

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201991340** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2019.11.29

(51) Int. Cl. *A61K 38/37* (2006.01)  
*A61K 38/48* (2006.01)  
*A61P 7/04* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2017.12.01

---

(54) **СПОСОБЫ ИНДУЦИРОВАНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ К  
ФАКТОРАМ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ**

---

(31) 62/429,516; 62/466,937; 62/529,866;  
62/558,790; 62/582,829

(32) 2016.12.02; 2017.03.03; 2017.07.07;  
2017.09.14; 2017.11.07

(33) US

(86) PCT/US2017/064323

(87) WO 2018/102760 2018.06.07

(71) Заявитель:

**БАЙОВЕРЕКТИВ ТЕРАПЬЮТИКС  
ИНК. (US); СВЕДИШ ОРФАН  
БИОВИТРУМ АБ (ПАБЛ) (SE)**

(72) Изобретатель:

**Дюмон Дженнифер, Джаин Ниша  
(US), Летхаген Стефан (SE)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) В настоящем изобретении предусмотрены способы индуцирования иммунологической толерантности у человека, включающие введение человеку эффективного количества композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область.

**A1**

**201991340**

**201991340**

**A1**

**СПОСОБЫ ИНДУЦИРОВАНИЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ТОЛЕРАНТНОСТИ К  
ФАКТОРАМ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ**

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета по предварительным заявкам на патент США с регистрационными №№ 62/429516, поданной 2 декабря 2016 г., 62/466937, поданной 3 марта 2017 г., 62/529866, поданной 7 июля 2017 г., 62/558790, поданной 14 сентября 2017 г., и 62/582829, поданной 7 ноября 2017 г., каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Настоящее изобретение в целом относится к области средств терапии гемостатических нарушений.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Гемофилия представляет собой сцепленное с X-хромосомой нарушение свертываемости крови, вызываемое мутациями и/или делециями в генах, кодирующих коагуляционные белки, в частности, в гене фактора VIII (FVIII), что приводит к дефициту активности фактора VIII (гемофилия А), или гене фактора IX, что приводит к дефициту активности FIX (гемофилия В) (см., например, Peyvandi, F. et al. *Haemophilia* 12:82-89 (2006)). Заболевание характеризуется спонтанным кровоизлиянием и чрезмерным кровотечением после травмы. Лечение гемофилии заключается в заместительной терапии, направленной на восстановление активности FVIII и/или FIX для предотвращения спонтанного кровотечения (см., например, Mannucci, P.M., et al., *N. Engl. J. Med.* 344:1773-1779 (2001)).

[0004] Заместительная терапия факторами свертывания крови является ведущим способом лечения гемофилии. Однако у значительной части пациентов с гемофилией, включая почти 30% пациентов с тяжелой формой гемофилии А, вырабатываются ингибиторы в отношении продуктов, содержащих фактор свертывания крови, что значительно снижает их эффективность у данных пациентов. Иммунный ответ представляет собой Т-клеточно-

зависимый или В-клеточно-опосредованный иммунный ответ, направленный против введенного путем инфузии фактора свертывания крови, например, заместительной терапии FVIII.

[0005] Хотя ингибиторы вырабатываются с большей долей вероятности у людей с тяжелой формой гемофилии, ингибиторы также вырабатываются у примерно 5–8% людей с легкой или умеренной формой гемофилии А. Выработка ингибиторов фактора свертывания крови может быть смертельной, поскольку антитела могут ингибировать не только введенный путем инфузии концентрат фактора, но также и некоторую небольшую долю белка-фактора, который организм выработал естественным путем. Следовательно, у человека с легкой или умеренной формой гемофилии, у которого уже вырабатывается ингибитор, фактически имеет место тяжелая форма гемофилии (<1% циркулирующего фактора).

[0006] У примерно 2–3% людей с гемофилией В вырабатываются ингибиторы. Хотя ингибиторы у людей с гемофилией В встречаются реже, чем при гемофилии А, это может быть еще более сложной задачей, поскольку у приблизительно половины пациентов с гемофилией В, у которых выработался ингибитор, будет иметь место анафилактическая реакция на введенный путем инфузии фактор IX, которая может быть опасной для жизни.

[0007] Следовательно, остается потребность в способах индуцирования иммунологической толерантности у человека, у которого уже сформировался иммунный ответ на один или несколько факторов свертывания крови, и который не ответил на предшествующую терапию для формирования иммунологической толерантности.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] В настоящем изобретении предусмотрен способ индуцирования иммунологической толерантности у человека с гемофилией, включающий введение человеку эффективного количества химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, или композиции, содержащей фактор свертывания крови и Fc-область, где у человека выработался ингибитор фактора свертывания крови и имело место отсутствие ответа на один или несколько предшествующих курсов терапии для формирования

иммунологической толерантности к фактору свертывания крови. В некоторых аспектах способ дополнительно включает измерение уровня ингибирующего иммунного ответа перед введением и измерение уровня ингибирующего иммунного ответа после введения. В некоторых аспектах способ дополнительно включает сравнение уровня ингибирующего иммунного ответа перед введением с уровнем ингибирующего иммунного ответа после введения.

