализации изобретения настоящее изобретение касается набора полинуклеотидов, содержащих первую нуклеотидную цепь и вторую нуклеотидную цепь, причем первая нуклеотидная цепь кодирует белок VWF, линкер VWF и гетерологичный фрагмент химерного белка, и вторая нуклеотидная цепь кодирует белок FVIII, линкер FVIII и второй гетерологичный фрагмент, причем по меньшей мере одна последовательность XTEN слита с химерным белком.

**[0182]** В других вариантах реализации изобретения набор полинуклеотидов дополнительно содержит дополнительную нуклеотидную цепь (например, вторую нуклеотидную цепь, когда химерный полипептид кодируется одной полинуклеотидной цепью, или третью нуклеотидную цепь, когда химерный белок кодируется двумя полинуклеотидными цепями), которые кодируют протеинконвертазу. Протеинконвертаза может быть выбрана из пропротеинконвертазы субтилизин/кексин типа 5 (PCSK5 или PC5), пропротеинконвертазы субтилизин/кексин типа 7 (PCSK7 или PC5), Kex 2 дрожжей, пропротеинконвертазы субтилизин/кексин типа 3 (PACE или PCSK3), или комбинаций двух или больше из них. В некоторых вариантах реализации изобретения протеинконвертаза представляет собой PACE, PC5 или PC7. В конкретном варианте реализации изобретения протеинконвертаза представляет собой PC5 или PC7. См. международную заявку № PCT/US2011/043568, которая включена в данный документ в

качестве ссылки. В другом варианте реализации изобретения протеинконвертаза представляет собой PACE/фурин.

**[0183]** В определенных вариантах реализации изобретения изобретение включает набор полинуклеотидов, содержащий первую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок VWF, содержащий домен D' и домен D3 VWF, слитый с первым гетерологичным фрагментом с помощью линкера VWF, вторую нуклеотидную последовательность, кодирующую белок FVIII и второй гетерологичный фрагмент, и третью нуклеотидную последовательность, кодирующую домен D1 и домен D2 VWF, где последовательность XTEN присутствует в первой цепи или во второй цепи. В этом варианте реализации изобретения домен D1 и домен D2 экспрессируются отдельно (не связаны с доменом D'D3 белка VWF) для обеспечения надлежащего образования дисульфидной связи и укладки доменов D'D3. Экспрессия домена D1D2 может происходить в цис- или транс-конфигурации.

**[0184]** В используемом в данном документе значении экспрессионный вектор относится к любому конструкту нуклеиновой кислоты, который содержит элементы, необходимые для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей последовательности или, в случае вирусного РНК-вектора, необходимые элементы для репликации и трансляции, при введении в пригодную клетку-хозяина. Экспрессионные векторы могут включать плазмиды, фагмиды, вирусы и их производные.

**[0185]** Экспрессионные векторы по изобретению будут включать полинуклеотиды, кодирующие химерную молекулу

**[0186]** В одном варианте реализации изобретения кодирующая последовательность химерной молекулы функционально связана с контрольной последовательностью экспрессии. В используемом в данном документе значении, две последовательности нуклеиновой кислоты функционально связаны, когда они ковалентно связаны таким образом, чтобы позволить каждой составляющей последовательности нуклеиновой кислоты сохранять свою функциональность. Говорят, что кодирующая последовательность и контрольная последовательность генной экспрессии функционально связаны, когда они ковалентно связаны таким образом, чтобы поместить экспрессию или транскрипцию и/или трансляцию кодирующей последовательности под влияние или контроль контрольной последовательности генной экспрессии. Говорят, что две ДНК-последовательности функционально связаны, если индукция промотора в 5'-последовательности генной экспрессии приводит к транскрипции кодирующей последовательности, и если природа связи между двумя последовательностями ДНК (1) не приводит к введению мутации со сдвигом рамки, (2) не влияет на способность

промоторной области направлять транскрипцию кодирующей последовательности, или (3) не влияет на способность соответствующего РНК-транскрипта транслироваться в белок. Таким образом, последовательность генной экспрессии будет функционально связана с кодирующей последовательностью нуклеиновой кислоты, если последовательность генной экспрессии будет способна вызывать транскрипцию этой кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты таким образом, чтобы полученный транскрипт транслировался в желательный белок или полипептид.

**[0187]** Контрольная последовательность генной экспрессии, в используемом в данном документе значении, представляет собой любую регуляторную нуклеотидную последовательность, такую как промоторная последовательность или комбинация промотор-энхансер, которая способствует эффективной транскрипции и трансляции кодирующей нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана. Контрольная последовательность генной экспрессии может, например, быть промотором млекопитающего или вирусным промотором, таким как конститутивный или индуцируемый промотор. Конститутивные промоторы млекопитающих включают, без ограничений, промоторы следующих генов: гипоксантинфосфорибозилтрансфераза (HPRT), аденозиндеаминаза, пируваткиназа, промотор бета-актина и другие конститутивные промоторы. Типичные примеры вирусных промоторов, которые конститутивно функционируют в эукариотических клетках, включают, например, промоторы цитомегаловируса (CMV), обезьяньего вируса (например, SV40), папилломавируса, аденовируса, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса саркомы Рауса, цитомегаловируса, длинные концевые повторы (LTR) вируса лейкоза Молони и других ретровирусов, и промотор тимидинкиназы вируса простого герпеса. Другие конститутивные промоторы известны рядовым специалистам в данной области техники. Промоторы, пригодные для использования в качестве последовательностей генной экспрессии по изобретению, также включают индуцируемые промоторы. Индуцируемые промоторы экспрессируются в присутствии индуцирующего агента. Например, промотор металлотионеина индуцируется для промотирования транскрипции и трансляции в присутствии определенных ионов металлов. Другие индуцируемые промоторы известны рядовым специалистам в данной области техники.

**[0188]** В общем, контрольная последовательность генной экспрессии будет включать, по мере необходимости, 5'-нетранскрибируемые и 5'-нетранслируемые последовательности, принимающие участие в инициации транскрипции и трансляции, соответственно, такие как ТАТА-бокс, кэпирующая последовательность, последовательность СААТ и т.п. В частности, такие 5' нетранскрибируемые

последовательности будут включать промоторную область, которая включает промоторную последовательность для контроля транскрипции функционально присоединенной кодирующей нуклеиновой кислоты. Последовательности генной экспрессии необязательно включают энхансерные последовательности или, при необходимости, расположенную против хода транскрипции активаторные последовательности.

**[0189]** Вирусные векторы включают, без ограничений, нуклеиновые последовательности следующих вирусов: ретровируса, такого как вирус мышинного лейкоза Молони, вирус мышинной саркомы Харви, мышинный фактор опухоли молочных желез и вирус саркомы Рауса; аденовируса, аденоассоциированного вируса; вирусов типа SV40; полиомавирусов; вирусов Эпштейна-Барр; папилломавирусов; вируса герпеса; вируса коровьей оспы; вируса полиомиелита; и РНК-вируса, такого как ретровирус. Могут быть легко использованы другие векторы, хорошо известные в данной области техники. Определенные вирусные векторы основаны на нецитопатических эукариотических вирусах, в которых несущественные гены были замещены на ген, представляющий интерес. Нечитопатические вирусы включают ретровирусы, жизненный цикл которых включает обратную транскрипцию геномной вирусной РНК в ДНК с последующей провирусной интеграцией в ДНК клетки-хозяина. Ретровирусы были разрешены для проведения испытаний генной терапии человека. Наиболее пригодными являются ретровирусы, дефицитные по репликации (*m.e.* способные направлять синтез желательных белков, но неспособные производить инфекционные частицы). Такие генетически измененные ретровирусные экспрессионные векторы находят широкое применение в высокоэффективной трансдукции генов *in vivo*. Стандартные протоколы получения дефицитных по репликации ретровирусов (включая стадии включения экзогенного генетического материала в плазмиду, трансфекции упаковывающей клеточной линии плазмидой, продуцирования рекомбинантных ретровирусов упаковывающей клеточной линией, сбор вирусных частиц из среды тканевой культуры и инфицирование клеток-мишеней вирусными частицами) приведены в Kriegler, M., Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, W.H. Freeman Co., New York (1990) и Murry, E. J., Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J. (1991).

**[0190]** В одном варианте реализации изобретения вирус представляет собой аденоассоциированный вирус, являющийся двухцепочечным ДНК-вирусом. Аденоассоциированный вирус может быть методами генной инженерии сделан дефицитным по репликации и способен инфицировать широкий спектр клеточных типов и видов. Дополнительно, он обладает такими преимуществами, как термостойкость и

стойкость к действию липидного растворителя; высокая частота трансдукции в клетках различной генеалогии, включая гемопозитические клетки; и отсутствие ингибирования суперинфекции, тем самым обеспечивая возможность множественных серий трансдукции. Как сообщается, аденоассоциированный вирус может сайт-специфически интегрироваться в клеточную ДНК человека, тем самым минимизируя возможность инсерционного мутагенеза и вариабельность характеристик экспрессии вставленных генов ретровирусной инфекции. Кроме того, инфекции аденоассоциированных вирусов дикого типа прослеживались в тканевых культурах на протяжении более чем 100 пассажей в отсутствие давления отбора, что говорит о том, что геномная интеграция аденоассоциированного вируса представляет собой относительно стабильное явление. Аденоассоциированный вирус может также функционировать внехромосомально.

**[0191]** Другие векторы включают плазмидные векторы. Плазмидные векторы подробно описаны в данной области техники и хорошо известны квалифицированным специалистам в данной области техники. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. В последние несколько лет было обнаружено, что плазмидные векторы являются особенно предпочтительными для доставки генов в клетки *in vivo* благодаря их неспособности к репликации внутри хозяина и интеграции в его геном. Такие плазмиды, однако, имеющие промотор, совместимый с клеткой-хозяином, могут экспрессировать пептид из гена, функционально кодируемого в плазмиде. Некоторые широко используемые плазмиды, доступные от коммерческих поставщиков, включают pBR322, pUC18, pUC19, различные pcDNA-плазмиды, pRC/CMV, различные pCMV-плазмиды, pSV40 и pBlueScript. Дополнительные примеры конкретных плазмид включают pcDNA3.1, номер по каталогу V79020; pcDNA3.1/hygro, номер по каталогу V87020; pcDNA4/myc-His, номер по каталогу V86320; и pBudCE4.1, номер по каталогу V53220, все от фирмы Invitrogen (Carlsbad, CA.). Другие плазмиды хорошо известны рядовым специалистам в данной области техники. Дополнительно, плазмиды могут быть сконструированы на заказ с использованием стандартных методов молекулярной биологии для удаления и/или добавления конкретных фрагментов ДНК.

**[0192]** В одной системе экспрессии на основе насекомых, которая может быть использована для получения белков по изобретению, вирус ядерного полиэдроза (polyhidrosis) *Autographa californica* (AcNPV) используется в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов. Вирус выращивается в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодированная последовательность может быть клонирована в несущественные области (например, ген полиэдрона) вируса и помещен под контроль промотора ACNPV

(например, промотор полиэдрона). Успешная вставка кодирующей последовательности будет приводить к инактивации гена полиэдрона и продуцированию неокклюдированного рекомбинантного вируса (*m.e.* вируса, не имеющего белковой оболочки, кодируемой геном полиэдрона). Такие рекомбинантные вирусы затем используются для инфицирования клеток *Spodoptera frugiperda*, в которых экспрессируется вставленный ген. (см., например, Smith *et al.* (1983) *J Virol* 46:584; патент США № 4215051). Дополнительные примеры этой системы экспрессии можно найти в Ausubel *et al.*, eds. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 2, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience.

**[0193]** Другая система, которая может быть использована для экспрессии белков по изобретению, представляет собой систему экспрессии гена глутаминсинтетазы, также называемую "экспрессионной системой GS" (Lonza Biologics PLC, Berkshire UK). Эта система экспрессии описана подробно в патенте США № 5981216.

**[0194]** В клетках-хозяевах млекопитающих может быть использован ряд систем экспрессии на основе вирусов. В тех случаях, когда в качестве экспрессионного вектора используется аденовирус, кодирующая последовательность может быть лигирована с комплексом контроля транскрипции/трансляции аденовируса, например, поздним промотором и тройственной лидерной последовательностью. Этот химерный ген может быть затем вставлен в геном аденовируса путем *in vitro* или *in vivo* рекомбинации. Вставка в несущественную область вирусного генома (например, область E1 или E3) будет приводить к получению рекомбинантного вируса, который является жизнеспособным и способен экспрессировать пептид в инфицированных хозяевах. См., например, Logan & Shenk (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3655). Альтернативно, может быть использован промотор 7,5 К коровьей оспы. См., например, Mackett *et al.* (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7415; Mackett *et al.* (1984) *J Virol* 49:857; Panicali *et al.* (1982) *Proc Natl Acad Sci USA* 79:4927.

**[0195]** Для повышения эффективности продуцирования, полинуклеотиды могут быть сконструированы таким образом, чтобы они кодировали множество звеньев белка по изобретению, разделенных сайтами ферментативного расщепления. Полученный полипептид может быть расщеплен (например, путем обработки пригодным ферментом) для выделения полипептидных звеньев. Это может увеличивать выход полипептидов, управляемый одним промотором. В случае использования в пригодных системах вирусной экспрессии, управление трансляцией каждого полипептида, кодируемого мРНК, осуществляется внутри транскрипта; например, внутренним рибосомо-связывающим сайтом, IRES. Таким образом, полицистронный конструкт направляет транскрипцию

отдельной большой полицистронной мРНК, которая, в свою очередь, управляет трансляцией множества индивидуальных полипептидов. Этот подход устраняет продуцирование и ферментативный процессинг полипротеинов и может значительно увеличить выход полипептидов, управляемый одним промотором.

**[0196]** Векторы, используемые для трансформации, будут обычно содержать селективируемый маркер, используемый для идентификации трансформантов. В бактериальных системах, они могут включать ген резистентности к антибиотику, такому как ампициллин или канамицин. Селективируемые маркеры для использования в культивируемых клетках млекопитающего включают гены, придающие резистентность к лекарственным средствам, таким как неомицин, гигромицин и метотрексат. Селективируемый маркер может быть амплифицируемым селективируемым маркером. Одним из амплифицируемых селективируемых маркеров является ген дигидрофолатредуктазы (DHFR). Simonsen C C *et al.* (1983) *Proc Natl Acad Sci USA* 80:2495-9. Обзор селективируемых маркеров выполнен Thilly (1986) *Mammalian Cell Technology*, Butterworth Publishers, Stoneham, Mass. и выбор селективируемых маркеров легко доступен рядовому специалисту в данной области техники.

**[0197]** Селективируемые маркеры могут быть введены в клетку на отдельной плазмиде в то же время, что и ген, представляющий интерес, или они могут быть введены на той же самой плазмиде. При использовании одной и той же самой плазмиды, селективируемый маркер и ген, представляющий интерес, могут находиться под контролем разных промоторов или одного и того же промотора, причем в последнем случае продуцируется дицистронная мРНК. Конструкты этого типа известны в данной области техники (например, патент США № 4713339).

**[0198]** Экспрессионные векторы могут кодировать метки, позволяющие легко очищать рекомбинантно полученный белок. Примеры включают, без ограничений, вектор pUR278 (Ruther *et al.* (1983) *EMBO J* 2:1791), в котором кодирующие последовательности белка, который должен экспрессироваться, могут быть лигированы в вектор в рамке с кодирующей областью lac z, так чтобы был получен меченый слитый белок; векторы pGEX могут быть использованы для экспрессии белков по изобретению с меткой глутатион-S-трансферазы (GST). Такие белки обычно являются растворимыми и могут быть легко очищены от клеток путем адсорбции на глутатион-агарозных бусинах с последующей элюцией в присутствии свободного глутатиона. Векторы включают сайты расщепления (тромбином или протеазой фактора Ха или PRESSION PRONEASE™ (Pharmacia, Peapack, N.J.)) для простоты удаления метки после очистки.

**[0199]** Экспрессионный вектор или векторы затем трансфицируют или ко-трансфицируют в пригодную клетку-мишень, которая экспрессирует полипептиды. Методы трансфекции, известные в данной области техники, включают, без ограничений, осаждение фосфата кальция (Wigler *et al.* (1978) *Cell* 14:725), электропорацию (Neumann *et al.* (1982) *EMBO J* 1:841) и использование реагентов на основе липосом. Различные системы хозяин-экспрессионный вектор могут быть использованы для экспрессии белков, описанных в данном документе, включая как прокариотические, так и эукариотические клетки. Они включают, без ограничений, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli*), трансформированные экспрессионными векторами на основе ДНК рекомбинантного бактериофага или плазмидной ДНК, содержащими пригодную кодирующую последовательность; дрожжи или нитчатые грибы, трансформированные экспрессионными векторами рекомбинантных дрожжей или грибов, содержащими пригодную кодирующую последовательность; системы на основе клеток насекомых, инфицированных экспрессионными векторами на основе рекомбинантного вируса (например, бакуловируса) содержащими пригодную кодирующую последовательность; системы растительных клеток, инфицированных экспрессионными векторами на основе рекомбинантного вируса (например, вируса мозаики цветной капусты или вируса мозаики табака), или трансформированных экспрессионными векторами на основе рекомбинантной плазмиды (например, Ti-плазмиды), содержащими пригодную кодирующую последовательность; или системы клеток животных, включая клетки млекопитающего (например, клетки НЕК 293, CHO, Cos, HeLa, НКВ11 и ВНК).

**[0200]** В одном варианте реализации изобретения клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку. В используемом в данном документе значении, эукариотическая клетка относится к любой животной или растительной клетке, имеющей определенное ядро. Эукариотические клетки животных включают клетки позвоночных, например, млекопитающих и клетки беспозвоночных, например, насекомых. Эукариотически клетки растений могут включать, в частности, без ограничений, дрожжевые клетки. Эукариотическая клетка отличается от прокариотической клетки, например, бактерий.

**[0201]** В определенных вариантах реализации изобретения эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего. Клетка млекопитающего является любой клеткой, полученной от млекопитающего. Клетки млекопитающего конкретно включают, без ограничений, клеточные линии млекопитающих. В одном варианте реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой человеческую клетку. В другом варианте реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку

НЕК 293, которая является клеточной линией почки эмбриона человека. Клетки НЕК 293 доступны как CRL-1533 из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, Manassas, VA) и как клетки 293-H, № кат. 11631-017, или клетки 293-F, № кат. 11625-019, от фирмы Invitrogen (Carlsbad, Calif.). В некоторых вариантах реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку PER.C6<sup>®</sup>, которая является человеческую клеточную линию, выделенную из сетчатки. Клетки PER.C6<sup>®</sup> доступны от фирмы Crucell (Leiden, Netherlands). В других вариантах реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO). Клетки CHO доступны от Американской коллекции типовых культур (Manassas, VA) (например, CHO-K1; CCL-61). В еще одних вариантах реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку почки детеныша хомяка (BHK). Клетки BHK доступны от Американской коллекции типовых культур (Manassas, Va.) (например, CRL-1632). В некоторых вариантах реализации изобретения клетка млекопитающего представляет собой клетку НКВ11, которая является гибридной клеточной линией клетки НЕК293 и человеческой В-клеточной линии. Mei *et al.*, *Mol. Biotechnol.* 34(2): 165-78 (2006).

**[0202]** В одном варианте реализации изобретения плазида, кодирующая белок VWF, линкер VWF, гетерологичный фрагмент или химерный белок по изобретению, дополнительно включает селективируемый маркер, например, резистентности к зеоцину, и трансфицируется в клетки НЕК 293 для продуцирования химерного белка.

**[0203]** В еще одних вариантах реализации изобретения трансфицированные клетки являются стабильно трансфицированными. Такие клетки могут быть селективированы и поддерживаться в виде стабильной клеточной линии с использованием обычных методик, известных квалифицированным специалистам в данной области техники.

**[0204]** Клетки-хозяева, содержаще ДНК-конструкты белка, выращивают в пригодной питательной среде. В используемом в данном документе значении, термин "пригодная питательная среда" означает среду, содержащую питательные вещества, требующиеся для роста клеток. Питательные вещества, необходимые для роста клеток, могут включать источник углерода, источник азота, незаменимые аминокислоты, витамины, минеральные вещества и факторы роста. Необязательно, среды могут содержать один или более факторов селекции. Необязательно, среды могут содержать сыворотку теленка или сыворотку плода коровы (FCS). В одном варианте реализации изобретения среды по существу не содержат IgG. Питательную среду обычно подвергают селективанию на клетки, содержащие ДНК-конструкт, например, с помощью лекарственного средства или дефицита необходимого питательного вещества, которые

дополняются селективируемым маркером на ДНК-конструкте, или ко-трансфицированные ДНК-конструктом. Культивируемые клетки млекопитающих обычно выращивают в коммерчески доступных содержащих сыворотку или бессывороточных средах (например, MEM, DMEM, DMEM/F12). В одном варианте реализации изобретения среда представляет собой CD293 (Invitrogen, Carlsbad, CA.). В другом варианте реализации изобретения среда представляет собой CD17 (Invitrogen, Carlsbad, CA.). Выбор среды, пригодной для конкретной используемой клеточной линии, легко доступен рядовым специалистам в данной области техники.

**[0205]** Для коэкспрессии двух полипептидных цепей химерной молекулы, как описано в данном документе, клетки-хозяева культивируют в условиях, обеспечивающих возможность экспрессии обеих цепей. В используемом в данном документе значении, культивация относится к поддержанию жизнеспособности клеток *in vitro* в течение по меньшей мере определенного времени. Поддержание может необязательно включать увеличение популяции живых клеток. Например, клетки, поддерживаемые в культуре, могут быть статичными по популяции, но при этом жизнеспособными и способными продуцировать желательный продукт, например, рекомбинантный белок или рекомбинантный слитый белок. Пригодные условия для культивации эукариотических клеток хорошо известны в данной области техники и включают надлежащий выбор культуральных сред, добавок для сред, температуры, рН, кислородного насыщения и т.п. Для коммерческих целей, культивация может включать использование любой из различных типов систем масштабирования, включая встряхиваемые колбы, роллер-флаконы, биореакторы на основе полых волокон, биореакторы с перемешиваемой емкостью, эрлифтные биореакторы, биореакторы Wave и другие.