[0009] В настоящем изобретении дополнительно предусмотрен способ индуцирования иммунологической толерантности у человека с гемофилией, включающий (1) введение человеку эффективного количества химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, или композиции, содержащей фактор свертывания крови и Fc-область, где эффективное количество химерного белка обеспечивает индуцирование иммунологической толерантности у человека; и (2) после индуцирования иммунологической толерантности введение человеку химерного белка по схеме со снижением дозы. В определенных аспектах индуцирование иммунологической толерантности происходит, если титр ингибирующих антител у человека составляет менее приблизительно 0,6 BU. В определенных аспектах способ дополнительно включает (3) после схемы со снижением дозы введение человеку профилактической дозы фактора свертывания крови. В определенных аспектах человек не получал лечение с помощью предшествующей терапии для формирования иммунологической толерантности к фактору свертывания крови.

[0010] В некоторых аспектах у человека сформировался ингибирующий иммунный ответ на фактор свертывания крови. В некоторых вариантах осуществления ингибирующий иммунный ответ включает выработку ингибирующих антител к фактору свертывания крови. В некоторых вариантах осуществления титр ингибирующих антител перед введением составляет по меньшей мере приблизительно 0,6 единицы Бетезда (BU). В некоторых вариантах осуществления титр ингибирующих антител после введения составляет менее приблизительно 0,6 BU.

[0011] В некоторых аспектах иммунный ответ включает клеточно-опосредованный иммунный ответ. В некоторых вариантах

осуществления клеточно-опосредованный иммунный ответ включает высвобождение цитокина. В некоторых вариантах осуществления введение обеспечивает снижение уровня цитокина у человека по сравнению с уровнем у человека после предшествующего лечения с помощью полипептида, состоящего из полипептида FVIII. В некоторых вариантах осуществления цитокин выбран из группы, состоящей из IL-12, IL-4, IL-17, TNF- $\alpha$  и любой их комбинации.

[0012] В определенных аспектах экспрессия одной или нескольких толерогенных молекул увеличивается после введения по сравнению с уровнем экспрессии одной или нескольких толерогенных молекул перед введением. В некоторых вариантах осуществления одна или несколько толерогенных молекул выбраны из IL-10, TGF- $\beta$ , IL-35, IDO-1 и любой их комбинации. В других вариантах осуществления иммунный ответ включает клинический симптом, выбранный из группы, состоящей из повышенной склонности к кровотечению, высокого потребления фактора свертывания крови, отсутствия ответа на терапию фактором свертывания крови, пониженной эффективности терапии фактором свертывания крови и сокращенного периода полужизни фактора свертывания крови.

[0013] В некоторых вариантах осуществления у человека ранее диагностировали наличие сформированного ингибирующего иммунного ответа на фактор свертывания крови за по меньшей мере приблизительно 1 месяц, по меньшей мере приблизительно 2 месяца, по меньшей мере приблизительно 3 месяца, по меньшей мере приблизительно 6 месяцев, по меньшей мере приблизительно 12 месяцев, по меньшей мере приблизительно 18 месяцев, по меньшей мере приблизительно 24 месяца, по меньшей мере приблизительно 30 месяцев, по меньшей мере приблизительно 36 месяцев, по меньшей мере приблизительно 42 месяца, по меньшей мере приблизительно 48 лет, по меньшей мере приблизительно 54 месяца, по меньшей мере приблизительно 60 месяцев, по меньшей мере приблизительно 6 лет, по меньшей мере приблизительно 7 лет, по меньшей мере приблизительно 8 лет или по меньшей мере приблизительно 10 лет до введения. В некоторых вариантах осуществления время индуцирования толерантности составляет от приблизительно 1 до приблизительно 24 недель, от приблизительно 1 до приблизительно

23 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 22 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 21 недели, от приблизительно 2 до приблизительно 20 недель, от приблизительно 2 до приблизительно 19 недель, от приблизительно 2 до приблизительно 18 недель, от приблизительно 2 до приблизительно 17 недель, от приблизительно 3 до приблизительно 16 недель, от приблизительно 3 до приблизительно 15 недель, от приблизительно 3 до приблизительно 14 недель, от приблизительно 3 до приблизительно 13 недель, от приблизительно 4 до приблизительно 12 недель, от приблизительно 4 до приблизительно 11 недель, от приблизительно 4 до приблизительно 10 недель, от приблизительно 4 до приблизительно 9 недель, от приблизительно 5 до приблизительно 8 недель, от приблизительно 5 до приблизительно 7 недель, от приблизительно 5 до приблизительно 6 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 12 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 11 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 10 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 9 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 8 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 7 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 6 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 5 недель или от приблизительно 1 до приблизительно 4 недель.

[0014] В некоторых аспектах фактор свертывания крови представляет собой фактор VIII (FVIII). В некоторых вариантах осуществления химерный белок содержит FVIII-Fc. В определенных вариантах осуществления химерный белок содержит часть FVIII и часть VWF, где часть FVIII включает полипептид FVIII или его фрагмент, где часть VWF включает полипептид VWF или его фрагмент, где часть FVIII соединена с первой Fc-областью, где часть VWF соединена со второй Fc-областью, и где первая Fc-область и вторая Fc-область связаны друг с другом.

[0015] В некоторых аспектах химерный белок дополнительно содержит компонент, обеспечивающий продление периода полужизни. В определенных вариантах осуществления компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, включает альбумин или его фрагмент, компонент, связывающий альбумин, последовательность PAS, последовательность HAP, трансферрин или его фрагмент,

полиэтиленгликоль (PEG), полисиаловую кислоту, гидроксипропилкрахмал (HES), их производное или любую их комбинацию.

[0016] В некоторых вариантах осуществления эффективное количество химерного белка, содержащего FVIII и Fc-область, составляет от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 300 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления химерный белок, содержащий FVIII-Fc, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим приблизительно один день, приблизительно два дня, приблизительно три дня, приблизительно четыре дня, приблизительно пять дней, приблизительно шесть дней, приблизительно семь дней, приблизительно восемь дней, приблизительно девять дней, приблизительно десять дней, приблизительно 11 дней, приблизительно 12 дней, приблизительно 13 дней, приблизительно 14 дней, приблизительно 15 дней, приблизительно 16 дней, приблизительно 17 дней, приблизительно 18 дней, приблизительно 19 дней, приблизительно 20 дней, приблизительно 21 день, приблизительно 22 дня, приблизительно 23 дня или приблизительно 24 дня.

[0017] В определенных аспектах у человека ранее сформировался ингибирующий иммунный ответ на FVIII. В некоторых вариантах осуществления у человека имеется связанное с кровотечением состояние, выбранное из группы, состоящей из связанного с кровотечением нарушения свертываемости крови, гемартроза, мышечного кровотечения, внутриротового кровотечения, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, внутриротового кровоизлияния, травмы, черепно-мозговой травмы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома кости, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве и кровотечения во влагалище подвздошно-поясничной мышцы.

#### ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0018] E1. Способ индуцирования иммунологической толерантности у человека с гемофилией, включающий введение

человеку эффективного количества химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, где у человека выработался ингибитор фактора свертывания крови и имело место отсутствие ответа на один или несколько предшествующих курсов терапии для формирования иммунологической толерантности к фактору свертывания крови.

[0019] E2. Способ согласно E1, дополнительно включающий измерение уровня ингибирующего иммунного ответа перед введением и измерение уровня ингибирующего иммунного ответа после введения.

[0020] E3. Способ согласно E2, дополнительно включающий сравнение уровня ингибирующего иммунного ответа перед введением с уровнем ингибирующего иммунного ответа после введения.

[0021] E4. Способ согласно любому из E1–E3, где у человека сформировался ингибирующий иммунный ответ на фактор свертывания крови.

[0022] E5. Способ согласно E4, где ингибирующий иммунный ответ включает выработку ингибирующих антител к фактору свертывания крови.

[0023] E6. Способ согласно E5, где титр ингибирующих антител перед введением составляет по меньшей мере приблизительно 0,6 единицы Бетезда (BU).

[0024] E7. Способ согласно E5 или E6, где титр ингибирующих антител перед введением составляет по меньшей мере приблизительно 1 BU, по меньшей мере приблизительно 2 BU, по меньшей мере приблизительно 3 BU, по меньшей мере приблизительно 4 BU, по меньшей мере приблизительно 5 BU, по меньшей мере приблизительно 6 BU, по меньшей мере приблизительно 7 BU, по меньшей мере приблизительно 10 BU, по меньшей мере приблизительно 20 BU, по меньшей мере приблизительно 30 BU, по меньшей мере приблизительно 40 BU, по меньшей мере приблизительно 50 BU, по меньшей мере приблизительно 100 BU, по меньшей мере приблизительно 150 BU или по меньшей мере приблизительно 200 BU.

[0025] E8. Способ согласно любому из E5–E7, где титр ингибирующих антител перед введением составляет по меньшей мере

приблизительно 5 BU.

[0026] E9. Способ согласно любому из E5–E8, где титр ингибирующих антител после введения составляет менее приблизительно 0,6 BU.

[0027] E10. Способ согласно любому из E5–E9, где титр ингибирующих антител после введения составляет 0 BU.

[0028] E11. Способ согласно любому из пп. E1–E10, где иммунный ответ включает клеточно–опосредованный иммунный ответ.

[0029] E12. Способ согласно E11, где клеточно–опосредованный иммунный ответ включает высвобождение цитокина.

[0030] E13. Способ согласно E12, где введение обеспечивает снижение уровня цитокина у человека по сравнению с уровнем у человека после предшествующего лечения с помощью полипептида, состоящего из полипептида FVIII.

[0031] E14. Способ согласно E12 или E13, где цитокин выбран из группы, состоящей из IL-12, IL-4, IL-17, TNF- $\alpha$  и любой их комбинации.

[0032] E15. Способ согласно любому из E1–E14, где экспрессия одной или нескольких толерогенных молекул увеличивается после введения по сравнению с уровнем экспрессии одной или нескольких толерогенных молекул перед введением.