**[0206]** Условия клеточных культур также выбирают таким образом, чтобы обеспечить возможность ассоциации первой цепи и второй цепи химерной молекулы. Условия, позволяющие осуществлять экспрессию химерной молекулы, могут включать присутствие источника витамина К. Например, в одном варианте реализации изобретения стабильно трансфицированные клетки НЕК 293 культивируют в среде CD293 (Invitrogen, Carlsbad, CA) или среде OptiCHO (Invitrogen, Carlsbad, CA) с добавкой 4 мМ глутамин.

**[0207]** В одном аспекте настоящее изобретение касается способа экспрессии, получения или продуцирования химерного белка, включающего: а) трансфекцию клетки-хозяина полинуклеотидом, кодирующим химерную молекулу, и б) культивацию клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, пригодных для экспрессии химерной молекулы, в котором осуществляется экспрессия химерной молекулы.

[0208] В дополнительных вариантах реализации изобретения белковый продукт, содержащий химерную молекулу, секретируется в среду. Среда отделяется от клеток, концентрируется, фильтруется и затем пропускается через две или три колонки для аффинной хроматографии, например, колонку с белком А и одну или две анионнообменные колонки.

[0209] В определенных аспектах настоящее изобретение относится к химерному полипептиду, полученному способами, описанными в данном документе.

[0210] *In vitro* продуцирование позволяет осуществлять масштабирование для получения больших количеств желательных измененных полипептидов по изобретению. Методики культивации клеток млекопитающих в условиях для тканевых культур известны в данной области техники и включают гомогенную суспензионную культуру, например, в эрлифтном реакторе или в реакторе с непрерывным перемешиванием, или иммобилизованную или удерживаемую клеточную культуру, например, в пустотелых волокнах, микрокапсулах, на агарозных микробусинах или керамических картриджах. При необходимости и/или желании, растворы полипептидов могут быть очищены обычными хроматографическими способами, например, гель-фильтрацией, ионообменной хроматографией, хроматографией гидрофобных взаимодействий (НВС), хроматографией на DEAE-целлюлозе или аффинной хроматографией.

[0211] Изобретение также включает способ улучшения FVIII-активности химерного белка FVIII, содержащего белок VWF, слитый с первым гетерологичным фрагментом и последовательностью XTEN, и белок FVIII, соединенный со вторым гетерологичным фрагментом, включающий вставку линкера VWF между белком VWF и первым гетерологичным фрагментом, причем линкер VWF содержит полипептид, выбранный из: (i) области a2 из фактора VIII (FVIII); (ii) области a1 из FVIII; (iii) области a3 из FVIII; (iv) сайта расщепления тромбином, содержащего X-V-P-R (SEQ ID NO: 3) и мотив экзосайта взаимодействия PAR1, где X представляет собой алифатическую аминокислоту; или (v) любой их комбинации. В некоторых вариантах реализации изобретения FVIII-активность измеряют путем анализа активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) или методом ротационной тромбоэластометрии (ROTEM).

#### **IV. Фармацевтическая композиция**

[0212] Композиции, содержащие химерную молекулу по настоящему изобретению, могут содержать пригодный фармацевтически приемлемый носитель. Например, они

могут содержать эксципиенты и/или вспомогательные вещества, облегчающие переработку активных соединений в препараты, предназначенные для доставки к месту действия.

**[0213]** Фармацевтическая композиция может быть составлена для парентерального введения (*m.e.* внутривенного, подкожного, или внутримышечного) путем болюсной инъекции. Композиции для инъекций могут быть представлены в дозированных лекарственных формах, например, в ампулах или в многодозовых контейнерах с добавленным консервантом. Композиции могут иметь такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, активный ингредиент может находиться в форме порошка для восстановления пригодным носителем, например, апирогенной водой.

**[0214]** Пригодные композиции для парентерального введения также включают водные растворы активных соединений в водорастворимой форме, например, водорастворимых солей. Кроме того, суспензии активных соединений могут быть введены в виде соответствующих масляных суспензий для инъекции. Пригодные липофильные растворители или носители включают жирные масла, например, кунжутное масло, или сложные эфиры синтетических жирных кислот, например, этилолеат или триглицериды. Водные суспензии для инъекции могут содержать вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, включая, например, натрия карбоксиметилцеллюлозу, сорбит и декстран. Необязательно, суспензия может также содержать стабилизаторы. Липосомы также могут быть использованы для инкапсулирования молекул по изобретению для доставки в клетки или интерстициальное пространство. Типичными примерами фармацевтически приемлемых носителей являются физиологически совместимые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие всасывание агенты, вода, солевой раствор, фосфатно-солевой буфер, декстроза, глицерин, этанол и т.п. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция содержит изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. В других вариантах реализации изобретения композиции содержат фармацевтически приемлемые вещества, такие как смачивающие агенты или небольшие количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты или буферы, которые увеличивают срок хранения или эффективность активных ингредиентов.

**[0215]** Композиции по изобретению могут находиться в различных формах, включая, например, жидкости (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии,

суспензии, полутвердые и твердые лекарственные формы. Предпочтительная форма зависит от способа введения и терапевтического применения.

**[0216]** Композиция может быть составлена в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосом или других упорядоченных структур, пригодных для обеспечения высоких концентраций лекарственного средства. Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения активного ингредиента в требуемом количестве в пригодный растворитель с одним из или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, в зависимости от потребности, с последующей стерилизацией фильтрованием. В общем, дисперсии готовят путем включения активного ингредиента в стерильный носитель, содержащий основную дисперсионную среду и другие необходимые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций, предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и лиофилизация, позволяющие получить порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный желательный ингредиент из предварительно стерильно профильтрованного раствора. Надлежащая текучесть раствора может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии, и путем использования поверхностно-активных веществ. Пролонгированное всасывание композиций для инъекций может быть обеспечено путем включения в композиции агента, замедляющего всасывание, например, моностеаратных солей и желатина.

**[0217]** Композиция активного ингредиента может быть приготовлена с использованием рецептуры композиции или устройства с пролонгированным высвобождением. Примеры таких композиций и устройств включают имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биodeградируемые биосовместимые полимеры, например, этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэферы и полимолочная кислота. Способы получения таких композиций и устройств известны в данной области техники. См., например, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

**[0218]** Композиции депо для инъекций могут быть изготовлены путем формирования микроинкапсулированных матриц лекарственного средства в биodeградируемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения лекарственного средства и полимера, и природы используемого полимера, можно контролировать скорость высвобождения лекарственного средства. Другими типичными примерами биodeградируемых полимеров являются полиортоэферы и

полиангидриды. Композиции депо для инъекций также могут быть приготовлены путем захвата лекарственного средства в липосомы или микроэмульсии.

**[0219]** В композиции могут быть включены дополнительные активные соединения. В одном варианте реализации изобретения составляется композиция химерной молекулы по изобретению с другим фактором свертывания крови, или его вариантом, фрагментом, аналогом или производным. Например, фактор свертывания крови включает, без ограничений, фактор V, фактор VII, фактор VIII, фактор IX, фактор X, фактор XI, фактор XII, фактор XIII, протромбин, фибриноген, фактор фон Виллебранда или рекомбинантный растворимый тканевый фактор (rsTF) или активированные формы любых вышеперечисленных материалов. Фактор свертывания крови гемостатического средства может также включать антифибринолитические лекарственные средства, например, эpsilon-аминокапроновую кислоту, транексамовую кислоту.

**[0220]** Схемы дозирования могут быть отрегулированы для обеспечения оптимальных желательных ответов. Например, может быть введен разовый болюс, может быть введено несколько дробных доз на протяжении определенного периода времени, или доза может быть пропорционально снижена или увеличена в зависимости от требований терапевтической ситуации. Композиции для парентерального введения предпочтительно составляют в виде дозированных лекарственных форм для простоты введения и равномерности дозировки. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, Pa. 1980).

**[0221]** Помимо активного соединения, жидкая лекарственная форма может содержать инертные ингредиенты, такие как вода, этиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла, глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана.

**[0222]** Неограничивающие примеры пригодных фармацевтических носителей также описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences by E. W. Martin. Некоторые примеры эксципиентов включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, глицеринмоностеарат, тальк, хлорид натрия, сухое снятое молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Композиция может также содержать буферные реагенты для регулирования pH и смачивающие или эмульгирующие агенты.

**[0223]** Для перорального введения фармацевтическая композиция может находиться в форме таблеток или капсул, приготовленных обычными способами. Композиция также может быть приготовлена в виде жидкости, например, сиропа или

суспензии. Жидкость может включать суспендирующие агенты (например, сироп сорбит, производные целлюлозы или гидрированные пищевые жиры), эмульгирующие агенты (лецитин или гуммиарабик), неводные носители (например, миндальное масло, масляные сложные эфиры, этиловый спирт или фракционированные растительные масла) и консерванты (например, метил- или пропил-п-гидроксibenзоаты или сорбиновую кислоту). Препараты могут также включать вкусовые вещества, красящие вещества и подсластители. Альтернативно, композиция может представлять собой сухой продукт для восстановления водой или другим пригодным носителем.

**[0224]** Для буккального введения композиция может иметь форму таблеток или пастилок в соответствии с обычными протоколами.

**[0225]** Для введения путем ингаляции соединения для использования в соответствии с настоящим изобретением обычно доставляются в виде распыленного аэрозоля с эксципиентами или без них, или в виде распыляемого аэрозоля из упаковки под давлением или небулайзера, необязательно, с пропеллентом, например, дихлордифторметаном, трихлорфторметаном, дихлортетрафторметаном, двуокисью углерода или другим пригодным газом. В случае аэрозоля под давлением дозирующее устройство может быть получено путем обеспечения клапана для доставки дозируемого количества. Могут быть изготовлены композиции для капсул и картриджей, например, изготовленных из желатина, для использования ингаляторе или инсуффляторе, содержащие порошкообразную смесь соединения и пригодной порошкообразной основы, такой как лактоза или крахмал.

**[0226]** Фармацевтическая композиция также может быть приготовлена для ректального введения в виде суппозитория или удерживающей клизмы, например, содержащих обычные основы для суппозиториев, такие как какао-масло или другие глицериды.

## **V. Генная терапия**

**[0227]** Химерная молекула по изобретению может быть получена *in vivo* у млекопитающего, например, пациента, (для которого) использование генно-терапевтического подхода к лечению связанной с кровотечением болезни или расстройства, выбранных из нарушения свертываемости крови, гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения в ротовой полости, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в полости рта, травмы, повреждения черепа, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома кости, кровотечения в центральной нервной

системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве, или кровоизлияния во влагалище подвздошно-поясничной мышцы будет терапевтически полезным. В одном варианте реализации изобретения связанная с кровотечением болезнь или расстройство представляют собой гемофилию. В другом варианте реализации изобретения связанная с кровотечением болезнь или расстройство представляют собой гемофилию А. При этом предусматривается введение пригодной химерной молекулы, кодирующей нуклеиновую кислоту, функционально связанную с пригодными контрольными последовательностями экспрессии. В определенных вариантах реализации изобретения такие последовательности включены в вирусный вектор. Пригодные вирусные векторы для такой генной терапии включают аденовирусные векторы, лентивирусные векторы, бакуловирусные векторы, векторы на основе вируса Эпштейна-Барр, паповавирусные векторы, векторы на основе вируса коровьей оспы, векторы на основе вируса простого герпеса и аденоассоциированные вирусные (AAV) векторы. Вирусный вектор может быть вирусным вектором с дефектом репликации. В других вариантах реализации изобретения аденовирусный вектор имеет делецию в его гене E1 ген или гене E3. В тех случаях, когда используется аденовирусный вектор, млекопитающее может не подвергаться воздействию нуклеиновой кислоты, кодирующей ген селективируемого маркера. В других вариантах реализации изобретения последовательности включены в невирусный вектор, известный квалифицированным специалистам в данной области техники.

## **VI. Способы применения химерного белка**

**[0228]** Настоящее изобретение дополнительно предусматривает способ снижения частоты или тяжести эпизода кровотечения у субъекта, нуждающегося в этом, с использованием химерной молекулы по изобретению. Типичный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества химерной молекулы по изобретению. В других аспектах изобретение включает способ предотвращения возникновения эпизода кровотечения у субъекта, нуждающегося в этом, с использованием химерной молекулы по изобретению. В других аспектах композиция, содержащая ДНК, кодирующую рекомбинантный белок по изобретению, может быть введена субъекту, нуждающемуся в этом. В определенных аспектах изобретения, клетка, экспрессирующая химерную молекулу по изобретению, может быть введена субъекту, нуждающемуся в этом. В определенных аспектах изобретения фармацевтическая композиция содержит (i) химерную молекулу, (ii) выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерную молекулу, (iii) вектор, содержащий нуклеиновую кислоту,

кодирующую химерную молекулу, (iv) клетку, содержащую выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую химерную молекулу и/или вектор, содержащий нуклеиновую (кислоту), кодирующую химерную молекулу, или (v) их комбинацию, и фармацевтические композиции дополнительно содержат приемлемый эксципиент или носитель.

**[0229]** Эпизод кровотечения может быть вызван или возникнуть вследствие расстройства свертывания крови. Расстройство свертывания крови также может быть названо коагулопатией. В одном примере, расстройство свертывания крови, которое можно лечить фармацевтической композицией в соответствии с данным описанием, представляет собой гемофилию или болезнь фон Виллебранда (vWD). В другом примере, расстройство свертывания крови, которое можно лечить фармацевтической композицией в соответствии с настоящим изобретением, представляет собой гемофилию А.

**[0230]** В некоторых вариантах реализации изобретения тип кровотечения, ассоциированного с состоянием кровотечения, выбирают из гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения в ротовой полости, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в полости рта, травмы, повреждения черепа, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома кости, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве, кровоизлияния во влагалище подвздошно-поясничной мышцы или любой их комбинации.

**[0231]** В других вариантах реализации изобретения субъект, страдающий от состояния кровотечения, нуждается в хирургическом лечении, включая, например, хирургическую профилактику или периоперационную медицинскую помощь. В одном примере, хирургию выбирают из малого хирургического вмешательства и обширного хирургического вмешательства. Типичные примеры хирургических процедур включают удаление зуба, тонзиллэктомию, паховое грыжесечение, синовэктомию, краниотомию, остеосинтез, травматологическую хирургию, интракраниальную хирургию, интраабдоминальную хирургию, интраторакальную хирургию, хирургию замены суставов (например, полное протезирование коленного сустава, протезирование тазобедренного сустава и т.п.), сердечную хирургию и кесарево сечение.

**[0232]** В другом примере субъект получает сопутствующее лечение фактором IX. Поскольку соединения по изобретению способны активировать FIXa, они могут быть использованы для предварительной активации полипептида FIXa перед введением FIXa субъекту.

**[0233]** Способы по изобретению могут практиковаться на субъекте, нуждающемся в профилактическом лечении или лечении "по требованию".

**[0234]** Фармацевтические композиции, содержащие химерную молекулу по изобретению, могут быть составлены для любого пригодного способа введения, включая, например, местное (например, трансдермальное или глазное), пероральное, буккальное, назальное, вагинальное, ректальное или парентеральное введение.

**[0235]** Термин "парентеральный", в используемом в данном документе значении, включает подкожную, интрадермальную, интраваскулярную (например, внутривенную), внутримышечную, спинальную, внутричерепную, интратекальную, внутриглазную, периокулярную, интраорбитальную, интрасиновиальную и интраперитонеальную инъекцию, а также любую подобную методику инъекции или инфузии. Композиция может быть также, например, суспензией, эмульсией, композицией с пролонгированным высвобождением, кремом, гелем или порошком. Композиция может быть составлена в виде суппозитория, с традиционными связующими и носителями, такими как триглицериды.

**[0236]** После подробного описания настоящего изобретения его можно будет лучше понять со ссылкой на приведенные далее примеры, приведенные в данном документе только для иллюстрации и не ограничивающие изобретение. Все патенты и публикации, указанные в данном документе, положительным образом включены в данный документ в качестве ссылок.

## ПРИМЕРЫ

**[0237]** В примерах были использованы следующие материалы и способы, если не указано иное.

Материалы и способы

**[0238]** В общем, в практике настоящего изобретения используются, если не указано иное, обычные методики химии, биофизики, молекулярной биологии, технологии рекомбинантных ДНК, иммунологии (особенно, например, технологии антител) и стандартные методы электрофореза. См., например, Sambrook, Fritsch and Maniatis, *Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989); *Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 510, Paul, S., Humana Pr (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169)*, McCafferty, Ed., Irl Pr

(1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow et al., C.S.H.L. Press, Pub. (1999); и Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992).

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

**[0239]** Этот пример оценивает кинетику тромбин-медируемого высвобождения D'D3 при 37 °C различными конструктами VWF, проиллюстрированными на Фигуре 2. Эксперименты Biosore проводились с конструктами VWF-Fc, содержащими разные расщепляемые тромбином линкеры между доменом D'D3 VWF и Fc. Конечной целью является использование информации, полученной при гидролизе тромбином VWF-Fc, по отношению к гетеродимерам FVIII-VWF, описанным в данном документе. Все конструкты VWF-D'D3 пропускались над чипом для достижения плотностей связывания белка в диапазоне значений 100-700 RU. После связывания конструкта VWF с чипом, 5 ед./мл тромбина вводят в объем над поверхностью на 5 минут. Fc остается связанным с чипом, в то время как D'D3 в расщепляемых конструктах высвобождается. Строили график зависимости скорости (RU/с) от плотности захвата (RU), как проиллюстрировано на Фигурах 3 и 4. Скорость расщепления пропорциональна начальной плотности захвата, а наклон кривой является мерой восприимчивости каждого конструкта к расщеплению тромбином.

**[0240]** Фигура 3 иллюстрирует, что VWF-052 (не имеющий сайта расщепления тромбином в линкерной области), как ожидалось, не расщепляется тромбином. Величина скорости для VWF-039 (LVPR с сайтом PAR1) сопоставима со скоростью расщепления FVIII (данные не приведены). Таким образом, VWF-039 служит точкой отсчета для полного высвобождения D'D3 от Fc. Соотношения величин наклона для различных конструктов VWF-Fc по отношению к VWF-039 использовали для определения эффективности расщепления тромбином. VWF-039 (LVPR с сайтом PAR1) расщепляется тромбином в около 70-80 раз быстрее, чем VWF-031 (LVPR). VWF-51 (ALRPRVV) расщепляется в 1,8 раза быстрее, чем VWF-031 (LVPR). VWF-034, содержащий 288 XTEN рядом с (along) сайтом LVPR, демонстрировал более медленное расщепление по сравнению с VWF-031.

**[0241]** Были также получены конструкты VWF-Fc путем введения разных кислотных областей (a1, a2 и a3) белка FVIII в линкерную область. VWF-055, содержащий область a2 между D'D3 и областью Fc, демонстрирует расщепление тромбином, близкое к конструкту VWF-039. Как проиллюстрировано на Фигуре 4, VWF-054 (область a1) и

VWF-056 (область a3) продемонстрировали в около 5 раз более медленное расщепление тромбином.

[0242] Фигура 5 иллюстрирует величины наклона кривых расщепления тромбином для разных конструкторов VWF. Из этих результатов следует, что кислотная область 2 (a2) FVIII является высокоэффективным сайтом расщепления тромбином, и она была включена в гетеродимеры FVIII-VWF, как описано в данном документе.

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

[0243] Гетеродимеры FVIII/VWFD'D3, содержащие разные расщепляемые тромбином линкеры, оценивали с помощью анализа методом ROTEM (ротационной тромбоэластометрии) цельной крови донора с гемофилией А (HemA) на их способность влиять на гемостаз. Образец цельной крови брали у донора с тяжелой гемофилией А, сопровождающейся повышенной кровоточивостью, с использованием цитрата натрия в качестве антикоагулянта. Через 40 минут после взятия образца крови, варианты гетеродимера FVIII/VWFD'D3, содержащие разные расщепляемые тромбином линкеры - FVIII155/VWF031 (48 аминокислот, сайт LVPR), FVIII155/VWF039 (26 аминокислот, сайт LVPR+PAR1), FVIII155/VWF055 (34 аминокислоты, a2 из FVIII) разводили в образце цельной крови до конечной концентрации, составляющей 100%, 30%, 10% и 3% от нормальной, при измерении методом хромогенного анализа FVIII. Немедленно после прибавления гетеродимеров FVIII/VWFD'D3, реакцию ROTEM запускали путем прибавления CaCl<sub>2</sub>. Время свертывания (время до достижения амплитуды 2 мм от начала теста) регистрировали с помощью инструмента и строили график зависимости от концентрации FVIII в образцах (Фигура 6). Было выдвинуто предположение, что более сильнодействующий гетеродимер FVIII/VWFD'D3 будет индуцировать более быстрый процесс свертывания, приводя таким образом к более коротким временам свертывания по сравнению с менее активным гетеродимером FVIII/VWFD'D3. Как показано на Фигуре 6, образцы с добавлением гетеродимера FVIII/VWF039 имели самое короткое время свертывания при всех протестированных концентрациях, а образцы с добавлением гетеродимера FVIII/VWF031 имели самое большое время свертывания при всех концентрациях. Время свертывания образцов с добавлением гетеродимера FVIII155/VWF055 имеет промежуточные значения. Таким образом, гемостатическая способность изменяется в порядке FVIII155/VWF039 > FVIII155/VWF055 > FVIII155/VWF031. Поскольку единственным отличием между этими тремя молекулами

являются расщепляемые тромбином линкеры между белком VWF и Fc-областью, результаты указывают, что линкер, содержащий сайт LVPR и мотив экзосайта взаимодействия PAR1 и область a2 FVIII, функционирует лучше, чем один лишь сайт LVPR.