[0033] E16. Способ согласно E15, где одна или несколько толерогенных молекул выбраны из IL-10, TGF- $\beta$ , IL-35, IDO-1 и любой их комбинации.

[0034] E17. Способ согласно любому из E1–E14, где иммунный ответ включает клинический симптом, выбранный из группы, состоящей из повышенной склонности к кровотечению, высокого потребления фактора свертывания крови, отсутствия ответа на терапию фактором свертывания крови, пониженной эффективности терапии фактором свертывания крови и сокращенного периода полужизни фактора свертывания крови.

[0035] E18. Способ согласно любому из E1–E17, где у человека ранее диагностировали наличие сформированного ингибирующего иммунного ответа на фактор свертывания крови за по меньшей мере приблизительно 3 месяца, по меньшей мере приблизительно 6 месяцев, по меньшей мере приблизительно 12

месяцев, по меньшей мере приблизительно 18 месяцев, по меньшей мере приблизительно 24 месяца, по меньшей мере приблизительно 30 месяцев, по меньшей мере приблизительно 36 месяцев, по меньшей мере приблизительно 42 месяца, по меньшей мере приблизительно 48 лет, по меньшей мере приблизительно 54 месяца, по меньшей мере приблизительно 60 месяцев, по меньшей мере приблизительно 6 лет, по меньшей мере приблизительно 7 лет, по меньшей мере приблизительно 8 лет или по меньшей мере приблизительно 10 лет до введения.

[0036] E19. Способ согласно любому из E1-E18, где у человека ранее диагностировали наличие сформированного ингибирующего иммунного ответа на фактор свертывания крови за по меньшей мере приблизительно 5 лет до введения.

[0037] E20. Способ согласно любому из E1-E19, где время индуцирования толерантности составляет от приблизительно 1 до приблизительно 24 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 23 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 22 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 21 недели, от приблизительно 2 до приблизительно 20 недель, от приблизительно 2 до приблизительно 19 недель, от приблизительно 2 до приблизительно 18 недель, от приблизительно 2 до приблизительно 17 недель, от приблизительно 3 до приблизительно 16 недель, от приблизительно 3 до приблизительно 15 недель, от приблизительно 3 до приблизительно 14 недель, от приблизительно 3 до приблизительно 13 недель, от приблизительно 4 до приблизительно 12 недель, от приблизительно 4 до приблизительно 11 недель, от приблизительно 4 до приблизительно 10 недель, от приблизительно 4 до приблизительно 9 недель, от приблизительно 5 до приблизительно 8 недель, от приблизительно 5 до приблизительно 7 недель, от приблизительно 5 до приблизительно 6 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 12 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 11 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 10 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 9 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 8 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 7 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 6 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 5

недель или от приблизительно 1 до приблизительно 4 недель.

[0038] E21. Способ согласно любому из E1-E20, где время индуцирования толерантности составляет менее приблизительно 24 недель, менее приблизительно 23 недель, менее приблизительно 22 недель, менее приблизительно 21 недели, менее приблизительно 20 недель, менее приблизительно 19 недель, менее приблизительно 18 недель, менее приблизительно 17 недель, менее приблизительно 16 недель, менее приблизительно 15 недель, менее приблизительно 14 недель, менее приблизительно 13 недель, менее приблизительно 12 недель, менее приблизительно 11 недель, менее приблизительно 10 недель, менее приблизительно 9 недель, менее приблизительно 8 недель, менее приблизительно 7 недель, менее приблизительно 6 недель, менее приблизительно 5 недель, менее приблизительно 4 недель, менее приблизительно 3 недель, менее приблизительно 2 недель или менее приблизительно 1 недели.

[0039] E22. Способ согласно любому из E1-E21, где время индуцирования толерантности составляет от приблизительно 4 до приблизительно 12 недель.

[0040] E23. Способ согласно любому из E1-E22, где время индуцирования толерантности составляет приблизительно 4 недели.

[0041] E24. Способ согласно любому из E1-E23, где человек получает терапию интерфероном.

[0042] E25. Способ согласно любому из E1-E24, где человек получает противовирусную терапию.

[0043] E26. Способ согласно любому из E1-E25, где у человека имеется генетический полиморфизм, ассоциированный с увеличенным уровнем TNF- $\alpha$ .

[0044] E27. Способ согласно E26, где полиморфизм представляет собой TNF -308G>A.

[0045] E28. Способ согласно любому из E1-E27, где у человека имеется генетический полиморфизм, ассоциированный с увеличенным уровнем IL10.

[0046] E29. Способ согласно E28, где полиморфизм представляет собой аллель 134 микросателлита IL10G.

[0047] E30. Способ согласно любому из E1-E29, где человеку назначался прием фактора свертывания крови в течение менее 150

дней (ED).

[0048] E31. Способ согласно E30, где человеку назначался прием в течение менее 50 ED.

[0049] E32. Способ согласно E31, где человеку назначался прием в течение менее 20 ED.

[0050] E33. Способ согласно любому из E1-E32, где фактор свертывания крови представляет собой фактор VIII (FVIII).

[0051] E34. Способ согласно любому из E1-E33, где химерный белок содержит FVIII-Fc.

[0052] E35. Способ согласно любому из E1-E34, где химерный белок содержит часть FVIII и часть VWF, где часть FVIII включает полипептид FVIII или его фрагмент, где часть VWF включает полипептид VWF или его фрагмент, где часть FVIII соединена с первой Fc-областью, где часть VWF соединена со второй Fc-областью, и где первая Fc-область и вторая Fc-область связаны друг с другом.

[0053] E36. Способ согласно любому из E33-E35, где полипептид FVIII включает зрелый FVIII.

[0054] E37. Способ согласно любому из E33-E35, где полипептид FVIII включает FVIII с делецией домена В.

[0055] E38. Способ согласно E37, где FVIII с делецией домена В содержит делецию всего домена В из FVIII или его части.

[0056] E39. Способ согласно E37 или E38, где FVIII с делецией домена В содержит делецию аминокислотных остатков 746-1648 зрелого FVIII.

[0057] E40. Способ согласно любому из E33-E39, где полипептид VWF включает фрагмент VWF, содержащий домен D' и домен D3 из VWF.

[0058] E41. Способ согласно любому из E1-E40, где химерный белок дополнительно содержит компонент, обеспечивающий продление периода полужизни.

[0059] E42. Способ согласно E41, где компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, включает альбумин или его фрагмент, компонент, связывающий альбумин, последовательность PAS, последовательность HAP, трансферрин или его фрагмент, полиэтиленгликоль (PEG), полисиаловую кислоту,

гидроксиэтилкрахмал (HES), их производное или любую их комбинацию.

[0060] E43. Способ согласно E41 или E42, где компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, вставлен в фактор свертывания крови.

[0061] E44. Способ согласно E41 или E42, где компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, вставлен между фактором свертывания крови и Fc-областью.

[0062] E45. Способ согласно любому из E33–E44, где эффективное количество химерного белка, содержащего FVIII и Fc-область, составляет от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 300 МЕ/кг.

[0063] E46. Способ согласно E45, где эффективное количество химерного белка, содержащего FVIII-Fc, составляет от приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 300 МЕ/кг, от приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 200 МЕ/кг, от приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 290 МЕ/кг, от приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 280 МЕ/кг, от приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 270 МЕ/кг, от приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 260 МЕ/кг, от приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 250 МЕ/кг, от приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 240 МЕ/кг, от приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 230 МЕ/кг, от приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 220 МЕ/кг, от приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 210 МЕ/кг, от приблизительно 150 МЕ/кг до приблизительно 300 МЕ/кг, от приблизительно 150 МЕ/кг до приблизительно 290 МЕ/кг, от приблизительно 150 МЕ/кг до приблизительно 280 МЕ/кг, от приблизительно 150 МЕ/кг до приблизительно 270 МЕ/кг, от приблизительно 150 МЕ/кг до приблизительно 260 МЕ/кг, от приблизительно 150 МЕ/кг до приблизительно 250 МЕ/кг, от приблизительно 150 МЕ/кг до приблизительно 240 МЕ/кг, от приблизительно 140 МЕ/кг до приблизительно 250 МЕ/кг, от приблизительно 130 МЕ/кг до приблизительно 260 МЕ/кг, от приблизительно 120 МЕ/кг до приблизительно 270 МЕ/кг, от приблизительно 110 МЕ/кг до приблизительно 280 МЕ/кг, от

приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 290 МЕ/кг, от  
 приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 280 МЕ/кг, от  
 приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 270 МЕ/кг, от  
 приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 260 МЕ/кг, от  
 приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 250 МЕ/кг, от  
 приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 240 МЕ/кг, от  
 приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 230 МЕ/кг, от  
 приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 220 МЕ/кг или от  
 приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 210 МЕ/кг.

[0064] E47. Способ согласно E45 или E46, где эффективное количество химерного белка, содержащего FVIII-Fc, составляет  
 приблизительно 100 МЕ/кг, приблизительно 105 МЕ/кг,  
 приблизительно 110 МЕ/кг, приблизительно 115 МЕ/кг,  
 приблизительно 120 МЕ/кг, приблизительно 125 МЕ/кг,  
 приблизительно 130 МЕ/кг, приблизительно 135 МЕ/кг,  
 приблизительно 140 МЕ/кг, приблизительно 145 МЕ/кг,  
 приблизительно 150 МЕ/кг, приблизительно 155 МЕ/кг,  
 приблизительно 160 МЕ/кг, приблизительно 165 МЕ/кг,  
 приблизительно 170 МЕ/кг, приблизительно 175 МЕ/кг,  
 приблизительно 180 МЕ/кг, приблизительно 185 МЕ/кг,  
 приблизительно 190 МЕ/кг, приблизительно 195 МЕ/кг,  
 приблизительно 200 МЕ/кг, приблизительно 225 МЕ/кг,  
 приблизительно 250 МЕ/кг, приблизительно 275 МЕ/кг или  
 приблизительно 300 МЕ/кг.