### Пример 3. Оценка активности гетеродимеров FVIII/VWF

**[0244]** Гетеродимерные конструкции FVIII-XTEN/VWF трансфицировали в клетки HEK293F с использованием трех плазмид: первая экспрессировала FVIII-XTEN-Fc, вторая экспрессировала VWF-XTEN-Fc и третья экспрессировала PACE. Для трансфекции использовали стандартный протокол с полиэтиленимином (PEI) и после 5 дней трансфекции собирали среду тканевых культур. Из сред были выделены различные комбинации гетеродимеров FVIII-VWF. Активность очищенного белка тестировали с использованием как хромогенного (двухстадийный), так и АЧТВ (одностадийный) анализов свертывания с использованием стандартных протоколов. Введение кислотной области 2 (a2) FVIII или между FVIII и Fc, или между D'D3 и Fc (как указано в Таблице 7А и на Фигуре 7) улучшает АЧТВ-активность гетеродимера FVIII-VWF, как показано в Таблице 7С. Например, гетеродимер FVIII169/VWF059 имеет сайт расщепления тромбином a2 в линкерной области D'D3-Fc и имеет лучшую АЧТВ-активность, чем FVIII169/VWF057, который содержит тромбиновый сайт LVPR в линкере D'D3Fc, как показано в Таблице 7С.

**[0245]** Аналогично, включение области a2 между FVIII и Fc увеличивает одностадийную свертывающую активность гетеродимера, как видно по улучшенному соотношению результатов хромогенного и АЧТВ-анализов для FVIII286/VWF059 и FVIII286/VWF062, как показано в Таблице 7В.

Таблица 7А

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

Таблица 7В

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

Таблица 7С

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

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

**[0246]** Острую эффективность гетеродимеров, содержащих разные расщепляемые тромбином линкеры, оценивали с использованием модели кровотечения HemA-мышей с обрезанным кончиком хвоста.

**[0247]** Самцов HemA-мышей в возрасте 8-12 недель рандомизировали на 5 экспериментальных групп и проводили им однократное внутривенное введение SQ BDD-FVIII, rFVIII169/VWF034, rFVIII169/VWF057, rFVIII169/VWF059 или раствора носителя, соответственно. Для имитации эпизодического лечения с помощью FVIII (для восстановления до 50-100% нормального уровня FVIII в плазме), выбранная лечебная доза FVIII составляла 75 МЕ/кг при измерении по АЧТВ-активности FVIII. При таком уровне дозировки, все тестируемые варианты FVIII будут восстанавливать ок. 70% от нормальной FVIII-активности в плазме мышей через 5 мин. после введения дозы.

**[0248]** Процедуру обрезания кончика хвоста проводили следующим образом. Вкратце, мышей анестезировали коктейлем 50 мг/кг кетамина/0,5 мг/кг дексметомидина до травмы хвоста и помещали на грелку-подушку при 37 °С для поддержания температуры тела. Хвосты мышей затем погружали в нагретый до 37 °С солевой раствор на 10 минут для расширения латеральной вены. После расширения вены, варианты FVIII или раствор носителя вводили инъекцией через хвостовую вену и кончик хвоста затем

отрезают на расстоянии 5 мм от конца с помощью скальпеля №11 с прямым лезвием через 5 мин. после введения дозы. Вытекающую кровь собирали в 13 мл солевого раствора с температурой 37 °С в течение 30 минут, и объем потери крови определяли по изменению веса пробирки с собранной кровью: объем потери крови = (вес пробирки в конце определения - начальный вес + 0,10) мл. Проводят статистический анализ с использованием t-критерия (тест Колмогорова-Смирнова) и однофакторный дисперсионный анализ (тест Крускал-Уоллис, апостериорный анализ: критерий Данна с многократным сравнением).

[0249] Строили график объема потери крови для каждого индивидуального животного в исследованиях, приведенный на Фигуре 8. Значительное снижение объема потери крови наблюдалось для всех экспериментальных групп FVIII по сравнению с животными, получавшими носитель ( $p < 0,05$ , Таблица 8). Аналогичное снижение потери крови наблюдалось для всех экспериментальных групп гетеродимеров по сравнению с введением BDD-FVIII ( $p > 0,5$ , Таблица 8), что позволяет предположить, что молекулы гетеродимера могут потенциально быть такими же эффективными, как и SQ BDD-FVIII при лечении по необходимости.

Таблица 8. P-значение для теста Колмогорова-Смирнова

[0250]		FVIII169/VWF034	FVIII169/VWF057	FVIII169/VWF059
	BDD-FVIII	0,7591	0,9883	0,5176
[0251]	Носитель	0,0006	0,0006	0,0266

**Нуклеотидная последовательность pSYN VWF057 (D'D3-Fc VWF с тромбиновым сайтом LVPR в линкере) (SEQ ID NO: 79)**

```

1   ATGATTCTCTG  CCAGATTTGTC  CGGGGTGCTG  CTTGCTCTGG  CCCTCATTTT
51  GCCAGGGACC  STTTGTGCAG  AAGGAACCTG  CGGCAGGTCA  TCCACGGCCC
101 GATGCAGCCT  TTTTCGGAAGT  GACTTCGTCA  ACACCTTTGA  TGGGAGCATG
151 TACAGCTTTG  CGGGATACTG  CAGTTACCTC  CTGGCAGGGG  GCTGCCAGAA
201 ACGCTCSTTC  TCGATTATTG  GGGACTTCCA  GAATGGCAAG  AGAGTGAGCC
251 TCTCCGTGTA  TCTTGGGGAA  TTTTTTGACA  TCCATTTGTT  TGTCAATGGT
301 ACCGTGACAC  AGGGGGACCA  AAGAGTCTCC  ATGCCCTATG  CCTCCAAAGG
351 GCTGTATCTA  GAAACTGAGG  CTGGGТАCTA  CAAGCTGTCC  GGTGAGGCCT
401 ATGGCTTTGT  GGCCAGGATC  GATGGCAGCG  GCAACTTTCA  AGTCCTGCTG
451 TCAGACAGAT  ACTTCAACAA  GACCTGCGGG  CTGTGTGGCA  ACTTTAACAT
501 STTTGCTGAA  GATGACTTTA  TGACCCAAGA  AGGGACCTTG  ACCTCGGACC
551 STTATGACTT  TGCCAACTCA  TGGGCTCTGA  GCAGTGGAGA  ACAGTGGTGT
601 GAACGGGCAT  CTCCTCCCAG  CAGCTCATGC  AACATCTCCT  CTGGGGAAAT
651 GCAGAAGGGC  CTGTGGGAGC  AGTGCCAGCT  TCTGAAGAGC  ACCTCGGTGT
701 TTGCCCGCTG  CCACCCCTCTG  GTGGACCCCG  AGCSTTTTGT  GGCCCTGTGT
751 GAGAAGACTT  TGTGTGAGTG  TGCTGGGGGG  CTGGAGTGCG  CCTGCCCTGC
801 CCTCCTGGAG  TACGCCCGGA  CCTGTGCCCA  GGAGGGAAATG  GTGCTGTACG
851 GCTGGACCGA  CCACAGCGCG  TGCAGCCCAG  TGTGCCCTGC  TGGTATGGAG
901 TATAGGCAGT  GTGTGTCCCC  TTGCGCCAGG  ACCTGCCAGA  GCCTGCACAT
951 CAATGAAATG  TGTCAGGAGC  GATGCGTGGA  TGGCTGCAGC  TGCCCTGAGG
1001 GACAGCTCCT  GGATGAAGGC  CTCTGCGTGG  AGAGCACCGA  GTGTCCCTGC

```

1051 GTGCATTCCG GAAAGCGCTA CCCTCCCGGC ACCTCCCTCT CTCGAGACTG  
1101 CAACACCTGC ATTTGCCGAA ACAGCCAGTG GATCTGCAGC AATGAAGAAT  
1151 GTCCAGGGGA GTGCCTTGTC ACTGGTCAAT CCCACTTCAA GAGCTTTGAC  
1201 AACAGATACT TCACCTTCAG TGGGATCTGC CAGTACCTGC TGGCCCCGGA  
1251 TTGCCAGGAC CACTCCTTCT CCATTGTCAT TGAGACTGTC CAGTGTGTCG  
1301 ATGACCGCGA CGCTGTGTGC ACCCGCTCCG TCACCGTCCG CAGTGTGTCG  
1351 CTGCACAACA GCCTTGTGAA ACTGAAGCAT GGGGCAGGAG TTGCCATGGA  
1401 TGGCCAGGAC ATCCAGCTCC CCCTCCTGAA AGGTGACCTC CGCATCCAGC  
1451 ATACAGTGAC GGCCTCCGTG CGCCTCAGCT ACGGGGAGGA CCTGCAGATG  
1501 GACTGGGATG GCCGCGGGAG GCTGCTGGTG AAGCTGTCCC CCGTCTATGC  
1551 CGGGAAGACC TGCGGCCTGT GTGGGAATTA CAATGGCAAC CAGGGCGACG  
1601 ACTTCCTTAC CCCCTCTGGG CTGGCGGAGC CCCGGGTGGA GGACTTCGGG  
1651 AACGCCTGGA AGCTGCACGG GGACTIONCAG GACCTGCAGA AGCAGCACAG  
1701 CGATCCCTGC GCCCTCAACC CGCGCATGAC CAGGTTCTCC GAGGAGCGT  
1751 GCGCGGTCCCT GACGTCCCCC ACATTGAGAG CCTGCCATCG TGCCGTCAGC  
1801 CCGCTGCCCT ACCTGCGGAA CTGCCGCTAC GACGTGTGCT CCTGCTCGGA  
1851 CGGCCGCGAG TGCCTGTGCG GCGCCCTGGC CAGCTATGCC GCGGCCGTGG  
1901 CGGGGAGAGG CGTGCGCGTC GCGTGGCGCG AGCCAGGCCG CTGTGAGCTG  
1951 AACTGCCCCG AAGGCCAGGT GTACCTGCAG TGCGGGACCC CCTGCAACCT  
2001 GACCTGCCGC TCTCTCTCTT ACCCGGATGA GGAATGCAAT GAGGCCGTGCC  
2051 TGGAGGGCTG CTTCTGCCCC CCAGGGCTCT ACATGGATGA GAGGGGGGAC  
2101 TGGCAGCCCA AGGCCCAGTG CCCCTGTTAC TATGACGGTG AGATCTTCCA  
2151 GCCAGAAGAC ATCTTCTCAG ACCATCACAC CATGTGCTAC TGTGAGGATG  
2201 GCTTCATGCA CTGTACCATG AGTGGAGTCC CCGGAAGCTT GCTGCCAGAC  
2251 GCTGTCCCTA GCAGTCCCCC GTCTCATCGC AGCAAAAAGGA GCCTATCCTG  
2301 TCGGCCCCCC ATGGTCAAGC TGGTGTGTCC CGCTGACAAC CTGCGGGCTG  
2351 AAGGGCTCGA GTGTACCAA ACGTGCCAGA ACTATGACCT GGAGTGCATG  
2401 AGCATGGGCT GTGTCTCTGG CTGCCTCTGC CCCCCGGGCA TGGTCCGGCA  
2451 TGAGAACAGA TGTGTGGCCC TGGAAAGGTG TCCCTGCTTC CATCAGGGCA  
2501 AGGAGTATGC CCCTGGAGAA ACAGTGAAGA TTGGCTGCAA CACTTGTGTC  
2551 TGTGCGGACC GGAAGTGGAA CTGCACAGAC CATGTGTGTG ATGCCACGTG  
2601 CTCCACGATC GGCATGGCCC ACTACCTCAC CTTGACGGG CTCAAATACC  
2651 TGTTCCCCGG GGAGTGCCAG TACGTTCTGG TGCAGGATTA CTGCGGCAGT  
2701 AACCTGGGA CCTTTTCGGAT CCTAGTGGGG AATAAGGGAT GCAGCCACCC  
2751 CTCAGTAAA TGCAAGAAAC GGGTCACCAT CCTGGTGGAG GGAGGAGAGA  
2801 TTGAGCTGTT TGACGGGGAG GTGAATGTGA AGAGGCCCAT GAAGGATGAG  
2851 ACTCACTTTG AGGTGGTGGG GTCTGGCCGG TACATCATTC TGCTGCTGGG  
2901 CAAAGCCCTC TCCGTGGTCT GGGACCGCCA CCTGAGCATC TCCGTGGTCC  
2951 TGAAGCAGAC ATACCAGGAG AAAGTGTGTG GCCTGTGTGG GAATTTTGTG  
3001 GGCATCCAGA ACAATGACCT CACCAGCAGC AACCTCCAAG TGGAGGAAGA  
3051 CCCTGTGGAC TTTGGGAACT CCTGGAAAGT GAGCTCGCAG TGTGCTGACA  
3101 CCAGAAAAGT GCCTCTGGAC TCATCCCCCTG CCACCTGCCA TAACAACATC  
3151 ATGAAGCAGA CGATGGTGGG TTCCTCCTGT AGAATCCTTA CCAGTGACGT  
3201 CTTCCAGGAC TGCAACAAGC TGGTGGACCC CGAGCCATAT CTGGATGTCT  
3251 GCATTTACGA CACCTGCTCC TGTGAGTCCA TTGGGGACTG CGCCGCATTC  
3301 TGCGACACCA TTGCTGCCTA TGCCACGTG TGTGCCCAGC ATGGCAAGGT  
3351 GGTGACCTGG AGGACGGCCA CATTGTGCCC CCAGAGCTGC GAGGAGAGGA  
3401 ATCTCCGGGA GAACGGGTAT GAGGCTGAGT GGCCTATAA CAGCTGTGCA  
3451 CCTGCCTGTC AAGTCACGTG TCAGCACCTT GAGCCACTGG CCTGCCCTGT  
3501 GCAGTGTGTG GAGGGCTGCC ATGCCCACTG CCCTCCAGGG AAAATCCTGG  
3551 ATGAGCTTTT GCAGACCTGC GTTGACCCTG AAGACTGTCC AGTGTGTGAG  
3601 GTGGCTGGCC GCGTTTTTGC CTCAGGAAAG AAAGTCACTT TGAATCCCAG  
3651 TGACCCTGAG CACTGCCAGA TTTGCCACTG TGATGTTGTC AACCTCACCT  
3701 GTGAAGCCTG CCAGGAGCCG ATATCGGGCG CGCCAACATC AGAGAGCGCC  
3751 ACCCTGAAA GTGGTCCCGG GAGCGAGCCA GCCACATCTG GGTCCGAAAC  
3801 GCCAGGCACA AGTGTGCTG CAACTCCCGA GTCCGGACCT GGCTCCGAGC  
3851 CTGCCACTAG CGGCTCCGAG ACTCCGGGAA CTTCCGAGAG CGTACACCA  
3901 GAAAGCGGAC CCGGAACCAG TACCGAACCT AGCGAGGGCT CTGCTCCGGG  
3951 CAGCCCAGCC GGCTCTCCTA CATCCACGGA GGAGGGCACT TCCGAATCCG  
4001 CCACCCCGGA GTCAGGGCCA GGATCTGAAC CCGCTACCTC AGGCAGTGAG  
4051 ACGCCAGGAA CGAGCGAGTC CGCTACACCG GAGAGTGGGC CAGGGAGCCC  
4101 TGCTGGATCT CCTACGTCCA CTGAGGAAGG GTCACCAGCG GGCTCGCCCA  
4151 CCAGCACTGA AGAAGGTGCC TCGAGCGGCG GTGGAGGATC CGGTGGCGGG  
4201 GGATCCGGTG GCGGGGGATC CGGTGGCGGG GGATCCGGTG GCGGGGGATC

4251	CGGTGGCGGG	GGATCCCTGG	TCCCCCGGGG	CAGCGGAGGC	GACAAAACTC
4301	ACACATGCCC	ACCGTGCCCA	GCTCCAGAAC	TCCTGGGCGG	ACCGTCAGTC
4351	TTCCTCTTCC	CCCCAAAACC	CAAGGACACC	CTCATGATCT	CCCGGACCCC
4401	TGAGGTACACA	TGCGTGGTGG	TGGACGTGAG	CCACGAAGAC	CCTGAGGTCA
4451	AGTTCAACTG	GTACGTGGAC	GGCGTGGAGG	TGCATAATGC	CAAGACAAAG
4501	CCGCGGGAGG	AGCAGTACAA	CAGCACGTAC	CGTGTGGTCA	CCGTCTCTAC
4551	CGTCCTGCAC	CAGGACTGGC	TGAATGGCAA	GGAGTACAAG	TGCAAGGTCT
4601	CCAACAAAGC	CCTCCCAGCC	CCCATCGAGA	AAACCATCTC	CAAAGCCAAA
4651	GGGCAGCCCC	GAGAACCACA	GGTGTACACC	CTGCCCCCAT	CCCGGGATGA
4701	GCTGACCAAG	AACCAGGTCA	GCCTGACCTG	CCTGGTCAAA	GGCTTCTATC
4751	CCAGCGACAT	CGCCGTGGAG	TGGGAGAGCA	ATGGGCAGCC	GGAGAACAAC
4801	TACAAGACCA	CGCCTCCCGT	GTTGGACTCC	GACGGCTCCT	TCTTCTCTTA
4851	CAGCAAGCTC	ACCGTGGACA	AGAGCAGGTG	GCAGCAGGGG	AACGTCTTCT
4901	CATGCTCCGT	GATGCATGAG	GCTCTGCACA	ACCACTACAC	GCAGAAGAGC
4951	CTCTCCCTGT	CTCCGGGTAA	ATGA		

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

1	MI	PARFAGVL	LALALILPGT	LCAEGTRGRS	STARCSLFGS	DFVNTFDGSM
51	Y	SFAGYCSYL	LAGGCQKRSF	SIIGDFQNGK	RVSLSVYLGE	FFDIHLFVNG
101	T	VTQGDQRV	MPYASKGLYL	ETEAGYYKLS	GEAYGFVARI	DGSGNFQVLL
151	S	DRYFNKTCG	LCGNFNIFAE	DDFMTQEGTL	TSDPYDFANS	WALSSGEQWC
201	E	RASPPSSSC	NISSGEMQKG	LWEQCQLLKS	TSVFARCHPL	VDPEPFVALC
251	E	KTLCECAGG	LECACPALLE	YARTCAQEGM	VLYGWTDHSA	CSPVCPAGME
301	Y	RQVSPCAR	TCQSLHINEM	CQERCVDGCS	CPEGQLLDEG	LCVESTTEPC
351	V	HSGKRYPPG	TSLSRDCNTC	ICRNSQWICS	NEECPGECLV	TGQSHFKSFD
401	N	RYFTFSGIC	QYLLARDCQD	HSFSIVIETV	QCADDRDAVC	TRSVTVRLPG
451	L	HNSLVKCLKH	GAGVAMDGQD	IQLPLLKGD	RIQHTVTASV	RLSYGEDLQM
501	D	WDGRGRLLV	KLSPVYAGKT	CGLCGNYNGN	QGDDFLTPSG	LAEPRVEDFG
551	N	AWKHLHGDCQ	DLQKQHSDFC	ALNPRMTRFS	EEACAVLTSP	TFEACHRAVS
601	P	LYLRNCRY	DVCSCSDGRE	CLCGALASYA	AACAGRGVRV	AWREPGRCEL
651	N	CPKQOVYLO	CGTPCNLTCR	SLSYPDEECN	EACLEGCFCP	PGLYMDERGD
701	C	VPAKQPCPY	YDGEIFQPED	IFSDHHTMCY	CEDGFMHCTM	SGVPMGSLPD
751	A	VLSSPLSHR	SKRSLSCRPP	MVKLVCPADN	LRAEGLECTK	TCQNYDLECM
801	S	MGCVSGCLC	PPGMVRHENR	CVALERCPCF	HQGKEYAPGE	TVKIGCNTCV
851	C	RDRKWNCTD	HVCDATCSTI	GMAHYLTFDG	LKYLFPGECQ	YVLVQDYCGS
901	N	PGTFRILVG	NKGCSHPSVK	CKKRVITLVE	GGEIELFDGE	VNVKRPMKDE
951	T	HFEVVESGR	YIILLGKAL	SVVWRHLSI	SVVLKQTYQE	KVCGLCGNFD
1001	G	IQNNDLTSS	NLQVEEDPVD	FGNSWKVSSQ	CADTRKVPLD	SSPATCHNNI
1051	M	KQTMVDSSC	RILTSDFVQD	CNKLVDPPEY	LDVCIYDTCS	CESIGDCAAF
1101	C	TIAAYAHV	CAQHGVVVTW	RTATLCPQSC	EERNLRENGY	EAEWRYNSCA
1151	P	ACQVTCQHP	EPLACPVQCV	EGCHAHCPPG	KILDELLQTC	VDPEDCPVCE
1201	V	AGRRFASGK	KVTILNPSDPE	HCQICHCDVV	NLTCEACQEP	ISGAPTSESA
1251	T	PESGPGSEP	ATSGSETPGT	SESATPESGP	GSEPATSGSE	TPGTSESATP
1301	E	SGPGTSTEP	SEGSAPGSPA	GSPTSTEEGT	SESATPESGP	GSEPATSGSE
1351	T	PGTSESATP	ESGPGSPAGS	PTSTEEGSPA	GSPTSTEEGA	<b>SSGGGGSGGG</b>
1401	<b>SGGGGGSGGG</b>	<b>SGGGGGSGGG</b>	<b>SGGGGGSLVP</b>	<b>RSGGGDKTHT</b>	<b>CPPCPAPELL</b>	
1451	G	GPSVFLFPP	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF	NWYVDGVEVH
1501	N	AKTKPREEQ	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT
1551	I	SKAKQPRE	PQVYTLPPSR	DELTKNQVSL	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG
1601	Q	PENNYKTFP	PVLDSDGFF	LYSKLTVDKS	RWQQGNVFC	SVMHEALHNNH
1651	Y	TQKSLSLSP	GK*			