[0065] E48. Способ согласно любому из E33-E47, где химерный белок, содержащий FVIII-Fc, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим приблизительно два дня, приблизительно три дня, приблизительно четыре дня, приблизительно пять дней, приблизительно шесть дней, приблизительно семь дней, приблизительно восемь дней, приблизительно девять дней, приблизительно десять дней, приблизительно 11 дней, приблизительно 12 дней, приблизительно 13 дней, приблизительно 14 дней, приблизительно 15 дней, приблизительно 16 дней, приблизительно 17 дней, приблизительно 18 дней, приблизительно 19 дней, приблизительно 20 дней, приблизительно 21 день, приблизительно 22 дня, приблизительно 23 дня или приблизительно

24 дня.

[0066] E49. Способ согласно любому из E33-E47, где химерный белок, содержащий FVIII-Fc, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим от приблизительно 1 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 13 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 12 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 11 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 10 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 9 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 8 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 7 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 6 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 5 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 4 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 3 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 2 дней, от приблизительно 2 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 3 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 4 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 5 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 6 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 7 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 8 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 9 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 10 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 11 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 12 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 13 до приблизительно 14 дней или от приблизительно 5 до приблизительно 10 дней.

[0067] E50. Способ согласно любому из E33-E49, где химерный белок, содержащий FVIII-Fc, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим от приблизительно 3 дней до приблизительно 5 дней.

[0068] E51. Способ согласно любому из E1-E33, где химерный белок содержит часть FVIII, часть VWF, первую Fc-область и вторую Fc-область;

где часть FVIII включает полипептид FVIII или его фрагмент;

где часть VWF включает полипептид VWF или его фрагмент;

где часть FVIII соединена с первой Fc-областью;

где часть VWF соединена со второй Fc-областью; и

где первая Fc-область и вторая Fc-область связаны друг с

другом.

[0069] E52. Способ согласно любому из E1-E51, где у человека ранее сформировался ингибирующий иммунный ответ на FVIII.

[0070] E53. Способ согласно E52, где ингибирующий иммунный ответ на FVIII сформировался в ответ на продукт FVIII, выбранный из группы, состоящей из ADVATE®, RECOMBINATE®, KOGENATE FS®, HELIXATE FS®, ХУНТНА/РЕФАКТО АВ®, НЕМОФИЛ-М®, MONARC-M®, MONOCLATE-P®, HUMATE-P®, ALPHANATE®, KOATE-DVI®, AFSTYLA® и HYATE:C®.

[0071] E54. Способ согласно E52, где ингибирующий иммунный ответ на FVIII сформировался в ответ на рекомбинантный продукт FVIII.

[0072] E55. Способ согласно любому из E1-E54, где у человека имеется связанное с кровотечением состояние, выбранное из группы, состоящей из связанного с кровотечением нарушения свертываемости крови, гемартроза, мышечного кровотечения, внутриротового кровотечения, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, внутриротового кровоизлияния, травмы, черепно-мозговой травмы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома кости, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве и кровотечения во влагалище подвздошно-поясничной мышцы.

[0073] E56. Способ согласно E55, где связанное с кровотечением нарушение свертываемости крови представляет собой гемофилию А.

[0074] E57. Способ согласно любому из E33-E56, где эффективное количество химерного белка, содержащего FVIII и Fc-область, составляет от приблизительно 50 МЕ/кг до приблизительно 300 МЕ/кг.

[0075] E58. Способ согласно любому E57, где эффективное количество химерного белка, содержащего FVIII и Fc-область, составляет приблизительно 50 МЕ/кг, приблизительно 60 МЕ/кг, приблизительно 70 МЕ/кг, приблизительно 80 МЕ/кг, приблизительно

90 МЕ/кг, приблизительно 100 МЕ/кг, приблизительно 110 МЕ/кг, приблизительно 120 МЕ/кг, приблизительно 130 МЕ/кг, приблизительно 140 МЕ/кг, приблизительно 150 МЕ/кг, приблизительно 160 МЕ/кг, приблизительно 170 МЕ/кг, приблизительно 180 МЕ/кг, приблизительно 190 МЕ/кг, приблизительно 200 МЕ/кг, приблизительно 225 МЕ/кг, приблизительно 250 МЕ/кг, приблизительно 275 МЕ/кг или приблизительно 300 МЕ/кг.

[0076] E59. Способ согласно E57 или E58, где эффективное количество химерного белка составляет приблизительно 200 МЕ/кг, и его вводят ежедневно.

[0077] E60. Способ согласно E57 или E58, где эффективное количество химерного белка составляет приблизительно 50 МЕ/кг, и его вводят приблизительно три раза в неделю.

[0078] E61. Способ согласно любому из E57–E60, где эффективное количество химерного белка вводят в двух или более дозах в течение дня.

[0079] E62. Способ согласно любому из E57–E61, где химерный белок вводят до тех пор, пока не будет наблюдаться иммунологическая толерантность, где иммунологическая толерантность наблюдается, если титр ингибирующих антител у человека составляет менее приблизительно 0,6 BU.

[0080] E63. Способ согласно E62, где после индуцирования иммунологической толерантности человеку вводят химерный белок, содержащий FVIII и Fc-область, по схеме со снижением дозы.

[0081] E64. Способ согласно E63, где схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы, составляющей от приблизительно 50 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг химерного белка, содержащего FVIII и Fc-область.