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

1	AT	GATTCTCTG	CCAGATTTGC	CGGGGTGCTG	CTTGCTCTGG	CCCTCATTTT
51	G	CCAGGGACC	CTTTGTGCAG	AAGGAACTCG	CGGCAGGTCA	TCCACGGCCC
101	G	ATGCAGCCT	TTTCGGAAGT	GACTTCGTCA	ACACCTTTGA	TGGGAGCATG
151	T	ACAGCTTTG	CGGGATACTG	CAGTTACCTC	CTGGCAGGGG	GCTGCCAGAA
201	A	CGCTCCTTC	TCGATTATTG	GGGACTTCCA	GAATGGCAAG	AGAGTGAGCC
251	T	CTCCGTGTA	TCTTGGGGAA	TTTTTTTGACA	TCCATTTGTT	TGTCAATGGT

301 ACCGTGACAC AGGGGGACCA AAGAGTCTCC ATGCCCTATG CCTCCAAAAGG  
351 GCTGTATCTA GAAACTGAGG CTGGGTACTA CAAGCTGTCC GGTGAGGCCT  
401 ATGGCTTTGT GGCCAGGATC GATGGCAGCG GCAACTTTCA AGTCCTGCTG  
451 TCAGACAGAT ACTTCAACAA GACCTGCGGG CTGTGTGGCA ACTTTAACAT  
501 CTTTGTCTGA GATGACTTTA TGACCCAAGA AGGGACCTTG ACCTCGGACC  
551 CTTATGACTT TGCCAACCTCA TGGGCTCTGA GCAGTGGAGA ACAGTGTGT  
601 GAACGGGCAT CTCCTCCCAG CAGCTCATGC AACATCTCCT CTGGGGAAAT  
651 GCAGAAGGGC CTGTGGGAGC AGTGCCAGCT TCTGAAGAGC ACCTCGGTGT  
701 TTGCCCGCTG CCACCCTCTG GTGGACCCCG AGCCTTTTGT GGCCCTGTGT  
751 GAGAAGACTT TGTGTGAGTG TGCTGGGGGG CTGGAGTGCG CCTGCCCTGC  
801 CCTCCTGGAG TACGCCCAGG CCTGTGCCCA GGAGGGAATG GTGCTGTACG  
851 GCTGGACCGA CCACAGCGCG TGCAGCCCAG TGTGCCCTGC TGGTATGGAG  
901 TATAGGCAGT GTGTGTCCCC TTGCGCCAGG ACCTGCCAGA GCCTGCACAT  
951 CAATGAAATG TGTCAGGAGC GATGCGTGGA TGGCTGCAGC TGCCCTGAGG  
1001 GACAGCTCCT GGATGAAGGC CTCTGCGTGG AGAGCACCGA GTGTCCCTGC  
1051 GTGCATTCCG GAAAGCGCTA CCCTCCCAGG ACCTCCCTCT CTCGAGACTG  
1101 CAACACCTGC ATTTGCCGAA ACAGCCAGTG GATCTGCAGC AATGAAAGAT  
1151 GTCCAGGGGA GTGCCTTGTC ACTGGTCAAT CCCACTTCAA GAGCTTTGAC  
1201 AACAGATACT TCACCTTCAG TGGGATCTGC CAGTACCTGC TGGCCCAGGA  
1251 TTGCCAGGAC CACTCCTTCT CCATTGTCAT TGAGACTGTC CAGTGTGCTG  
1301 ATGACCCGCA CGCTGTGTGC ACCCGCTCCG TCACCGTCCG GCTGCCTGGC  
1351 CTGCACAACA GCCTTGTGAA ACTGAAGCAT GGGGCAGGAG TTGCCATGGA  
1401 TGGCCAGGAC ATCCAGCTCC CCCTCCTGAA AGGTGACCTC CGCATCCAG  
1451 ATACAGTGAC GGCCTCCGTG CGCCTCAGCT ACGGGGAGGA CCTGCAGATG  
1501 GACTGGGATG GCCGCGGGAG GCTGCTGGTG AAGCTGTCCC CCGTCTATGC  
1551 CGGGAAGACC TGCGGCCTGT GTGGGAATTA CAATGGCAAC CAGGGCGACG  
1601 ACTTCCTTAC CCCCTCTGGG CTGGCAGGAG CCCGGGTGGA GGACTTCGGG  
1651 AACGCCTGGA AGCTGCACGG GGACTGCCAG GACCTGCAGA AGCAGCACAG  
1701 CGATCCCTGC GCCCTCAACC CGCGCATGAC CAGGTTCTCC GAGGAGGCGT  
1751 GCGCGGTCTT GACGTCCCCC ACATTGAGG CCTGCCATCG TGCCGTGAGC  
1801 CCGCTGCCCT ACCTGCGGAA CTGCCGCTAC GACGTGTGCT CCTGCTCGGA  
1851 CGGCCGCGAG TGCCTGTGCG GCGCCCTGGC CAGCTATGCC GCGGCTGCG  
1901 CGGGGAGAGG CGTGCGCGTC GCGTGGCGCG AGCCAGGCCG CTGTGAGCTG  
1951 AACTGCCCCG AAGGCCAGGT GTACCTGCAG TGCGGGACCC CCTGCAACCT  
2001 GACCTGCCGC TCTCTCTCTT ACCCGGATGA GGAATGCAAT GAGGCCTGCC  
2051 TGGAGGGCTG CTTCTGCCCC CCAGGGCTCT ACATGGATGA GAGGGGGGAC  
2101 TGCCTGCCCA AGGCCAGTG CCCCTGTTAC TATGACGGTG AGATCTTCCA  
2151 GCCAGAAGAC ATCTTCTCAG ACCATCACAC CATGTGCTAC TGTGAGGATG  
2201 GCTTTCATGCA CTGTACCATG AGTGGAGTCC CCGGAAGCTT GCTGCCTGAC  
2251 GCTGTCTCTA GCAGTCCCCT GTCTCATCGC AGCAAAAAGGA CCCTATCCTG  
2301 TCGGCCCCCC ATGGTCAAGC TGGTGTGTCC CGCTGACAAC CTGCGGGCTG  
2351 AAGGGCTCGA GTGTACCAAA ACGTGCCAGA ACTATGACCT GGAGTGCATG  
2401 AGCATGGGCT GTGTCTCTGG CTGCCTCTGC CCCCCGGGCA TGGTCCGGCA  
2451 TGAGAACAGA TGTGTGGCCC TGGAAAAGTG TCCCTGCTTC CATCAGGGCA  
2501 AGGAGTATGC CCCTGGAGAA ACAGTGAAGA TTGGCTGCAA CACTTGTGTC  
2551 TGTGCGGACC GGAAGTGGAA CTGCACAGAC CATGTGTGTG ATGCCACGTG  
2601 CTCCACGATC GGCATGGCCC ACTACCTCAC CTTGACGGG CTCAAATACC  
2651 TGTTCCCCGG GGAGTGCCAG TACGTTCTGG TGCAGGATTA CTGCGGCAGT  
2701 AACCTGGGA CCTTTCGGAT CCTAGTGGGG AATAAGGGAT GCAGCCACCC  
2751 CTCAGTAAA TGCAAGAAAC GGGTCACCAT CCTGGTGGAG GGAGGAGAGA  
2801 TTGAGCTGTT TGACGGGGAG GTGAATGTGA AGAGGCCCAT GAAGGATGAG  
2851 ACTACTTTG AGGTGGTGGG GTCTGGCCGG TACATCATTC TGCTGCTGGG  
2901 CAAAGCCCTC TCCGTGGTCT GGGACCCGCA CCTGAGCATC TCCGTGGTCC  
2951 TGAAGCAGAC ATACCAGGAG AAAGTGTGTG GCCTGTGTGG GAATTTTGTG  
3001 GGCATCCAGA ACAATGACCT CACCAGCAGC AACCTCCAAG TGGAGGAAGA  
3051 CCCTGTGGAC TTTGGGAAGT CCTGGAAAGT GAGCTGCAG TGTGCTGACA  
3101 CCAGAAAAGT GCCTCTGGAC TCATCCCCTG CCACCTGCCA TAACAACATC  
3151 ATGAAGCAGA CGATGGTGGG TTCTCCTGT AGAATCCTTA CCAGTGACGT  
3201 CTTCCAGGAC TGCAACAAGC TGGTGGACCC CGAGCCATAT CTGATGTCT  
3251 GCATTTACGA CACCTGCTCC TGTGAGTCCA TTGGGGACTG CGCCGCATTC  
3301 TGCGACACCA TTGCTGCCTA TGCCACGTG TGTGCCCAGC ATGGCAAGGT  
3351 GGTGACCTGG AGGACGGCCA CATTGTGCCC CCAGAGCTGC GAGGAGAGGA  
3401 ATCTCCGGGA GAACGGGTAT GAGGCTGAGT GGCCTATAA CAGCTGTGCA  
3451 CCTGCCTGTC AAGTCACGTG TCAGCACCTT GAGCCACTGG CCTGCCCTGT

3501 GCAGTGTGTG GAGGGCTGCC ATGCCCCACTG CCCTCCAGGG AAAATCCTGG  
3551 ATGAGCTTTT GCAGACCTGC GTTGACCCTG AAGACTGTCC AGTGTGTGAG  
3601 GTGGCTGGCC GCGGTTTTGC CTCAGGAAAG AAAGTCACCT TGAATCCCAG  
3651 TGACCTGTAG CACTGCCAGA TTTGCCACTG TGATGTTGTC AACCTCACCT  
3701 GTGAAGCCTG CCAGGAGCCG ATATCGGGCG CGCCAACATC AGAGAGGCC  
3751 ACCCCTGAAA GTGGTCCCGG GAGCGAGCCA GCCACATCTG GCTCGGAAAC  
3801 GCCAGGCACA AGTGAGTCTG CAACTCCCGA GTCCGGACCT GGCTCCGAGC  
3851 CTGCCACTAG CGGCTCCGAG ACTCCGGGAA CTTCCGAGAG CGCTACACCA  
3901 GAAAGCGGAC CCGGAACCAG TACCGAACCT AGCGAGGGCT CTGCTCCGGG  
3951 CAGCCCAGCC GGCTCTCCTA CATCCACGGA GGAGGGCACT TCCGAATCCG  
4001 CCACCCCGGA GTCAGGGCCA GGATCTGAAC CCGCTACCTC AGGCAGTGAG  
4051 ACGCCAGGAA CGAGCGAGTC CGCTACACCG GAGAGTGGGC CAGGGAGCCC  
4101 TGCTGGATCT CCTACGTCCA CTGAGGAAGG GTCACCAGCG GGCTCGCCCA  
4151 CCAGCACTGA AGAAGGTGCC TCGATATCTG ACAAGAACAC TGGTGATTAT  
4201 TACGAGGACA GTTATGAAGA TATTTTCAGCA TACTTGCTGA GTAAAAACAA  
4251 TGCCATTGAA CCAAGAAGCT TCTCTGACAA AACTCACACA TGCCACCCTG  
4301 GCCCAGCTCC AGAACTCCTG GCGCGACCGT CAGTCTTCTT CTTCCCCCCA  
4351 AAACCCAAGG ACACCCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT  
4401 GGTGGTGGAC GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG  
4451 TGGACGGCGT GGAGGTGCAT AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG  
4501 TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTCAAGTTC CTTACCGTCC TGACCAGGA  
4551 CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC AAAGCCCTCC  
4601 CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGCA CCCCCAGAA  
4651 CCACAGGTGT ACACCCCTGCC CCCATCCCGG GATGAGCTGA CCAAGAACCA  
4701 GGTCAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG  
4751 TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT  
4801 CCCGTGTTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA AGCTCACCGT  
4851 GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC  
4901 ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG  
4951 GGTAAATGA

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

1 MIPARFAGVL LALALILPQT LCAEGRGRS STARCSLFGS DFVNTFDGSM  
51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG  
101 TVTQGDQRVV MPYASKGLYL ETEAGYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL  
151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC  
201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC  
251 EKTLCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDHSA CSPVCPAGME  
301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTECPC  
351 VHS GKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD  
401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIVTV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG  
451 LHNSLVKLLK GAGVAMDGQD IQLPLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQM  
501 DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG  
551 NAWKLGHDQC DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS  
601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCEL  
651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD  
701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFS DHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD  
751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM  
801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV  
851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ YVLVQDYCGS  
901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE VNVKRPKDE  
951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD  
1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI  
1051 MKQTMVDSSC RILTSDFVQD CNKLVDP EPY LDVCIYDTCS CESIGDCAAF  
1101 CDTIAAYAHV CAQH GKVV TW RTATLCPQSC EERNLRENGY EAEWRYNSCA  
1151 PACQVTCQHP EPLACPVQCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE  
1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGAPTSESA  
1251 TPESGPGSEP ATSGSETPGT SESATPESGP GSEPATSGSE TPGTSESATP  
1301 ESGPGTSTEP SEGSAPGSPA GSPTSTEEGT SESATPESGP GSEPATSGSE  
1351 TPGTSESATP ESGPGSPAGS PTSTEEGSPA GSPTSTEEGA SIS**DKNTGDY**  
1401 **YEDSYEDISA YLLSKNNAIE PRSFS**DKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP

1451	KPKDTLMISR	TPEVTCVVVD	VSHEDPEVKF	NWYVDGVEVH	NAKTKPREEQ
1501	YNSTYRVVSV	LTVLHQDWLN	GKEYKCKVSN	KALPAPIEKT	ISKAKGQPRE
1551	PQVYTLPPSR	DELTKNQVSL	TCLVKGFYPS	DIAVEWESNG	QPENNYKTTT
1601	PVLDSDDGSFF	LYSKLTVDKS	RWQQGNVFS	SVMHEALHNH	YTQKSLSLSP
1651	GK*				

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

1 ATGATTCCTG CCAGATTTGC CGGGGTGCTG CTTGCTCTGG CCCTCATTTT

51	GCCAGGGACC	CTTTGTGCAG	AAGGAACTCG	CGGCAGGTCA	TCCACGGCCC
101	GATGCAGCCT	TTTCGGAAGT	GACTTCGTCA	ACACCTTTGA	TGGGAGCATG
151	TACAGCTTTG	CGGGATACTG	CAGTTACCTC	CTGGCAGGGG	GCTGCCAGAA
201	ACGCTCCTTC	TCGATTATTG	GGGACTTCCA	GAATGGCAAG	AGAGTGAGCC
251	TCTCCGTGTA	TCTTGGGGAA	TTTTTTGACA	TCCATTTGTT	TGTCAATGGT
301	ACCGTGACAC	AGGGGGACCA	AAGAGTCTCC	ATGCCCTATG	CCTCCAAAGG
351	GCTGTATCTA	GAAACTGAGG	CTGGTACTA	CAAGCTGTCC	GGTAGGCCCT
401	ATGGCTTTGT	GGCCAGGATC	GATGGCAGCG	GCAACTTTCA	AGTCCCTGTG
451	TCAGACAGAT	ACTTCAACAA	GACCTGCGGG	CTGTGTGGCA	ACTTTAACAT
501	CTTTGCTGAA	GATGACTTTA	TGACCCAAGA	AGGGACCTTG	ACCTCGGACC
551	CTTATGACTT	TGCCAACTCA	TGGGCTCTGA	GCAGTGGAGA	ACAGTGGTGT
601	GAACGGGCAT	CTCCTCCAG	CAGCTCATGC	AACATCTCCT	CTGGGGAAAT
651	GCAGAAGGGC	CTGTGGGAGC	AGTGCCAGCT	TCTGAAGAGC	ACCTCGGTGT
701	TTGCCCGCTG	CCACCCTCTG	GTGGACCCG	AGCCTTTTGT	GGCCTGTGT
751	GAGAAGACTT	TGTGTGAGTG	TGCTGGGGGG	CTGGAGTGG	CCTGCCCTGC
801	CCTCCTGGAG	TACGCCCGGA	CCTGTGCCCA	GGAGGGAATG	GTGCTGTACG
851	GCTGGACCGA	CCACAGCGCG	TGCAGCCCAG	TGTGCCCTGC	TGGTATGGAG
901	TATAGGCAGT	GTGTGTCCCC	TTGCGCCAGG	ACCTGCCAGA	GCCTGCACAT
951	CAATGAAATG	TGTCAGGAGC	GATGCGTGGA	TGGCTGCAGC	TGCCCTGAGG
1001	GACAGCTCCT	GGATGAAGGC	CTCTGCGTGG	AGAGCACCGA	GTGTCCCTGC
1051	GTGCATTCCG	GAAAGCGCTA	CCCTCCCGGC	ACCTCCCTCT	CTCGAGACTG
1101	CAACACCTGC	ATTTGCCGAA	ACAGCCAGTG	GATCTGCAGC	AATGAAGAAT
1151	GTCCAGGGGA	GTGCCTTGTC	ACTGGTCAAT	CCCCTTCAA	GAGCTTTGAC
1201	AACACATACT	TCACCTTCAG	TGGGATCTGC	CAGTACCTGC	TGGCCCGGGA
1251	TTGCCAGGAC	CACCTCTTCT	CTATTGTCT	TGAGACTGTC	CAGTGTGCTG
1301	ATGACC CGA	CGCTGTGTGC	ACCCGCTCCG	TCACCGTCCG	GCTGCCTGGC
1351	CTGCACAACA	GCCTTGTGAA	ACTGAAGCAT	GGGGCAGGAG	TTGCCATGGA
1401	TGGCCAGGAC	ATCCAGCTCC	CCCTCCTGAA	AGGTGACCTC	CGCATCCAGC
1451	ATACAGTGAC	GGCCTCCGTG	CGCCTCAGCT	ACGGGGAGGA	CCTGCAGATG
1501	GACTGGGATG	GCCGCGGGAG	GCTGCTGGTG	AAGCTGTCCC	CCGTCTATGC
1551	CGGGAAGACC	TGCGGCCTGT	GTGGGAATTA	CAATGGCAAC	CAGGGCGACG
1601	ACTTCCTTAC	CCCCTCTGGG	CTGGCGGAGC	CCCGGGTGG	GGACTTCGGG
1651	AACGCCTGGA	AGCTGCACGG	GGACTGCCAG	GACCTGCAGA	AGCAGCACAG
1701	CGATCCCTGC	GCCCTCAACC	CGCGCATGAC	CAGGTTCTCC	GAGGAGGCGT
1751	GCGCGGTCT	GACGTCCCCC	ACATTTCGAGG	CCTGCCATCG	TGCCGTGACG
1801	CCGCTGCCCT	ACCTGCGGAA	CTGCCGCTAC	GACGTGTGCT	CCTGCTCGGA
1851	CGGCCGCGAG	TGCCTGTGCG	GCGCCCTGGC	CAGCTATGCC	GCGGCCTGCG
1901	CGGGGAGAGG	CGTGCGCGTC	GCGTGGCGCG	AGCCAGGCCG	CTGTGAGCTG
1951	AACTGCCCCG	AAGGCCAGGT	GTACCTGCAG	TGCGGGACCC	CCTGCAACCT
2001	GACCTGCCCG	TCTCTCTCTT	ACCCGGATGA	GGAATGCAAT	GAGGCCTGCC
2051	TGGAGGGCTG	CTTCTGCCCT	CCAGGGCTCT	ACATGGATGA	GAGGGGGGAC
2101	TGCGTGCCCA	AGGCCAGATG	CCCTGTTAC	TATGACGGTG	AGATCTTCCA
2151	GCCAGAAGAC	ATCTTCTCAG	ACCATCACAC	CATGTGCTAC	TGTGAGGATG
2201	GCTTCATGCA	CTGTACCATG	AGTGGAGTCC	CCGGAAGCTT	GCTGCCTGAC
2251	GCTGTCTCTA	GCAGTCCCCC	GTCTCATCGC	AGCAAAAAGGA	GCCTATCCTG
2301	TCGGCCCCCC	ATGGTCAAGC	TGGTGTGTCC	CGCTGACAAC	CTGCGGGCTG
2351	AAGGGCTCGA	GTGTACCAA	ACGTGCCAGA	ACTATGACCT	GGAGTGCATG
2401	AGCATGGGCT	GTGTCTCTGG	CTGCCTCTGC	CCCCGGGCA	TGGTCCGGCA
2451	TGAGAACAGA	TGTGTGGCCC	TGGAAAGGTG	TCCCTGCTTC	CATCAGGGCA
2501	AGGAGTATGC	CCCTGGAGAA	ACAGTGAAGA	TTGGCTGCAA	CACCTGTGTC
2551	TGTGCGGACC	GGAAGTGGAA	CTGCACAGAC	CATGTGTGTG	ATGCCACGTG
2601	CTCCACGATC	GGCATGGCCC	ACTACCTCAC	CTTCGACGGG	CTCAAATACC
2651	TGTTCCCCCG	GGAGTGCCAG	TACGTTCTGG	TGCAGGATTA	CTGCGGCAGT
2701	AACCCTGGGA	CCTTTCGGAT	CCTAGTGGGG	AATAAGGGAT	GCAGCCACCC

2751 CTCAGTGAAA TGCAAGAAAC GGGTCACCAT CCTGGTGGAG GGAGGAGAGA  
2801 TTGAGCTGTT TGACGGGGAG GTGAATGTGA AGAGGCCCAT GAAGGATGAG  
2851 ACTCACTTTG AGGTGGTGGG GTCTGGCCGG TACATCATTC TGCTGCTGGG  
2901 CAAAGCCCTC TCCGTGGTCT GGGACCGCCA CCTGAGCATC TCCGTGGTCC  
2951 TGAAGCAGAC ATACCAGGAG AAAGTGTGTG GCCTGTGTGG GAATTTTGAT  
3001 GGCATCCAGA ACAATGACCT CACCAGCAGC AACCTCCAAG TGGAGGAAGA  
3051 CCCTGTGGAC TTTGGGAACT CCTGGAAAGT GAGCTCGCAG TGTGCTGACA  
3101 CCAGAAAAGT GCCTCTGGAC TCATCCCCTG CCACCTGCCA TAACAACATC  
3151 ATGAAGCAGA CGATGGTGGG TTCCTCCTGT AGAATCCTTA CCAGTGACGT  
3201 CTTCCAGGAC TGCAACAAGC TGGTGGACCC CGAGCCATAT CTGGATGTCT  
3251 GCATTTACGA CACCTGCTCC TGTGAGTCCA TTGGGGACTG CGCCGCATTC  
3301 TGCACACCA TTGCTGCCTA TGCCACGTG TGTGCCCAGC ATGGCAAGGT  
3351 GGTGACCTGG AGGACGGCCA CATTGTGCCC CCAGAGCTGC GAGGAGAGGA  
3401 ATCTCCGGGA GAACGGGTAT GAGGCTGAGT GGCCTATAA CAGCTGTGCA  
3451 CCTGCCTGTC AAGTCACGTG TCAGCACCTT GAGCCACTGG CCTGCCCTGT  
3501 GCAGTGTGTG GAGGGCTGCC ATGCCCACTG CCCTCCAGGG AAAATCCTGG  
3551 ATGAGCTTTT GCAGACCTGC GTTGACCCTG AAGACTGTCC AGTGTGTGAG  
3601 GTGGCTGGCC GCGTTTTTGC CTCAGGAAAG AAAGTCACCT TGAATCCCAG  
3651 TGACCCTGAG CACTGCCAGA TTTGCCACTG TGATGTTGTC AACCTCACCT  
3701 GTGAAGCCTG CCAGGAGCCG ATATCGGGCG CGCCAACATC AGAGAGCGCC  
3751 ACCCCTGAAA GTGGTCCCGG GAGCGAGCCA GCCACATCTG GGTCCGAAAC  
3801 GCCAGGCACA AGTGAGTCTG CAACTCCCGA GTCCGGACCT GGCTCCGAGC  
3851 CTGCCACTAG CCGCTCCGAG ACTCCGGGAA CTTCCGAGAG CGCTACACCA  
3901 GAAAGCGGAC CCGGAACCAG TACCGAACCT AGCGAGGGCT CTGCTCCGGG  
3951 CAGCCCAGCC GGCTCTCCTA CATCCACGGA GGAGGGCACT TCCGAATCCG  
4001 CCACCCCGGA GTCAGGGCCA GGATCTGAAC CCGCTACCTC AGGCAGTGAG  
4051 ACGCCAGGAA CGAGCGAGTC CGCTACACCG GAGAGTGGGC CAGGGAGCCC  
4101 TGCTGGATCT CCTACGTCCA CTGAGGAAGG GTCACCAGCG GGCTCGCCCA  
4151 CCAGCACTGA AGAAGGTGCC TCGAGCGACA AAATCACAC ATGCCACCG  
4201 TGCCAGCTC CAGAACTCCT GGGCGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCC  
4251 AAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACATGCG  
4301 TGGTGGTGGG CGTGAGCCAC GAAGACCCTG AGGTCAAGTT CAACTGGTAC  
4351 GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAGCCGC GGGAGGAGCA  
4401 GTACAACAGC ACGTACCGTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTC CTGCACCAGG  
4451 ACTGGCTGAA TGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGCCCTC  
4501 CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA  
4551 ACCACAGGTG TACACCCTGC CCCCATCCCG GGATGAGCTG ACCAAGAACC  
4601 AGGTGAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTATCCAG CGACATCGCC  
4651 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG AACAACTACA AGACCACGCC  
4701 TCCCGTGTG GACTCCGACG CACTCTTCTT CCTCTACAG AAGCTCACCG  
4751 TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG  
4801 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG AAGAGCCTCT CCCTGTCTCC  
4851 GGGTAAATGA

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

1 MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFVNTFDGSM  
51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG  
101 TVTQGDQRV MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL  
151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC  
201 ERASPPSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC  
251 EKTLCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDHSA CSPVCPAGME  
301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTTEPC  
351 VHS GKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD  
401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIETV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG  
451 LHNSLVKCLKH GAGVAMDQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQM  
501 DWDGRGRLLV KLSVPYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG  
551 NAWKLGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS  
601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGRV AVREPGRCCEL  
651 NCPKQVYVYQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD  
701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFS DHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD  
751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM

801	SMGCVSGLCLC	PPGMVRHENR	CVALERCPCF	HQGKEYAPGE	TVKIGCNTCV
851	CRDRKWNCTD	HVCDATCSTI	GMAHYLTFDG	LKYLFPGECQ	YVLVQDYCGS
901	NPGTFRILVG	NKGC SHPSVK	CKKRVTILVE	GGEIELFDGE	VNVKRPMKDE
951	THFEVVESGR	YIILLGKAL	SVVWDRHLSI	SVVLKQTYQE	KVCGLCGNFD
1001	GIQNDMLTSS	NLQVEEDPVD	FGNSWKVSSQ	CADTRKVPD	SSPATCHNNI
1051	MKQTMVDSSC	RILTSDFVQD	CNKLVDPPEY	LDVCIYDTCS	CESIGDCAAF
1101	CDTIAAYAHV	CAQH GKVV TW	RTATLCPQSC	EERNLRENGY	EAEWRYNSCA
1151	PACQVTCQHP	EPLACPVQCV	EGCHAHCPPG	KILDELLQTC	VDPEDCPVCE
1201	VAGRRFASGK	KVTLNPSDPE	HCQICHCDVV	NLTCEACQEP	ISGAPTSESA
1251	TPESGPGSEP	ATSGSETPGT	SESATPESGP	GSEPATSGSE	TPGTSESATP
1301	ESGPGTSTEP	SEGSAPGSPA	GSPTSTEEGT	SESATPESGP	GSEPATSGSE
1351	TPGTSESATP	ESGPGSPAGS	PTSTEEGSPA	GSPTSTEEGA	SSDKTHTCPP
1401	CPAPPELLGGP	SVFLFPPKPK	DTLMI SRTPE	VTCVVVDVSH	EDPEVKFNWY
1451	VDGVEVHNAK	TKPREEQYNS	TYRVVSVLTV	LHQDWLNGKE	YKCKVSNKAL
1501	PAPIEKTISK	AKGQPREPQV	YTLPPSRDEL	TKNQVSLTCL	VKGFYPSDIA
1551	VEWESNGQPE	NNYKTT PPVL	DSDGSFFLYS	KLTVDKSRWQ	QGNVFC SVM
1601	HEALHNHYTQ	KSLSLSPGK*			

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

1	ATGCAAATAG	AGCTCTCCAC	CTGCTTCTTT	CTGTGCCTTT	TGCGATTCTG
51	CTTTAGTGCC	ACCAGAAGAT	ACTACCTGGG	TGCAGTGGAA	CTGTCATGGG
101	ACTATATGCA	AAGTGATCTC	GGTGAGCTGC	CTGTGGACGC	AAGATTTCTT
151	CCTAGAGTGC	CAAAATCTTT	TCCATTCAAC	ACCTCAGTCG	TGTACAAAAA
201	GACTCTGTTT	GTAGAATTC A	CGGATCACCT	TTTCAACATC	GCTAAGCCAA
251	GGCCACCCTG	GATGGGTCTG	CTAGGTCCTA	CCATCCAGGC	TGAGGTTTAT
301	GATACAGTGG	TCATTACACT	TAAGAACATG	GCTTCCCATC	CTGTCAGTCT
351	TCATGCTGTT	GGTGTATCCT	ACTGGAAAGC	TTCTGAGGGA	GCTGAATATG
401	ATGATCAGAC	CAGTCAAAGG	GAGAAAGAAG	ATGATAAAGT	CTCCCTGGT
451	GGAAGCCATA	CATATGTCTG	GAGGTCCCTG	AAAGAGAATG	GTCCAATGGC
501	CTCTGACCCA	CTGTGCCTTA	CCTACTCATA	TCTTTCTCAT	GTGGACCTGG
551	TAAAAGACTT	GAATTCAGGC	CTCAT TGGAG	CCCTACTAGT	ATGTAGAGAA
601	GGGAGTCTGG	CCAAGGAAAA	GACACAGACC	TTGCACAAAT	TTATACTACT
651	TTTTGCTGTA	TTTGATGAAG	GGAAAAGTTG	GCACTCAGAA	ACAAAAGAACT
701	CCTTGATGCA	GGATAGGGAT	GCTGCATCTG	CTCGGGCCTG	GCCTAAAATG
751	CACACAGTCA	ATGGTTATGT	AAACAGGTCT	CTGCCAGGTC	TGATTGGATG
801	CCACAGGAAA	TCAGTCTATT	GGCATGTGAT	TGGAATGGGC	ACCACTCCTG
851	AAGTGCACCTC	AATATTCCTC	GAAGGTCACA	CATTTCTTGT	GAGGAACCAT
901	CGCCAGGCTA	GCTTGGAAAT	CTCGCCAATA	ACTTTCTTTA	CTGCTCAAAC
951	ACTCTTGATG	GACCTTGGAC	AGTTTCTACT	GTTTTGT CAT	ATCTCTTCCC
1001	ACCAACATGA	TGGCATGGAA	GCTTATGTCA	AAGTAGACAG	CTGTCCAGAG
1051	GAACCCCAAC	TACGAATGAA	AAATAATGAA	GAAGCGGAAG	ACTATGATGA
1101	TGATCTTACT	GATTCTGAAA	TGGATGTGGT	CAGGTTTGAT	GATGACAAC T
1151	CTCCTTCTTT	TATCCAAATT	CGCTCAGTTG	CCAAGAAGCA	TCCTAAAAC T
1201	TGGGTACATT	ACATTGCTGC	TGAAGAGGAG	GACTGGGACT	ATGCTCCCTT
1251	AGTCCTCGCC	CCC GATGACA	GAAGTTATAA	AAGTCAATAT	TTGAACAATG
1301	GCCCTCAGCG	GATTGGTAGG	AAGTACAAAA	AAGTCCGATT	TATGGCATA C
1351	ACAGATGAAA	CCTTTAAGAC	TCTGGAAGCT	ATTCAGCATG	AATCAGGAAT
1401	CTTGGGACCT	TTACTTTTATG	GGGAAGTTGG	AGACACACTG	TTGATTATAT
1451	TTAAGAATCA	AGCAAGCAGA	CCATATAACA	TCTACCCTCA	CGGAATCACT
1501	GATGTCCGTC	CTTTGTATTC	AAGGAGATTA	CCAAAAGGTG	TAAAACATTT
1551	GAAGGATTTT	CCAATTCTGC	CAGGAGAAAT	ATTC AAATAT	AAATGGACAG
1601	TGACTGTAGA	AGATGGGCCA	ACTAAATCAG	ATCCTCGGTG	CCTGACCCGC
1651	TATTACTCTA	GTTTCGT TAA	TATGGAGAGA	GATCTAGCTT	CAGGACTCAT
1701	TGGCCCTCTC	CTCATCTGCT	ACAAAAGAATC	TGTAGATCAA	AGAGGAAACC
1751	AGATAATGTC	AGACAAGAGG	AATGTCATCC	TGTTTTCTGT	ATTTGATGAG
1801	AACCGAAGCT	GGTACCTCAC	AGAGAATATA	CAACGCTTTC	TCCCCAATCC
1851	AGCTGGAGTG	CAGCTTGAGG	ATCCAGAGTT	CCAAGCCTCC	AACATCATGC
1901	ACAGCATCAA	TGGCTATGTT	TTTGATAGTT	TGCAGTTGTC	AGTTTGT TTTG
1951	CATGAGGTGG	CATACTGGTA	CATTCTAAGC	ATTGGAGCAC	AGACTGACTT
2001	CCTTTCTGTC	TTCTTCTCTG	GATATACCTT	CAAACACAAA	ATGGTCTATG
2051	AAGACACACT	CACCCTATTC	CCATTCTCAG	GAGAAACTGT	CTTCATGTCTG

2101 ATGGAAAACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACAAC T CAGACTTTTCG  
2151 GAACAGAGGC ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAACA  
2201 CTGGTGATTA TTACGAGGAC AGTTATGAAG ATATTTTCAGC ATACTTGCTG  
2251 AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAAGC TTCTCTCAA ACGGCGCGCC  
2301 AGGTACCTCA GAGTCTGCTA CCCCAGAGT AGGGCCAGGA TCAGAGCCAG  
2351 CCACCTCCGG GTCTGAGACA CCCCAGACT CCGAGAGTGC CACCCCTGAG  
2401 TCCGGACCCG GGTCCGAGCC CGCCACTTCC GGCTCCGAAA CTCCCGGCAC  
2451 AAGCGAGAGC GCTACCCAG AGTCAGGACC AGGAACATCT ACAGAGCCCT  
2501 CTGAAGGCTC CGCTCCAGGG TCCCAGCCG GCAGTCCCAC TAGCACCAG  
2551 GAGGGAACCT CTGAAAGCGC CACACCCGAA TCAGGGCCAG GGTCTGAGCC  
2601 TGCTACCAGC GGCAGCGAGA CACCAGGCAC CTCTGAGTCC GCCACACCAG  
2651 AGTCCGGACC CGGATCTCCC GCTGGGAGCC CCACCTCCAC TGAGGAGGGA  
2701 TCTCCTGCTG GCTCTCCAAC ATCTACTGAG GAAGGTACCT CAACCGAGCC  
2751 ATCCGAGGGA TCAGTCCCG GCACCTCAGA GTCGGCAACC CCGAGTCTG  
2801 GACCCGGAAC TTCCGAAAGT GCCACACCAG AGTCCGGTCC CGGGACTTCA  
2851 GAATCAGCAA CACCCGAGT CCGCCCTGGG TCTGAACCCG CCACAAGTGG  
2901 TAGTGAGACA CCAGGATCAG AACCTGCTAC CTCAGGGTCA GAGACACCCG  
2951 GATCTCCGGC AGGCTCACCA ACCTCCACTG AGGAGGGCAC CAGCACAGAA  
3001 CCAAGCGAGG GCTCCGCACC CGGAACAAGC ACTGAACCCA GTGAGGGTTC  
3051 AGCACCCGGC TCTGAGCCGG CCACAAGTGG CAGTGAGACA CCCGGCACTT  
3101 CAGAGAGTGC CACCCCGAG AGTGGCCCAG GCACTAGTAC CGAGCCCTCT  
3151 GAAGGCAGTG CGCCAGCTC GAGCCACCA GTCTTGAAAC GCCATCAAGC  
3201 TGAAATAACT CGTACTACTC TTCAGTCAGA TCAAGAGGAA ATCGATTATG  
3251 ATGATACCAT ATCAGTTGAA ATGAAGAAG AAGATTTTGA CATTTATGAT  
3301 GAGGATGAAA ATCAGAGCCC CCGCAGCTTT CAAAAGAAAA CACGACACTA  
3351 TTTTATTGCT GCAGTGGAGA GGCTCTGGGA TTATGGGATG AGTAGTCCC  
3401 CACATGTTCT AAGAAACAGG GCTCAGAGTG GCAGTGTCCC TCAGTTC AAG  
3451 AAAGTTGTTT TCCAGGAATT TACTGATGGC TCCTTTACTC AGCCCTTATA  
3501 CCGTGGAGAA CTAATGAAC ATTTGGGACT CCTGGGGCCA TATATAAGAG  
3551 CAGAAGTTGA AGATAATATC ATGGTAACTT TCAGAAATCA GGCCTCTCGT  
3601 CCCTATTCTT TCTATTCTAG CCTTATTTCT TATGAGGAAG ATCAGAGGCA  
3651 AGGAGCAGAA CCTAGAAAAA ACTTTGTCAA GCCTAATGAA ACCAAAACCT  
3701 ACTTTTGGAA AGTGCAACAT CATATGGCAC CCACTAAAAGA TGAGTTTGAC  
3751 TGCAAAGCCT GGGCTTATTT CTCTGATGTT GACCTGGAAA AAGATGTGCA  
3801 CTCAGGCCTG ATTGGACCCC TTCTGGTCTG CCACACTAAC AACTG AACC  
3851 CTGCTCATGG GAGACAAGTG ACAGTACAGG AATTTGCTCT GTTTTTACC  
3901 ATCTTTGATG AGACAAAAG CTGGTACTTC ACTGAAAATA TGGAAAAGAA  
3951 CTGCAGGGCT CCCTGCAATA TCCAGATGGA AGATCCCACT TTTAAAGAGA  
4001 ATTATCGCTT CCATGCAATC AATGGCTACA TAATGGATAC ACTACCTGGC  
4051 TTAGTAATGG CTCAGGATCA AAGGATTCGA TGGTATCTGC TCAGCATGGG  
4101 CAGCAATGAA AACATCCATT CTATTCATTT CAGTGGACAT GTGTTCACTG  
4151 TACGAAAAAA AGAGGAGTAT AAAATGGCAC TGTACAATCT CTATCCAGGT  
4201 GTTTTTGAGA CAGTGGAAAT GTTACCATCC AAAGCTGGAA TTTGGCGGGT  
4251 GGAATGCCTT ATTGGCGAGC ATCTACATGC TGGGATGAGC AACTTTTTTC  
4301 TGGTGTACAG CAATAAGTGT CAGACTCCCC TGGGAATGGC TTCTGGACAC  
4351 ATTAGAGATT TTCAGATTAC AGCTTCAGGA CAATATGGAC AGTGGGCCCC  
4401 AAAGCTGGCC AGACTTCATT ATTCCGGATC AATCAATGCC TGGAGACCA  
4451 AGGAGCCCTT TTCTTGGATC AAGGTGGATC TGTTGGCACC AATGATTATT  
4501 CACGGCATCA AGACCCAGGG TGCCCGTCAG AAGTTCTCCA GCCTCTACAT  
4551 CTCTCAGTTT ATCATCATGT ATAGTCTTGA TGGGAAGAAG TGGCAGACTT  
4601 ATCGAGGAAA TTCCACTGGA ACCTTAATGG TCTTCTTTGG CAATGTGGAT  
4651 TCATCTGGGA TAAAACACAA TATTTTTAAC CCTCCAATTA TTGCTCGATA  
4701 CATCCGTTTG CACCCAACCTC ATTATAGCAT TCGCAGCACT CTTCGCATGG  
4751 AGTTGATGGG CTGTGATTTA AATAGTTGCA GCATGCCATT GGG AATGGAG  
4801 AGTAAAGCAA TATCAGATGC ACAGATTACT GCTTCATCCT ACTTTACCAA  
4851 TATGTTTGCC ACCTGGTCTC CTTCAAAGC TCGACTCAC CTCCAAGGGA  
4901 GAGTAATGC CTGGAGACCT CAGGTGAATA ATCCAAAAGA GTGGCTGCAA  
4951 GTGGACTTCC AGAAGACAAT GAAAGTCACA GGAGTAACTA CTCAGGGAGT  
5001 AAAATCTCTG CTTACCAGCA TGTATGTGAA GGAGTTCCTC ATCTCCAGCA  
5051 GTCAAGATGG CCATCAGTGG ACTCTCTTTT TTCAGAATGG CAAAAGTAAAG  
5101 GTTTTTCAGG GAAATCAAGA CTCCTTCACA CCTGTGGTGA ACTCTCTAGA  
5151 CCCACCGTTA CTGACTCGCT ACCTTCGAAT TCACCCCCAG AGTTGGGTGC  
5201 ACCAGATTGC CCTGAGGATG GAGGTTCTGG GCTGCGAGGC ACAGGACCTC  
5251 TACGACAAGA AACTGGTGA TTATTACGAG GACAGTTATG AAGATATTTT

5301	AGCATACTTG	CTGAGTAAAA	ACAATGCCAT	TGAACCAAGA	AGCTTCTCTG
5351	ACAAAACCTCA	CACATGCCCA	CCGTGCCCAG	CTCCAGAACT	CCTGGGCGGA
5401	CCGTCACTCT	TCCTCTTCCC	CCCAAAACCC	AAGGACACCC	TCATGATCTC
5451	CCGGACCCCT	GAGGTCACAT	GCGTGGTGGT	GGACGTGAGC	CACGAAGACC
5501	CTGAGGTCAA	GTTCAACTGG	TACGTGGACG	GCGTGGAGGT	GCATAATGCC
5551	AAGACAAAGC	CGCGGGAGGA	CGAGTACAAC	AGCACGTACC	GTGTGGTCAG
5601	CGTCCTCACC	GTCCTGCACC	AGGACTGGCT	GAATGGCAAG	GAGTACAAGT
5651	GCAAGGTCTC	CAACAAAGCC	CTCCCAGCCC	CCATCGAGAA	AACCATCTCC
5701	AAAGCCAAAG	GGCAGCCCCG	AGAACCACAG	GTGTACACCC	TGCCCCCATC
5751	CCGGGATGAG	CTGACCAAGA	ACCAGGTCAG	CCTGACCTGC	CTGGTCAAAG
5801	GCTTCTATCC	CAGCGACATC	GCCGTGGAGT	GGGAGAGCAA	TGGGCAGCCG
5851	GAGAACAAC	ACAAGACCAC	GCCTCCCGTG	TTGGACTCCG	ACGGCTCCTT
5901	CTTCCTCTAC	AGCAAGCTCA	CCGTGGACAA	GAGCAGGTGG	CAGCAGGGGA
5951	ACGTCTTCTC	ATGCTCCGTG	ATGCATGAGG	CTCTGCACAA	CCACTACACG
6001	CAGAAGAGCC	TCTCCCTGTC	TCCGGGTAAA	TGA	