[0082] E65. Способ согласно E63 или E64, где снижающуюся дозу вводят один раз в день или один раз в два дня.

[0083] E66. Способ согласно любому из E63–E65, где снижающуюся дозу вводят в течение по меньшей мере приблизительно 1 недели, по меньшей мере приблизительно 2 недель, по меньшей мере приблизительно 3 недель, по меньшей мере приблизительно 4 недель, по меньшей мере приблизительно 5 недель, по меньшей мере

приблизительно 6 недель, по меньшей мере приблизительно 7 недель, по меньшей мере приблизительно 8 недель, по меньшей мере приблизительно 9 недель, по меньшей мере приблизительно 10 недель, по меньшей мере приблизительно 11 недель, по меньшей мере приблизительно 12 недель, по меньшей мере приблизительно 13 недель, по меньшей мере приблизительно 14 недель, по меньшей мере приблизительно 15 недель, по меньшей мере приблизительно 16 недель, по меньшей мере приблизительно 17 недель, по меньшей мере приблизительно 18 недель, по меньшей мере приблизительно 19 недель, по меньшей мере приблизительно 20 недель, по меньшей мере приблизительно 21 недели, по меньшей мере приблизительно 22 недель, по меньшей мере приблизительно 23 недель, по меньшей мере приблизительно 24 недель, по меньшей мере приблизительно 25 недель, по меньшей мере приблизительно 26 недель, по меньшей мере приблизительно 27 недель, по меньшей мере приблизительно 28 недель, по меньшей мере приблизительно 29 недель, по меньшей мере приблизительно 30 недель, по меньшей мере приблизительно 31 недели или по меньшей мере приблизительно 32 недель.

[0084] E67. Способ согласно любому из E63–E66, где схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы химерного белка, составляющей приблизительно 50 МЕ/кг или приблизительно 100 МЕ/кг.

[0085] E68. Способ согласно любому из E63–E67, где схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы химерного белка, составляющей приблизительно 50 МЕ/кг, один раз в день от недели 1 до недели 6 после индуцирования иммунологической толерантности.

[0086] E69. Способ согласно любому из E63–E67, где схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы химерного белка, составляющей приблизительно 100 МЕ/кг, один раз в день от недели 1 до недели 6 после индуцирования иммунологической толерантности.

[0087] E70. Способ согласно E68 или E69, где схема со снижением дозы дополнительно включает введение снижающейся дозы химерного белка, составляющей приблизительно 50 МЕ/кг или приблизительно 100 МЕ/кг, один раз в два дня от недели 6 до

недели 12 после индуцирования иммунологической толерантности.

[0088] E71. Способ согласно E70, где схема со снижением дозы дополнительно включает введение снижающейся дозы химерного белка, составляющей приблизительно 50 МЕ/кг или приблизительно 100 МЕ/кг, один раз в два дня с 12-й недели по 16-ю неделю.

[0089] E72. Способ согласно любому из E66-E71, дополнительно включающий введение профилактической дозы фактора свертывания крови после схемы со снижением дозы.

[0090] E73. Способ согласно E72, где профилактическая доза составляет от приблизительно 50 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг.

[0091] E74. Способ согласно E72 или E73, где профилактическую дозу вводят приблизительно один раз в неделю, приблизительно два раза в неделю, приблизительно три раза в неделю или приблизительно один раз в каждые три-пять дней.

[0092] E75. Способ индуцирования иммунологической толерантности у человека с гемофилией, включающий

(1) введение человеку эффективного количества химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, где эффективное количество химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, обеспечивает индуцирование иммунологической толерантности у человека; и

(2) после индуцирования иммунологической толерантности введение человеку химерного белка по схеме со снижением дозы.

[0093] E76. Способ согласно E75, где индуцирование иммунологической толерантности происходит, если титр ингибирующих антител у человека составляет менее приблизительно 0,6 BU.

[0094] E77. Способ согласно E75 или E77, дополнительно включающий

[0095] (3) после схемы со снижением дозы введение человеку профилактической дозы фактора свертывания крови.

[0096] E78. Способ согласно любому из E75-E77, где человек не получал лечение с помощью предшествующей терапии для формирования иммунологической толерантности к фактору свертывания крови.

[0097] E79. Способ согласно любому из E75–E78, дополнительно включающий измерение уровня ингибирующего иммунного ответа перед введением и измерение уровня ингибирующего иммунного ответа после введения.

[0098] E80. Способ согласно E79, дополнительно включающий сравнение уровня ингибирующего иммунного ответа перед введением с уровнем ингибирующего иммунного ответа после введения.

[0099] E81. Способ согласно любому из E75–E80, где у человека сформировался ингибирующий иммунный ответ на фактор свертывания крови.

[00100] E82. Способ согласно E81, где ингибирующий иммунный ответ включает выработку ингибирующих антител к фактору свертывания крови.

[00101] E83. Способ согласно E82, где титр ингибирующих антител перед введением составляет по меньшей мере приблизительно 0,6 единицы Бетезда (BU).