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

1	ATRRYYLGAV	ELSWDYMQSD	LGELPVDARF	PPRVPKSFPP	NTSVVYKKTLL
51	FVEFTDHLFN	IAKPRPPWMG	LLGPTIQAEV	YDTVVITLKN	MASHPVSLHA
101	VGVSYWKASE	GAEYDDQTSQ	REKEDDKVFP	GGSHTYVWQV	LKENGPMASD
151	PLCLTYSYLS	HVDLVKDLNS	GLIGALLVCR	EGSLAKEKTQ	TLHKFILLFA
201	VFDEGKSWHS	ETKNSLMQDR	DAASARAWPK	MHTVNGYVNR	SLPGLIGCHR
251	KSVYWHVIGM	GTTPEVHSIF	LEGHTFLVRN	HRQASLEISP	ITFLTAQTLL
301	MDLGQFLLC	HISSHQHDGM	EAYVKVDSQP	EEPQLRMKNN	EEAEDYDDDL
351	TDSEMDVVR	DDDNSPSFIQ	IRSVAKKHPK	TWVHYIAAEE	EDWDYAPLVL
401	APDDRSYKSQ	YLNNGPQRIG	RKYKKVRFMA	YTDETFKTR	AIQHESGILG
451	PLLYGEVGD	LLIIFKNQAS	RPYNIYPHGI	TDVRPLYSRR	LPKGVKHLKD
501	FPILPGEIFK	YKWTVTVEDG	PTKSDPRCLT	RYYSSFVNME	RDLASGLIGP
551	LLICYKESVD	QRGNQIMSDK	RNVILFSVFD	ENRSWYLTE	IQRFLPNPAG
601	VQLEDPEFQA	SNIMHSINGY	VFDSLQLSVC	LHEVAYWYIL	SIGAQTDFLS
651	VFFSGYTFKH	KMVEDTLTL	FPFSGETVFM	SMENPLWIL	GCHNSDFRNR
701	GMTALLKVSS	CDKNTGDYYE	DSYEDISAYL	LSKNNAI EPR	SFSQNGAPGT
751	SESATPESGP	GSEPATSGSE	TPGTSESATP	ESGPGSEPAT	SGSETPGTSE
801	SATPESGPGT	STEPSEGSAP	GSPAGSPTST	EEGTSESATP	ESGPGSEPAT
851	SGSETPGTSE	SATPESGPGS	PAGSPTSTEE	GSPAGSPTST	EEGTSTEPSE
901	GSAPGTSESA	TPESGPGTSE	SATPESGPGT	SESATPESGP	GSEPATSGSE
951	TPGSEPATSG	SETPGSPAGS	PTSTEEGTST	EPSEGSAPGT	STEPSEGSAP
1001	GSEPATSGSE	TPGTSESATP	ESGPGTSTEP	SEGSAPASSP	PVLKRHQAEI
1051	TRTTLQSDQE	EIDYDDTISV	EMKKEDFDIY	DEDENQSPRS	FQKTRHYFI
1101	AAVERLWDYG	MSSSPHVLRN	RAQSGSVPQF	KKVVFQEFTE	GSFTQPLYRG
1151	ELNEHLGLLG	PYIRAEVEDN	IMVTFRNQAS	RPYSFYSSLI	SYEEDQRQGA
1201	EPRKNFVKPN	ETKTYFWKVQ	HHMAPTKDEF	DCKAWAYFSD	VDLEKDVHSG
1251	LIGPLLVCHT	NTLNPAHGRQ	VTVQEFALFF	TIFDETKSWY	FTENMERNCR
1301	APCNIQMEDP	TFKENYRFHA	INGYIMDTLP	GLVMAQDQRI	RWYLLSMGSN
1351	ENIHSIHFSG	HVFTVRKKEE	YKMALYNLYP	GVFETVEMLP	SKAGIWRVEC
1401	LIGEHLHAGM	STLFLVYSNK	CQTPPLGMSG	HIRDFQITAS	GQYGQWAPKL
1451	ARLHYSGSIN	AWSTKEPFSW	IKVDLLAPMI	IHGIKTQGAR	QKFSSLYISQ
1501	FIIMYSLDGG	KWQTYRGNST	GTLMVFFGNV	DSSGIKHNI F	NPPIIARYIR
1551	LHPHTYSIRS	TLRMELMGCD	LNSCSMPLGM	ESKAISDAQI	TASSYFTNMF
1601	ATWSPSKARL	HLQGRSNAWR	PQVNNPKEWL	QVDFQKTMKV	TGVTTQGVKS
1651	LLTSMYVKEF	LISSSQDGHQ	WTLFFQNGKV	KVFQGNQDSF	TPVVNSLDPP
1701	LLTRYLRIHP	QSWVHQIALR	MEVLGCEAQD	<b><u>LYDKNTGDYY</u></b>	<b><u>EDSYEDISAY</u></b>
1751	<b><u>LLSKNNAI E P</u></b>	<b><u>RSFS</u></b> DKTHTC	PPCPAPELLG	GPSVFLFPPK	PKDTLMISRT
1801	PEVTCVVVDV	SHEDPEVKFN	WYVDGVEVHN	AKTKPREEQY	NSTYRVVSVL
1851	TVLHQDWLNG	KEYKCKVSNK	ALPAPIEKTI	SKAKGQPREP	QVYTLPPSRD
1901	ELTKNQVSLT	CLVKGFYPSD	IAVEWESNGQ	PENNYKTTPP	VLDSGDSFFL
1951	YSKLTVDKSR	WQQGNVFSCS	VMHEALHNHY	TQKSLSLSPG	K*

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

1	ATGCA	AATAG	AGCTC	TCCAC	CTGCT	TCTTT	CTGTG	CCTTT	TGCGA	TTCTG
51	CTTTA	GTGCC	ACCAG	AAGAT	ACTAC	CTGGG	TGCAG	TGAA	CTGTC	ATGGG

101 ACTAT ATGCA AAGTG ATCTC GGTGA GCTGC CTGTG GACGC AAGAT TTCCT  
151 CCTAG AGTGC CAAAA TCTTT TCCAT TCAAC ACCTC AGTCG TGTAC AAAAA  
201 GACTC TGTTT GTAGA ATTCA CGGAT CACCT TTTCA ACATC GCTAA GCCAA  
251 GGCCA CCCTG GATGG GTCTG CTAGG TCCTA CCATC CAGGC TGAGG TTTAT  
301 GATAC AGTGG TCATT ACATT TAAGA ACATG GCTTC CCATC CTGTC AGTCT  
351 TCATG CTGTT GGTGT ATCCT AATGG AAAGC TTCTG AGGGA GCTGA ATATG  
401 ATGAT CAGAC CAGTC AAAGG GAGAA AGAAG ATGAT AAAGT CTTCC CTGGT  
451 GGAAG CCATA CATAT GTCTG GCAGG TCCTG AAAGA GAATG GTCCA ATGGC  
501 CTCTG ACCCA CTGTG CCTTA CCTAC TCATA TCTTT CTCAT GTGGA CCTGG  
551 TAAAA GACTT GAATT CAGGC CTCAT TGGAG CCCTA CTAGT ATGTA GAGAA  
601 GGGAG TCTGG CCAAG GAAAA GACAC AGACC TTGCA CAAAT TTATA CTACT  
651 TTTTG CTGTA TTTGA TGAAG GGAAA AGTTG GCACT CAGAA ACAA GAACT  
701 CCTTG ATGCA GGATA GGGAT GCTGC ATCTG CTCGG GCCTG GCCTA AAATG  
751 CACAC AGTCA ATGGT TATGT AAACA GGTCT CTGCC AGGTC TGATT GGATG  
801 CCACA GGAAA TCAGT CTATT GGCAT GTGAT TGGAA TGGGC ACCAC TCCTG  
851 AAGTG CACTC AATAT TCCTC GAAGG TCACA CATTT CTTGT GAGGA ACCAT  
901 CGCCA GGCTA GCTTG GAAAT CTCGC CAATA ACTTT CCTTA CTGCT CAAAC  
951 ACTCT TGATG GACCT TGGAC AGTTT CTA CTACT GTTTT GTCAT ATCTC TTCCC  
1001 ACCAA CATGA TGGCA TGGAA GCTTA TGTC AAGTA GACAG CTGTC CAGAG  
1051 GAACC CCAAC TACGA ATGAA AAATA ATGAA GAAGC GGAAG ACTAT GATGA  
1101 TGACT TTA CT GATT TGA TGGAT GTGGT CAGGT TTGAT GATGA CAACT  
1151 TCCTT TCCTT TATCC AAATT CGCTC AGTTG CCAAG AAGCA TCCTA AAAT  
1201 TGGGT ACATT ACATT GCTGC TGAAG AGGAG GACTG GGACT ATGCT CCCTT  
1251 AGTCC TCGCC CCCGA TGACA GAAGT TATAA AAGTC AATAT TTGAA CAATG  
1301 GCCCT CAGCG GATTG GTAGG AAGTA CAAAA AAGTC CGATT TATGG CATA C  
1351 ACAGA TGAAA CCTTT AAGAC TCGTG AAGCT ATTCA GCATG AATCA GGAAT  
1401 CTTGG GACCT TTA CT TTATG GGGAA GTTGG AGACA CACTG TTGAT TATAT  
1451 TTAAG AATCA AGCAA GCAGA CCATA TAACA TCTAC CCTCA CGGAA TCACT  
1501 GATGT CCGTC CTTTG TATTC AAGGA GATTA CCAA AGGTG TAAAA CATTT  
1551 GAAGG ATTTT CCAAT TCTGC CAGGA GAAAT ATTCA AATAT AAATG GACAG  
1601 TGACT GTAGA AGATG GGCCA ACTAA ATCAG ATCCT CGGTG CCTGA CCCGC  
1651 TATTA CTCTA GTTTC GTTAA TATGG AGAGA GATCT AGCTT CAGGA CTCAT  
1701 TGGCC CTCTC CTCAT CTGCT ACAA GAATC TGTAG ATCAA AGAGG AAACC  
1751 AGATA ATGTC AGACA AGAGG AATGT CATCC TGTTT TCTGT ATTTG ATGAG  
1801 AACCG AAGCT GGTAC CTCAC AGAGA ATATA CAACG CTTTC TCCCC AATCC  
1851 AGCTG GAGTG CAGCT TGAGG ATCCA GAGTT CCAAG CCTCC AACAT CATGC  
1901 ACAGC ATCAA TGGCT ATGTT TTTGA TAGTT TGCAG TTGTC AGTTT GTTTG  
1951 CATGA GGTGG CATA TGGTA CATT TAAGC ATTGG AGCAC AGACT GACTT  
2001 CCTTT CTGTC TTCTT CTCTG GATAT ACCTT CAAA ACAA ATGGT CTATG  
2051 AAGAC AACT CACCC TATTC CCATT CTCAG GAGAA ACTGT CTCA TTTCG  
2101 ATGGA AAACC CAGGT CTATG GATTC TGGGG TGCCA CAACT CAGAC TTTCCG  
2151 GAACA GAGGC ATGAC CGCCT TACTG AAGGT TTCTA GTTGT GACAA GAACA  
2201 CTGGT GATTA TTACG AGGAC AGTTA TGAAG ATATT TCAGC ATACT TGCTG  
2251 AGTAA AAACA ATGCC ATTGA ACCAA GAAGC TTCTC TCAAA ACGGC GCGCC  
2301 AGGTA CCTCA GAGTC TGCTA CCCCC GAGTC AGGGC CAGGA TCAGA GCCAG  
2351 CCACC TCCGG GTCTG AGACA CCGGG GACTT CCGAG AGTGC CACCC CTGAG  
2401 TCCGG ACCCG GGTCC GAGCC CGCCA CTTCC GGCTC CGAAA CTCCC GGCAC  
2451 AAGCG AGAGC GCTAC CCCAG AGTCA GGACC AGGAA CATCT ACAGA GCCCT  
2501 CTGAA GGCTC CGCTC CAGGG TCCCC AGCCG GCAGT CCCAC TAGCA CCGAG  
2551 GAGGG AACCT CTGAA AGCGC CACAC CCGAA TCAGG GCCAG GTCT GAGCC  
2601 TGCTA CCAGC GGCAG CGAGA CACCA GGCAC CTCTG AGTCC GCCAC ACCAG  
2651 AGTCC GGACC CGGAT CTCCC GCTGG GAGCC CCACC TCCAC TGAGG AGGGA  
2701 TCTCC TGCTG GCTCT CCAAC ATCTA CTGAG GAAGG TACCT CAACC GAGCC  
2751 ATCCG AGGGA TCAGC TCCCG GCACC TCAGA GTCGG CAACC CCGGA GTCTG  
2801 GACCC GGAAC TTCCG AAAGT GCCAC ACCAG AGTCC GGTCC CGGGA CTCA  
2851 GAATC AGCAA CACCC GAGTC CGGCC CTGGG TCTGA ACCCG CCACA AGTGG  
2901 TAGTG AGACA CCAGG ATCAG AACCT GCTAC CTCAG GGTCA GAGAC ACCCG  
2951 GATCT CCGGC AGGCT CACCA ACCTC CACTG AGGAG GGCAC CAGCA CAGAA  
3001 CCAAG CGAGG GCTCC GCACC CCGAA CAAGC ACTGA ACCCA GTGAG GTTTC  
3051 AGCAC CCGGC TCTGA GCCGG CCACA AGTGG CAGTG AGACA CCGGG CACTT  
3101 CAGAG AGTGC CACCC CCGAG AGTGG CCCAG GCACT AGTAC CGAGC CCTCT  
3151 GAAGG CAGTG CGCCA GCCTC GAGCC CACCA GTCTT GAAAC GCCAT CAAGC  
3201 TGAAA TAACT CGTAC TACTC TTCAG TCAGA TCAAG AGGAA ATCGA TTATG  
3251 ATGAT ACCAT ATCAG TTGAA ATGAA GAAGG AAGAT TTTGA CATTT ATGAT

3301 GAGGA TGAAA ATCAG AGCCC CCGCA GCTTT CAAAA GAAAA CACGA CACTA  
 3351 TTTTA TTGCT GCAGT GGAGA GGCTC TGGGA TTATG GGATG AGTAG CTCCC  
 3401 CACAT GTTCT AAGAA ACAGG GCTCA GAGTG GCAGT GTCCC TCAGT TCAAG  
 3451 AAAGT TGTTT TCCAG GAATT TACTG ATGGC TCCTT TACTC AGCCC TTATA  
 3501 CCGTG GAGAA CTAAA TGAAC ATTTG GGAAT CCTGG GGCCA TATAT AAGAG  
 3551 CAGAA GTTGA AGATA ATATC ATGGT AACTT TCAGA AATCA GGCCT CTCGT  
 3601 CCCTA TTCCT TCTAT TCTAG CCTTA TTTCT TATGA GGAAG ATCAG AGGCA  
 3651 AGGAG CAGAA CCTAG AAAAA ACTTT GTCAA GCCTA ATGAA ACCAA AACTT  
 3701 ACTTT TGGAA AGTGC AACAT CATAT GGCAC CCACT AAAGA TGAGT TTGAC  
 3751 TGCAA AGCCT GGGCT TATTT CTCTG ATGTT GACCT GGAAA AAGAT GTGCA  
 3801 CTCAG GCCTG ATTGG ACCCC TTCTG GTCTG CCACA CTAAC ACACT GAACC  
 3851 CTGCT CATGG GAGAC AAGTG ACAGT ACAGG AATTT GCTCT GTTTT TCACC  
 3901 ATCTT TGATG AGACC AAAAG CTGGT ACTTC ACTGA AAATA TGGAA AGAAA  
 3951 CTGCA GGGCT CCCTG CAATA TCCAG ATGGA AGATC CCACT TTTAA AGAGA  
 4001 ATTAT CGCTT CCATG CAATC AATGG CTACA TAATG GATAC ACTAC CTGGC  
 4051 TTAGT AATGG CTCAG GATCA AAGGA TTCGA TGGTA TCTGC TCAGC ATGGG  
 4101 CAGCA ATGAA AACAT CCATT CTATT CATTT CAGTG GACAT GTGTT CACTG  
 4151 TACGA AAAAA AGAGG AGTAT AAAAT GGCAC TGTAC AATCT CTATC CAGGT  
 4201 GTTTT TGAGA CAGTG GAAAT GTTAC CATCC AAAGC TGGAA TTTGG CGGGT  
 4251 GGAAT GCCTT ATTGG CGAGC ATCTA CATGC TGGGA TGAGC ACACT TTTTC  
 4301 TGGTG TACAG CAATA AGTGT CAGAC TCCCC TGGGA ATGGC TTCTG GACAC  
 4351 ATTAG AGATT TTCAG ATTAC AGCTT CAGGA CAATA TGGC AGTG GCCCC  
 4401 AAAGC TGGCC AGACT TCATT ATTCC GGATC AATCA ATGCC TGGAG CACCA  
 4451 AGGAG CCCTT TTCTT GGATC AAGGT GGATC TGTTG GCACC AATGA TTATT  
 4501 CACGG CATCA AGACC CAGGG TGCCC GTCAG AAGTT CTCCA GCCTC TACAT  
 4551 CTCTC AGTTT ATCAT CATGT ATAGT CTTGA TGGGA AGAAG TGGCA GACTT  
 4601 ATCGA GGAAA TTCCA CTGGA ACCTT AATGG TCTTC TTTGG CAATG TGGAT  
 4651 TCATC TGGGA TAAAA CACAA TATTT TTAAC CCTCC AATTA TTGCT CGATA  
 4701 CATCC GTTTG CACCC AACTC ATTAT AGCAT TCGCA GCACT CTTCG CATGG  
 4751 AGTTG ATGGG CTGTG ATTTA AATAG TTGCA GCATG CCATT GGGAA TGGAG  
 4801 AGTAA AGCAA TATCA GATGC ACAGA TTAAT GCTTC ATCCT ACTTT ACCAA  
 4851 TATGT TTGCC ACCTG GTCTC CTTCA AAAGC TCGAC TTCAC CTCCA AGGGA  
 4901 GGAGT AATGC CTGGA GACCT CAGGT GAATA ATCCA AAAGA GTGGC TGCAA  
 4951 GTGGA CTTCC AGAAG ACAAT GAAAG TCACA GGAGT AACTA CTCAG GGAGT  
 5001 AAAAT CTCTG CTTAC CAGCA TGTAT GTGAA GGAGT TCCTC ATCTC CAGCA  
 5051 GTCAA GATGG CCATC AGTGG ACTCT CTTTT TTCAG AATGG CAAAAG TAAAG  
 5101 GTTTT TCAGG GAAAT CAAGA CTCCT TCACA CCTGT GGTGA ACTCT CTAGA  
 5151 CCCAC CGTTA CTGAC TCGCT ACCTT CGAAT TCACC CCCAG AGTTG GGTGC  
 5201 ACCAG ATTGC CCTGA GGATG GAGT TCTGG GCTGC GAGGC ACAGG ACCTC  
 5251 TACGA CAAAA CTCAC ACATG CCCAC CGTGC CCAGC TCCAG AACTC CTGGG  
 5301 CGGAC CGTCA GTCTT CCTCT TCCCC CCAAA ACCCA AGGAC ACCCT CATGA  
 5351 TCTCC CGGAC CCCTG AGGTC ACATG CGTGG TGGTG GACGT GAGCC ACGAA  
 5401 GACCC TGAGG TCAAG TTCAA CTGGT ACGTG GACGG CGTGG AGGTG CATAA  
 5451 TGCCA AGACA AAGCC GCGGG AGGAG CAGTA CAACA GCACG TACCG TGTGG  
 5501 TCAGC GTCCT CACCG TCCTG CACCA GGACT GGCTG AATGG CAAGG AGTAC  
 5551 AAGTG CAAGG TCTCC AACAA AGCCC TCCCA GCCCC CATCG AGAAA ACCAT  
 5601 CTCCA AAGCC AAAGG GCAGC CCCGA GAACC ACAGG TGTAC ACCCT GCCCC  
 5651 CATCC CGGGA TGAGC TGACC AAGAA CCAGG TCAGC CTGAC CTGCC TGGTC  
 5701 AAAGG CTTCT ATCCC AGCGA CATCG CCGTG GAGTG GGAGA GCAAT GGGCA  
 5751 GCCGG AGAAC AACTA CAAGA CCACG CCTCC CGTGT TGGAC TCCGA CGGCT  
 5801 CCTTC TTCCT CTACA GCAAG CTCAC CGTGG ACAAG AGCAG GTGGC AGCAG  
 5851 GGGAA CGTCT TCTCA TGCTC CGTGA TGCAT GAGGC TCTGC ACAAC CACTA  
 5901 CACGC AGAAG AGCCT CTCCC TGTCT CCGGG TAAAT GA

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

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYLGAIVE LSWDYMQSDL GELPVDARFP  
 51 PRVPKSFPFN TSVVYKKTFL VFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY  
 101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG  
 151 GSHTYVWQVL KENGPMSDF LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE  
 201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM  
 251 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH

301 RQASLEISPI TFLTAQTLIM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE  
351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT  
401 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY  
451 TDETFKTRIA IQHESGILGP LLYGEVGDITL LIIFKNQASR PYNIYPHGIT  
501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR  
551 YYSSFLVNER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE  
601 NRSWYLTEINI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL  
651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS  
701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL  
751 SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET PGTSESATPE  
801 SGPGESEPTS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG SPAGSPTSTE  
851 EGTSESATPE SGPGESEPTS GSETPGTSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG  
901 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGTS  
951 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP TSTEEGTSTE  
1001 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE SGPSTSTEPS  
1051 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD  
1101 EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVPOFK  
1151 KVVVFQFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR  
1201 PYSFYSSLIS YEEDQRQGA PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD  
1251 CKAWAYFSDV DLEKDVHSGI IGPLLVCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT  
1301 IFDETKSWYF TENMERNCR PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG  
1351 LVMAQDQRIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG  
1401 VFTEVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC QTPLMASGH  
1451 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMI  
1501 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD  
1551 SSGIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL NSCSMPLGME  
1601 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ  
1651 VDFQKTMKVT GVTTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK  
1701 VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL  
1751 YDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE  
1801 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY  
1851 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPVY TLPPSRDELTA KNQVSLTCLV  
1901 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ  
1951 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK\*

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

1 ATGAT TCCTG CCAGA TTTGC CGGGG TGCTG CTTGC TCTGG CCCTC ATTTT  
51 GCCAG GGACC CTTTG TGACG AAGGA ACTCG CGGCA GGTCA TCCAC GGCC  
101 GATGC AGCCT TTTTG GAAGT GACTT CGTCA ACACC TTTGA TGGGA GCATG  
151 TACAG CTTTG CGGGA TACTG CAGTT ACCTC CTGGC AGGGG GCTGC CAGAA  
201 ACGCT CCTTC TCGAT TATTG GGGAC TTCCA GAATG GCAAG AGAGT GAGCC  
251 TCTCC GTGTA TCTTG GGGAA TTTTT TGACA TCCAT TTGTT TGTA ATGGT  
301 ACCGT GACAC AGGGG GACCA AAGAG TCTCC ATGCC CTATG CCTCC AAGG  
351 GCTGT ATCTA GAAAC TGAGG CTGGG TACTA CAAGC TGTCG GGTGA GGCC  
401 ATGGC TTTGT GGCCA GGATC GATGG CAGCG GCAAC TTTCA AGTCC TGCTG  
451 TCAGA CAGAT ACTTC AACAA GACCT GCGGG CTGTG TGGCA ACTTT AACAT  
501 CTTTG CTGAA GATGA CTTTA TGACC CAAGA AGGGA CCTTG ACCTC GGACC  
551 CTTAT GACTT TGCCA ACTCA TGGGC TCTGA GCAGT GGAGA ACAGT GGTGT  
601 GAACG GGCAT CTCCT CCCAG CAGCT CATGC AACAT CTCCT CTGGG GAAAT  
651 GCAGA AGGGC CTGTG GGAGC AGTGC CAGCT TCTGA AGAGC ACCTC GGTGT  
701 TTGCC CGCTG CCACC CTCTG GTGGA CCCCAG AGCCT TTTGT GGCC TGTGT  
751 GAGAA GACTT TGTGT GAGTG TGCTG GGGGG CTGGA GTGCG CCTGC CCTGC  
801 CCTCC TGGAG TACGC CCGGA CCTGT GCCCA GGAGG GAATG GTGCT GTACG  
851 GCTGG ACCGA CCACA GCGCG TGACG CCCAG TGTGC CCTGC TGGTA TGGAG  
901 TATAG GCAGT GTGTG TCCCC TTGCG CCAGG ACCTG CCAGA GCCTG CACAT  
951 CAATG AAATG TGTA GGAGC GATGC GTGGA TGGCT GCAGC TGCCC TGAGG  
1001 GACAG CTCCT GGATG AAGGC CTCTG CGTGG AGAGC ACCGA GTGTC CCTGC  
1051 GTGCA TTCCG GAAAG CGCTA CCCTC CCGGC ACCTC CCTCT CTCGA GACTG  
1101 CAACA CCTGC ATTTG CCGAA ACAGC CAGTG GATCT GCAGC AATGA AGAAT  
1151 GTCCA GGGGA GTGCC TTGTC ACTGG TCAAT CCCAC TCAA GAGCT TTGAC  
1201 AACAG ATACT TCACC TTCAG TGGGA TCTGC CAGTA CCTGC TGGCC CGGGA  
1251 TTGCC AGGAC CACTC CTTCT CCATT GTCAT TGAGA CTGTC CAGTG TGCTG  
1301 ATGAC CGCGA CGCTG TGTGC ACCCG CTCCG TCACC GTCCG GCTGC CTGGC

1351 CTGCA CAACA GCCTT GTGAA ACTGA AGCAT GGGGC AGGAG TTGCC ATGGA  
1401 TGGCC AGGAC ATCCA GCTCC CCCTC CTGAA AGGTG ACCTC CGCAT CCAGC  
1451 ATACA GTGAC GGCCT CCGTG CGCCT CAGCT ACGGG GAGGA CCTGC AGATG  
1501 GACTG GGATG GCCCG GGGAG GCTGC TGGTG AAGCT GTCCC CCGTC TATGC  
1551 CGGGA AGACC TGC GG CTTGT GTGGG AATTA CAATG GCAAC CAGGG CGACG  
1601 ACTTC CTTAC CCCCT CTGGG CTGGC GGAGC CCCGG GTGGA GAGCT TCGGG  
1651 AACGC CTGGA AGCTG CACGG GGACT GCCAG GACCT GCAGA AGCAG CACAG  
1701 CGATC CCTGC GCCCT CAACC CGCGC ATGAC CAGGT TCTCC GAGGA GGCGT  
1751 GCGCG GTCCT GACGT CCCCC ACATT CGAGG CCTGC CATCG TGCCG TCAGC  
1801 CCGCT GCCCT ACCTG CGGAA CTGCC GCTAC GACGT GTGCT CCTGC TCGGA  
1851 CGGCC GCGAG TGCCCT GTGCG GCGCC CTGGC CAGCT ATGCC GCGGC CTGCG  
1901 CGGGG AGAGG CGTGC GCGTC GCGTG GCGCG AGCCA GGCCG CTGTG AGCTG  
1951 AACTG CCCGA AAGGC CAGGT GTACC TGCAG TGCGG GACCC CCTGC AACCT  
2001 GACCT GCCGC TCTCT CTCTT ACCCG GATGA GGAAT GCAAT GAGGC CTGCC  
2051 TGGAG GGCTG CTTCT GCCCC CCAGG GCTCT ACATG GATGA GAGGG GGGAC  
2101 TGCGT GCCCA AGGCC CAGTG CCCCT GTTAC TATGA CGGTG AGATC TTCCA  
2151 GCCAG AAGAC ATCTT CTCAG ACCAT CACAC CATGT GCTAC TGTGA GGATG  
2201 GCTTC ATGCA CTGTA CCATG AGTGG AGTCC CCGGA AGCTT GCTGC CTGAC  
2251 GCTGT CCTCA GCAGT CCCCT GTCTC ATCGC AGCAA AAGGA GCCTA TCCTG  
2301 TCGGC CCCCC ATGGT CAAGC TGGTG TGTCC CGCTG ACAAC CTGCG GGCTG  
2351 AAGGG CTCGA GTGTA CCAA ACGTG CCAGA ACTAT GACCT GGAGT GCATG  
2401 AGCAT GGGCT GTGTC TCTGG CTGCC TCTGC CCCCC GGGCA TGGTC CGGCA  
2451 TGAGA ACAGA TGTGT GGCCC TGGAA AGGTG TCCCT GCTTC CATCA GGGCA  
2501 AGGAG TATGC CCCTG GAGAA ACAGT GAAGA TTGGC TGCAA CACTT GTGTC  
2551 TGTCG GGACC GGAAG TGGAA CTGCA CAGAC CATGT GTGTG ATGCC ACGTG  
2601 CTCCA CGATC GGCAT GGCCC ACTAC CTCAC CTTCC ACGGG CTCAA ATACC  
2651 TGTTC CCCGG GGAGT GCCAG TACGT TCTGG TGCAG GATTA CTGCG GCAGT  
2701 AACCC TGGGA CCTTT CGGAT CCTAG TGGGG AATAA GGGAT GCAGC CACCC  
2751 CTCAG TGAAA TGCAA GAAAC GGGTC ACCAT CCTGG TGGAG GGAGG AGAGA  
2801 TTGAG CTGTT TGACG GGGAG GTGAA TGTGA AGAGG CCCAT GAAGG ATGAG  
2851 ACTCA CTTTG AGGTG GTGGA GTCTG GCCGG TACAT CATTC TGCTG CTGGG  
2901 CAAAG CCCTC TCCGT GGTCT GGGAC CGCCA CCTGA GCATC TCCGT GGTCC  
2951 TGAAG CAGAC ATACC AGGAG AAAGT GTGTG GCCTG TGTGG GAATT TTGAT  
3001 GGCAT CCAGA ACAAT GACCT CACCA GCAGC AACCT CCAAG TGGAG GAAGA  
3051 CCCTG TGGAC TTTGG GAACT CCTGG AAAGT GAGCT CGCAG TGTGC TGACA  
3101 CCAGA AAAGT GCCTC TGGAC TCATC CCCTG CCACC TGCCA TAACA ACATC  
3151 ATGAA GCAGA CGATG GTGGA TTCCT CCTGT AGAAT CCTTA CCAGT GACGT  
3201 CTTCC AGGAC TGCAA CAAGC TGGTG GACCC CGAGC CATAT CTGGA TGTCT  
3251 GCATT TACGA CACCT GCTCC TGTGA GTCCA TTGGG GACTG CGCCG CATTC  
3301 TGCGA CACCA TTGCT GCCTA TGCCC ACGTG TGTGC CCAGC ATGGC AAGGT  
3351 GGTGA CCTGG AGGAC GGCCA CATTG TGCCC CCAGA GCTGC GAGGA GAGGA  
3401 ATCTC CGGGA GAACG GGTAT GAGGC TGAGT GGCGC TATAA CAGCT GTGCA  
3451 CCTGC CTGTC AAGTC ACGTG TCAGC ACCCT GAGCC ACTGG CCTGC CCTGT  
3501 GCAGT GTGTG GAGGG CTGCC ATGCC CACTG CCCTC CAGGG AAAAT CCTGG  
3551 ATGAG CTTTT GCAGA CCTGC GTTGA CCCTG AAGAC TGTCC AGTGT GTGAG  
3601 GTGGC TGGCC GGCGT TTTGC CTCAG GAAAG AAAGT CACCT TGAAT CCCAG  
3651 TGACC CTGAG CACTG CCAGA TTTGC CACTG TGATG TTGTC AACCT CACCT  
3701 GTGAA GCCTG CCAGG AGCCG ATATC GGGTA CCTCA GAGTC TGCTA CCCCC  
3751 GAGTC AGGGC CAGGA TCAGA GCCAG CCACC TCCGG GTCTG AGACA CCCGG  
3801 GACTT CCGAG AGTGC CACCC CTGAG TCCGG ACCCG GGTCC GAGCC CGCCA  
3851 CTTCC GGCTC CGAAA CTCCC GGCAC AAGCG AGAGC GCTAC CCCAG AGTCA  
3901 GGACC AGGAA CATCT ACAGA GCCCT CTGAA GGCTC CGCTC CAGGG TCCCC  
3951 AGCCG GCAGT CCCAC TAGCA CCGAG GAGGG AACCT CTGAA AGCGC CACAC  
4001 CCGAA TCAGG GCCAG GGTCT GAGCC TGCTA CCAGC GGCAG CGAGA CACCA  
4051 GGCAC CTCTG AGTCC GCCAC ACCAG AGTCC GGACC CCGAT CTCCC GCTGG  
4101 GAGCC CCACC TCCAC TGAGG AGGGA TCTCC TGCTG GCTCT CCAAC ATCTA  
4151 CTGAG GAAGG TACCT CAACC GAGCC ATCCG AGGGA TCAG TCCCG GCACC  
4201 TCAGA GTCGG CAACC CCGGA GTCTG GACCC GGAAC TTCCG AAAGT GCCAC  
4251 ACCAG AGTCC GGTCC CGGGA CTTCA GAATC AGCAA CACCC GAGTC CGGCC  
4301 CTGGG TCTGA ACCCG CCACA AGTGG TAGTG AGACA CCAGG ATCAG AACCT  
4351 GCTAC CTCAG GGTCA GAGAC ACCCG GATCT CCGGC AGGCT CACCA ACCTC  
4401 CACTG AGGAG GGCAC CAGCA CAGAA CCAAG CGAGG GCTCC GCACC CGGAA  
4451 CAAGC ACTGA ACCCA GTGAG GGTTC AGCAC CCGGC TCTGA GCCGG CCACA  
4501 AGTGG CAGTG AGACA CCCGG CACTT CAGAG AGTGC CACCC CCGAG AGTGG

4551 CCCAG GCACT AGTAC CGAGC CCTCT GAAGG CAGTG CGCCA GATTC TGGCG  
4601 GTGGA GGTTC CGGTG GCGGG GGATC CGGTG GCGGG GGATC CGGTG GCGGG  
4651 GGATC CGGTG GCGGG GGATC CCTGG TCCCC CGGGG CAGCG GAGGC GACAA  
4701 AACTC ACACA TGCCC ACCGT GCCCA GCTCC AGAAC TCCTG GGCGG ACCGT  
4751 CAGTC TTCCT CTTCC CCCC AAACC CAAGG ACACC CTCAT GACTC CCCGG  
4801 ACCCC TGAGG TCACA TGCGT GGTGG TGGAC GTGAG CCACG AAGAC CCTGA  
4851 GGTCA AGTTC AACTG GTACG TGGAC GGCCT GGAGG TGCAT AATGC CAAGA  
4901 CAAAG CCGCG GGAGG AGCAG TACAA CAGCA CGTAC CGTGT GGTC A GCGTC  
4951 CTCAC CGTCC TGCAC CAGGA CTGGC TGAAT GGCAA GGAGT ACAAG TGCAA  
5001 GGTCT CCAAC AAAGC CCTCC CAGCC CCCAT CGAGA AAACC ATCTC CAAAG  
5051 CCAAA GGGCA GCCCC GAGAA CCACA GGTGT ACACC CTGCC CCCAT CCCGG  
5101 GATGA GCTGA CCAAG AACCA GGTCA GCCTG ACCTG CCTGG TCAAA GGCTT  
5151 CTATC CCAGC GACAT CGCCG TGGAG TGGGA GAGCA ATGGG CAGCC GGAGA  
5201 ACAAC TACAA GACCA CGCCT CCCGT GTTGG ACTCC GACGG CTCCT TCTTC  
5251 CTCTA CAGCA AGCTC ACCGT GGACA AGAGC AGGTG GCAGC AGGGG AACGT  
5301 CTTCT CATGC TCCGT GATGC ATGAG GCTCT GCACA ACCAC TACAC GCAGA  
5351 AGAGC CTCTC CCTGT CTCCG GGTA A ATGA

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

1 MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFNVTFDGSM  
51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG  
101 TVTQGDQRV S MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL  
151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSSGEQWC  
201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC  
251 EKTLCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWTDHSA CSPVCPAGME  
301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTECPC  
351 VHSKTRYPFG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD  
401 NRYLFTSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIVTV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG  
451 LHNSLVKLLKH GAGVAMDQD IQLPLLKGD L RIQHTVTASV RLSYGEDLQM  
501 DWDGRGRLLV KLSVPYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG  
551 NAWKLGHCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS  
601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGRV AVREPGRCCEL  
651 NCPKQVYV LQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD  
701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFS DHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD  
751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM  
801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV  
851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ YVLVQDYCGS  
901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE VNVKREMKDE  
951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD  
1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI  
1051 MKQTMVDSSC RILTSDVFQD CNKLVDP EPY LDVCIYDTCS CESIGDCAAF  
1101 CDTIAAYAHV CAQH GKVV TW RTATLCPQSC EERNLRENGY EAEWRYNSCA  
1151 PACQVTCQHP EPLACPVCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE  
1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGTSESATP  
1251 ESGPGSEPAT SGSETPGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP GTSESATPES  
1301 GPGTSTEPSE GSAPGSPAGS PTSTEEGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP  
1351 GTSESATPES GPGSPAGSPT STEEGSPAGS PTSTEEGTST EPSEGSAPGT  
1401 SESATPESGP GTSESATPES GPGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPGSEP  
1451 ATSGSETPGS PAGSPTSTEE GTSTEPSEGS APGTSTEPSE GSAPGSEPAT  
1501 SGSETPGTSE SATPESGPGT STEPSEGSAP DIGGGGGSGG GGS LVP RGS G  
1551 GDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE  
1601 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY  
1651 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPVY TLPPSRDEL T KNQVSLTCLV  
1701 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ  
1751 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK\*

[0252] Приведенное выше описание конкретных вариантов реализации настолько полно раскрывает общий смысл изобретения, что посторонние лица смогут, используя

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

**[0253]** Другие варианты реализации изобретения будут очевидны квалифицированным специалистам в данной области техники из описания заявки и практики изобретения, раскрытых в данном документе. Следует понимать, что описание заявки и примеры должны рассматриваться только как иллюстративные, а действительные объем и сущность изобретения определяются приведенной далее формулой изобретения.

**[0254]** Все патенты и публикации, приведенный в данном документе, включены в него в качестве ссылок в полном объеме.

**[0255]** Данная заявка заявляет приоритет по предварительной заявке на патент США № 61/840872, поданной 28 июня 2013 г. Содержание вышеуказанной заявки включено в данный документ в качестве ссылки в полном объеме.

## ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов, кодирующий химерную молекулу, причем химерная молекула содержит первую полипептидную цепь, содержащую белок фактора фон Виллебранда (VWF), первую удлиненную рекомбинантную полипептидную последовательность (XTEN), линкер VWF и первый гетерологичный фрагмент (H1), причем первая последовательность XTEN соединяет белок VWF с линкером VWF, а линкер VWF соединяет первую последовательность XTEN с H1; причем белок VWF содержит домен D1, домен D2, домен D' и домен D3 VWF, причем линкер VWF содержит область a2 из фактора VIII (FVIII); и причем химерная молекула содержит вторую полипептидную цепь, содержащую белок FVIII.
2. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов по п. 1, причем первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь ассоциированы друг с другом.
3. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов по п. 2, причем вторая полипептидная цепь дополнительно содержит вторую последовательность XTEN.
4. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов по п. 2 или 3, причем вторая полипептидная цепь дополнительно содержит второй гетерологичный фрагмент (H2).
5. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов, кодирующий химерную молекулу, причем химерная молекула содержит первую полипептидную цепь, которая содержит белок VWF, гетерологичный фрагмент (H1) и линкер VWF, соединяющий белок VWF и гетерологичный фрагмент (H1), и вторую полипептидную цепь, содержащую белок FVIII и последовательность XTEN, причем белок VWF содержит домен D1, домен D2, домен D' и домен D3 VWF; причем линкер VWF в первой полипептидной цепи содержит область a2 из FVIII; причем первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь ассоциированы друг с другом.
6. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов по п. 5, содержащая дополнительную последовательность XTEN, которая соединена с белком VWF, гетерологичным фрагментом, линкером VWF или любой их комбинацией.

7. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов по п. 5 или 6, содержащая второй гетерологичный фрагмент (H2), соединенный с белком FVIII, последовательностью XTEN или обоими.

8. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов по любому из пп. 1-7, причем по меньшей мере одна из последовательностей XTEN содержит около 42 аминокислот, около 72 аминокислот, около 108 аминокислот, около 144 аминокислот, около 180 аминокислот, около 216 аминокислот, около 252 аминокислот, около 288 аминокислот, около 324 аминокислот, около 360 аминокислот, около 396 аминокислот, около 432 аминокислот, около 468 аминокислот, около 504 аминокислот, около 540 аминокислот, около 576 аминокислот, около 612 аминокислот, около 624 аминокислот, около 648 аминокислот, около 684 аминокислот, около 720 аминокислот, около 756 аминокислот, около 792 аминокислот, около 828 аминокислот, около 836 аминокислот, около 864 аминокислот, около 875 аминокислот, около 912 аминокислот, около 923 аминокислот, около 948 аминокислот, около 1044 аминокислот, около 1140 аминокислот, около 1236 аминокислот, около 1318 аминокислот, около 1332 аминокислоты, около 1428 аминокислот, около 1524 аминокислот, около 1620 аминокислот, около 1716 аминокислот, около 1812 аминокислот, около 1908 аминокислот или около 2004 аминокислот.

9. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов по любому из пп. 1-8, причем по меньшей мере одна последовательность XTEN выбрана из AE42, AE72, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288 или AG144; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 47; SEQ ID NO: 45; SEQ ID NO: 44; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 48; SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 44 или SEQ ID NO: 42.

10. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов по любому из пп. 1-9, причем линкер VWF содержит область a2, которая содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 90%, около 95% или 100% идентичную участку от Glu720 до Arg740, соответствующему полноразмерному FVIII, причем область a2 способна расщепляться тромбином.

11. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов по п. 10, отличающаяся тем, что область a2 содержит SEQ ID NO: 4.

12. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов по любому из пп. 1-11, причем (a) домен D' белка VWF содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на около 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотам 764-866 SEQ ID NO: 2; (b) домен D3 белка VWF содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на

около 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичную аминокислотам 867-1240 SEQ ID NO: 2; или (с) оба (а) и (b).

13. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов по любому из пп. 1-12, причем последовательность белка VWF содержит аминокислоты 764-1240 SEQ ID NO: 2.

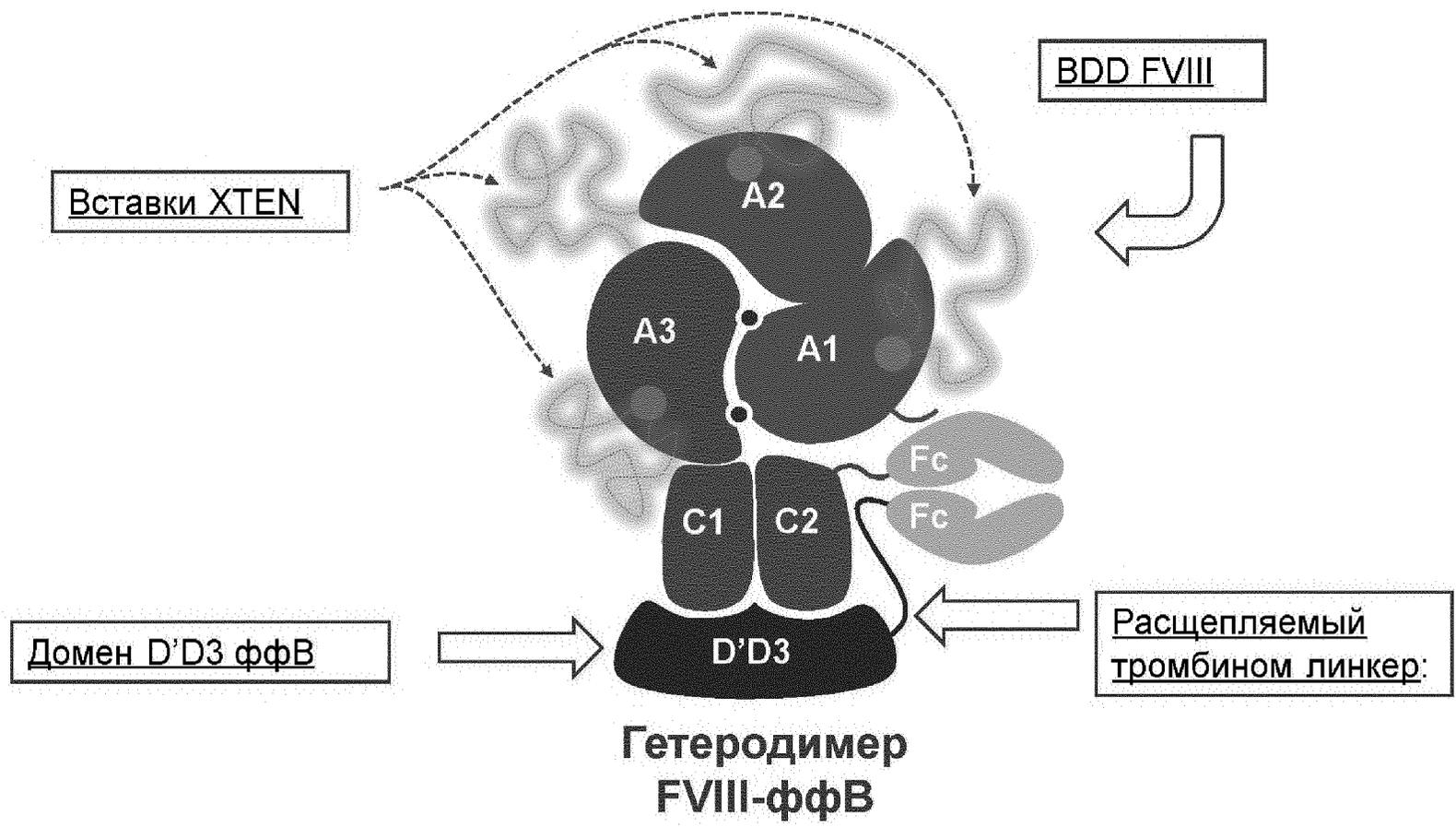
14. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов по любому из пп. 1-13, причем белок VWF состоит из доменов D1, D2, D' и D3 VWF.

15. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов по любому из пп. 1-14, причем белок VWF не содержит любой из доменов A1, A2, A3, D4, B1, B2, B3, C1, C2 или СК VWF.

16. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов по любому из пп. 1-15, причем гетерологичный фрагмент (Н1) содержит константную область иммуноглобулина или ее участок, причем второй гетерологичный фрагмент (Н2) содержит константную область иммуноглобулина или ее участок, или как Н1, так и Н2 содержит константную область иммуноглобулина.

17. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов по п. 15, причем первый гетерологичный фрагмент (Н1) содержит Fc-область, причем второй гетерологичный фрагмент (Н2) содержит Fc-область или причем как Н1, так и Н2 содержит Fc-область.

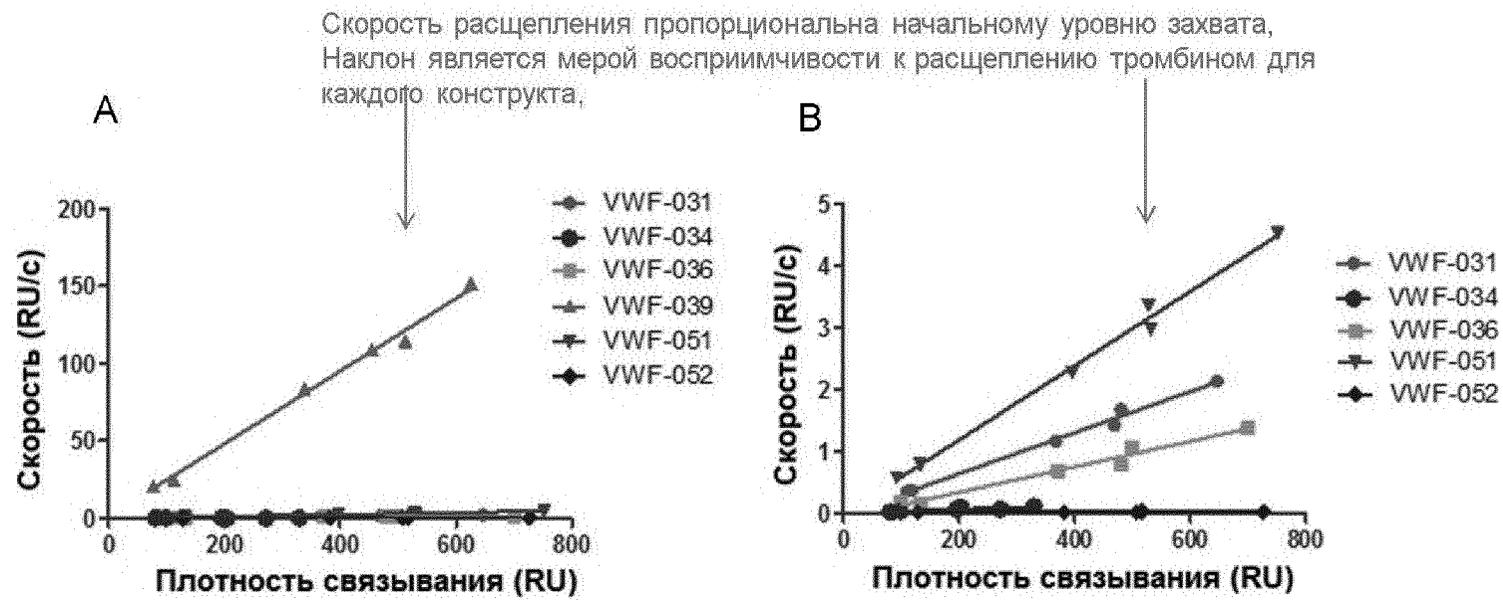
18. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов по любому из пп. 5 и 8-17, причем первый гетерологичный фрагмент (Н1) представляет собой Fc-область и второй гетерологичный фрагмент (Н2) представляет собой Fc-область, причем Н1 и Н2 ассоциированы друг с другом посредством ковалентной связи.



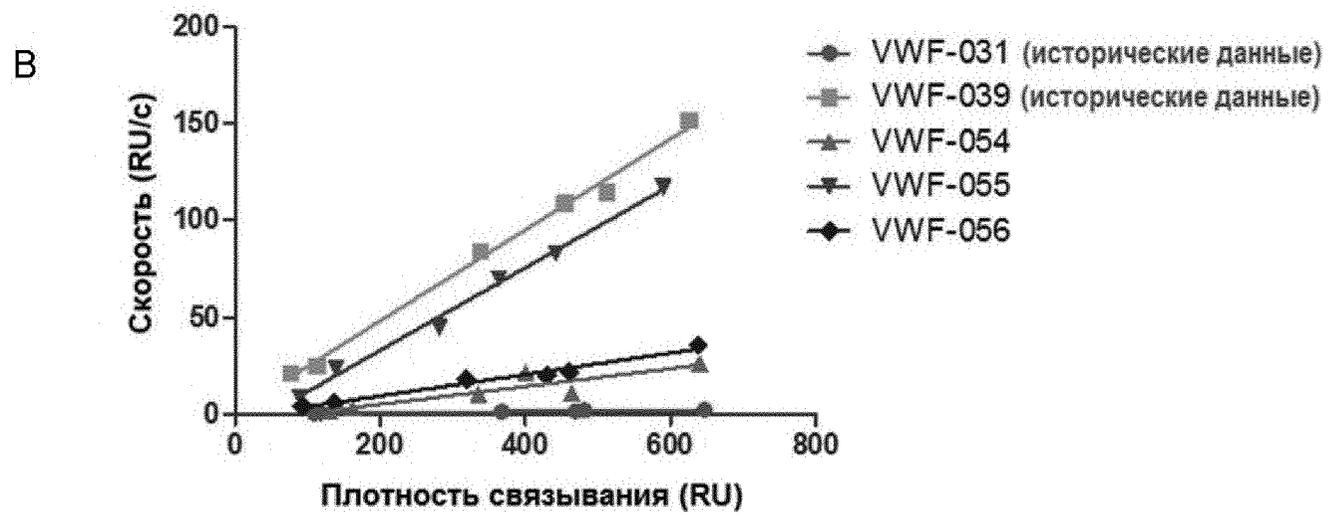
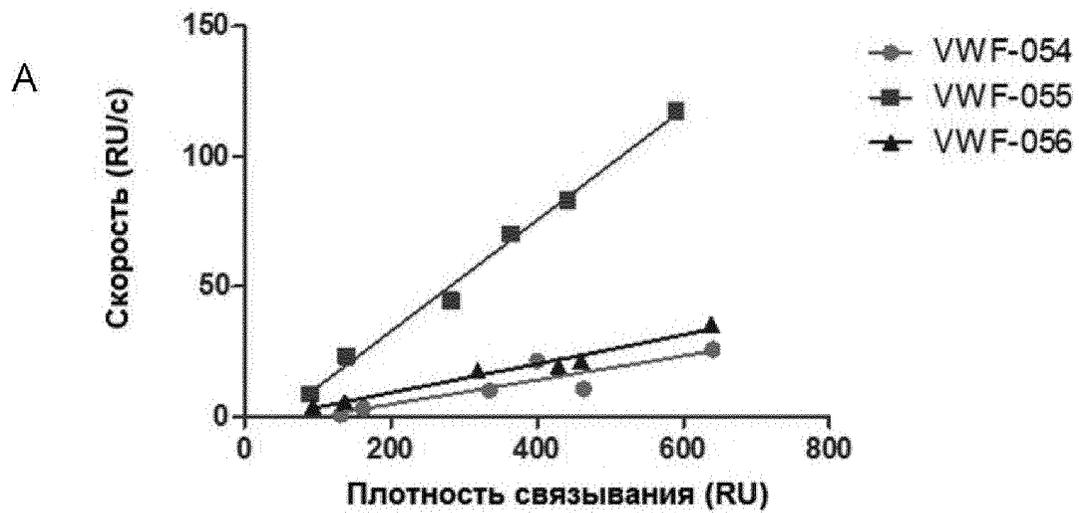
ФИГ. 1

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

ФИГ. 2



ФИГ. 3



**ФИГ. 4**

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

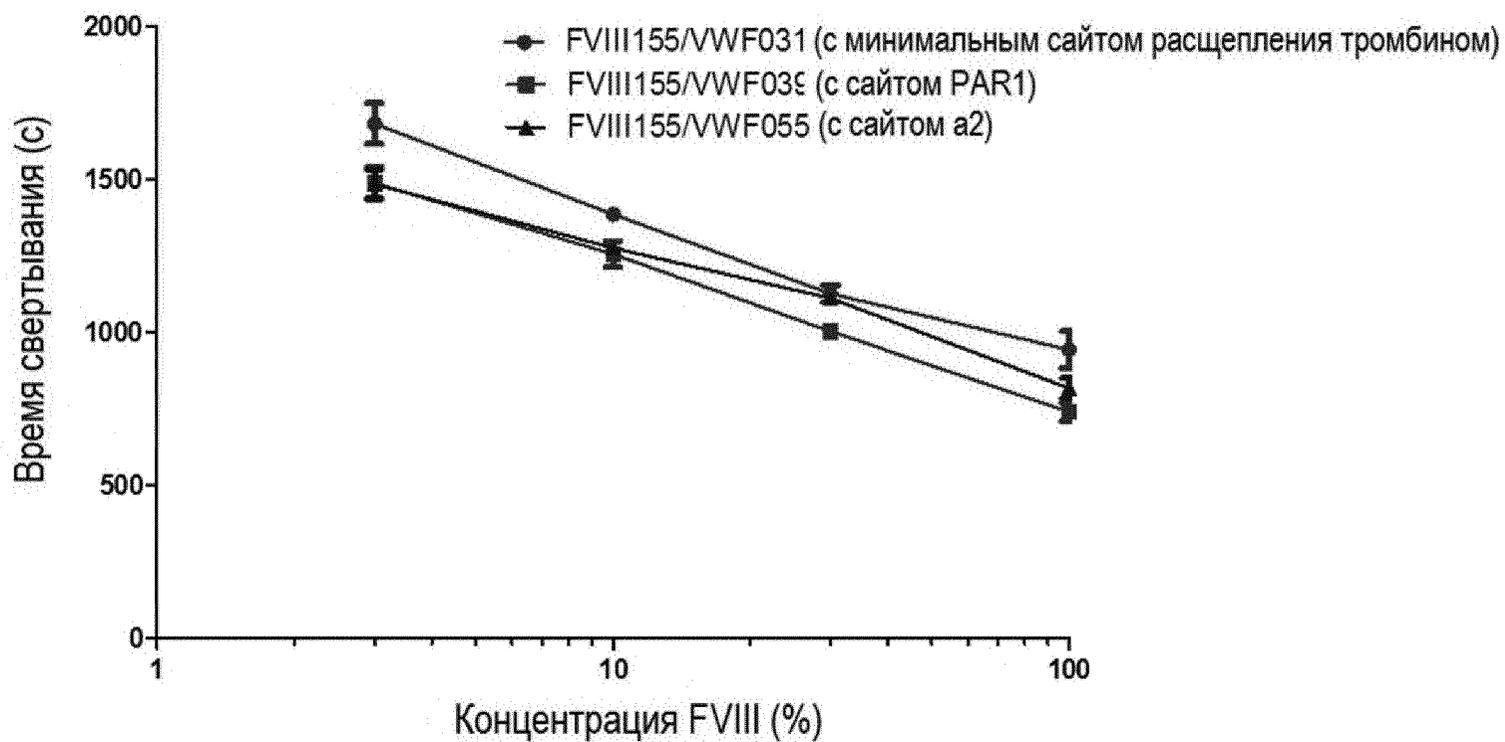
$$\text{наклон}_{\text{VWF-039}}/\text{наклон}_{\text{VWF-031}} = 71$$

$$\text{наклон}_{\text{VWF-055}}/\text{наклон}_{\text{VWF-031}} = 65$$

$$\text{наклон}_{\text{VWF-051}}/\text{наклон}_{\text{VWF-031}} = 1,8$$

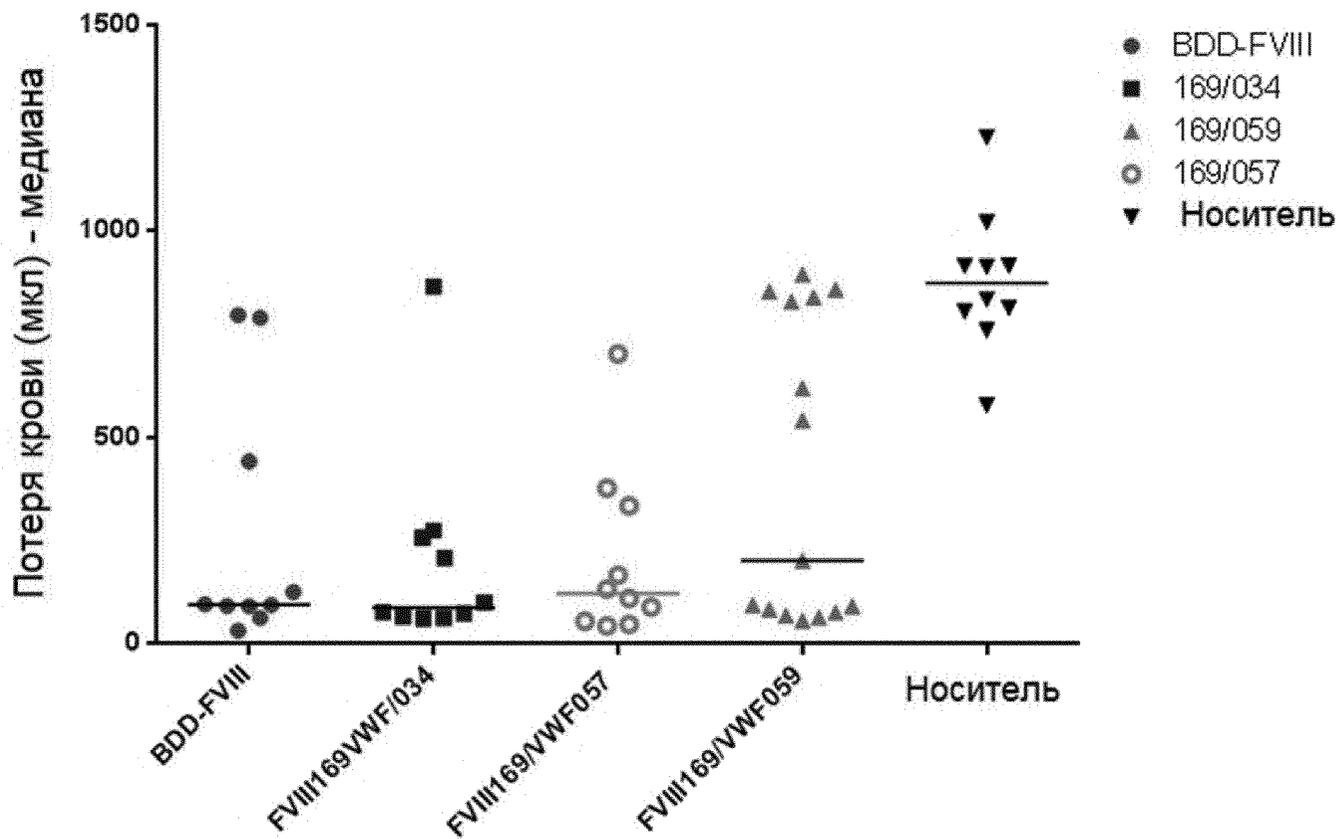
**ФИГ. 5**

### Анализ методом ROTEM цельной крови донора с НемА



ФИГ. 6





ФИГ. 8

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 2159420PC01	<b>FOR FURTHER ACTION</b> see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2014/044731	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 27 June 2014	(Earliest) Priority Date ( <i>day/month/year</i> ) 28 June 2013.
Applicant BIOGEN IDEC MA INC.		

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

This international search report consists of a total of 4 sheets.

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

## 1. Basis of the report

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

- the international application in the language in which it was filed.  
 a translation of the international application into \_\_\_\_\_ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

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

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

2.  **Certain claims were found unsearchable** (see Box No. II).

3.  **Unity of invention is lacking** (see Box No. III).

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

- the text is approved as submitted by the applicant.  
 the text has been established by this Authority to read as follows:

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

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

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

- a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. \_\_\_\_\_  
 as suggested by the applicant.  
 as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.  
 as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
- b.  none of the figures is to be published with the abstract.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/044731

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

a. (means)

on paper

in electronic form

b. (time)

in the international application as filed

together with the international application in electronic form

subsequently to this Authority for the purposes of search

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 3, 79, 80, 82, 84, 85, 86, 87, and 88 were searched.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/044731

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 6, 10-99, 111  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2014/044731

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 38/37 (2014.01)

CPC - A61K 38/37(2014.09)

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC(8) - A61K 38/00; 38/37; C07K 14/755 (2014.01)

CPC - A61K 38/00; 38/37; C07K 14/755

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

US Class - 514/1.1, 14.1; 530/300, 350, 383

CPC - A61K 38/00; 38/37; C07K 14/755 (2014.09) (keyword delimited)

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

PatBase, Google Patents, Google, PubMed

Search terms used: FVIII, vonWillebrand factor, VWF, coagulation, XTEN, chimeric protein, fusion, half-life, heterologous

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2011/0183907 A1 (WEIMER et al) 28 July 2011 (28.07.2011) entire document	1-5, 7-9, 100
Y	US 2013/0108629 A1 (DUMONT et al) 02 May 2013 (02.05.2013) entire document	1-5, 7-9, 100
Y	WO 2010/060081 A1 (TANG et al) 27 May 2010 (27.05.2010) entire document	101
Y	US 2012/0178691 A1 (SCHELLENBERGER et al) 12 July 2012 (12.07.2012) entire document	102-106
Y	US 2012/0289468 A1 (BARNETT) 15 November 2012 (15.11.2012) entire document	102-106
X, P	WO 2013/122617 A1 (SCHELLENBERGER et al) 22 August 2013 (22.08.2013) entire document	1-5, 7-9, 100-110
X, P	WO 2013/106787 A1 (CHABRA et al) 18 July 2013 (18.07.2013) entire document	1-5, 7-9, 100-110
A	PETERS et al, "Biochemical and functional characterization of a recombinant monomeric factor VIII-Fc fusion protein," Journal of Thrombosis and Haemostasis, 27 January 2013 (27.01.2013), Vol. 11, Pgs. 132-141.	1-5, 7-9, 100-110

 Further documents are listed in the continuation of Box C.

\* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 October 2014

Date of mailing of the international search report

04 NOV 2014

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Blaine R. Copenheaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300  
PCT OSP: 571-272-7774