[00102] E84. Способ согласно E82 или E83, где титр ингибирующих антител перед введением составляет по меньшей мере приблизительно 1 BU, по меньшей мере приблизительно 2 BU, по меньшей мере приблизительно 3 BU, по меньшей мере приблизительно 4 BU, по меньшей мере приблизительно 5 BU, по меньшей мере приблизительно 6 BU, по меньшей мере приблизительно 7 BU, по меньшей мере приблизительно 10 BU, по меньшей мере приблизительно 20 BU, по меньшей мере приблизительно 30 BU, по меньшей мере приблизительно 40 BU, по меньшей мере приблизительно 50 BU, по меньшей мере приблизительно 100 BU, по меньшей мере приблизительно 150 BU или по меньшей мере приблизительно 200 BU.

[00103] E85. Способ согласно любому из E82–E84, где титр ингибирующих антител перед введением составляет по меньшей мере приблизительно 5 BU.

[00104] E86. Способ согласно любому из E82–E85, где титр ингибирующих антител после введения составляет менее приблизительно 0,6 BU.

[00105] E87. Способ согласно любому из E82–E86, где титр ингибирующих антител после введения составляет 0 BU.

[00106] E88. Способ согласно любому из E79–E87, где иммунный ответ включает клеточно-опосредованный иммунный ответ.

[00107] E89. Способ согласно E88, где клеточно-опосредованный иммунный ответ включает высвобождение цитокина.

[00108] E90. Способ согласно E88, где введение обеспечивает снижение уровня цитокина у человека по сравнению с уровнем у человека после предшествующего лечения с помощью полипептида, состоящего из полипептида FVIII.

[00109] E91. Способ согласно любому из E75–E90, где экспрессия одной или нескольких толерогенных молекул увеличивается после введения по сравнению с уровнем экспрессии одной или нескольких толерогенных молекул перед введением.

[00110] E92. Способ согласно любому из E75–E91, где у человека ранее диагностировали наличие сформированного ингибирующего иммунного ответа на фактор свертывания крови за по меньшей мере приблизительно 3 месяца, по меньшей мере приблизительно 6 месяцев, по меньшей мере приблизительно 12 месяцев, по меньшей мере приблизительно 18 месяцев, по меньшей мере приблизительно 24 месяца, по меньшей мере приблизительно 30 месяцев, по меньшей мере приблизительно 36 месяцев, по меньшей мере приблизительно 42 месяца, по меньшей мере приблизительно 48 лет, по меньшей мере приблизительно 54 месяца, по меньшей мере приблизительно 60 месяцев, по меньшей мере приблизительно 6 лет, по меньшей мере приблизительно 7 лет, по меньшей мере приблизительно 8 лет или по меньшей мере приблизительно 10 лет до введения.

[00111] E93. Способ согласно любому из E75–E92, где у человека ранее диагностировали наличие сформированного ингибирующего иммунного ответа на фактор свертывания крови за по меньшей мере приблизительно 5 лет до введения.

[00112] E94. Способ согласно любому из E75–E93, где время индуцирования толерантности составляет от приблизительно 1 до приблизительно 24 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 23 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 22 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 21 недели, от приблизительно 2 до приблизительно 20 недель, от приблизительно 2 до

приблизительно 19 недель, от приблизительно 2 до приблизительно 18 недель, от приблизительно 2 до приблизительно 17 недель, от приблизительно 3 до приблизительно 16 недель, от приблизительно 3 до приблизительно 15 недель, от приблизительно 3 до приблизительно 14 недель, от приблизительно 3 до приблизительно 13 недель, от приблизительно 4 до приблизительно 12 недель, от приблизительно 4 до приблизительно 11 недель, от приблизительно 4 до приблизительно 10 недель, от приблизительно 4 до приблизительно 9 недель, от приблизительно 5 до приблизительно 8 недель, от приблизительно 5 до приблизительно 7 недель, от приблизительно 5 до приблизительно 6 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 12 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 11 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 10 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 9 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 8 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 7 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 6 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 5 недель или от приблизительно 1 до приблизительно 4 недель.

[00113] E95. Способ согласно любому из E75–E94, где время индуцирования толерантности составляет менее приблизительно 24 недель, менее приблизительно 23 недель, менее приблизительно 22 недель, менее приблизительно 21 недели, менее приблизительно 20 недель, менее приблизительно 19 недель, менее приблизительно 18 недель, менее приблизительно 17 недель, менее приблизительно 16 недель, менее приблизительно 15 недель, менее приблизительно 14 недель, менее приблизительно 13 недель, менее приблизительно 12 недель, менее приблизительно 11 недель, менее приблизительно 10 недель, менее приблизительно 9 недель, менее приблизительно 8 недель, менее приблизительно 7 недель, менее приблизительно 6 недель, менее приблизительно 5 недель, менее приблизительно 4 недель, менее приблизительно 3 недель, менее приблизительно 2 недель или менее приблизительно 1 недели.

[00114] E96. Способ согласно любому из E75–E95, где время индуцирования толерантности составляет от приблизительно 4 до приблизительно 12 недель.

[00115] E97. Способ согласно любому из E75–E96, где время

индуцирования толерантности составляет приблизительно 4 недели.

[00116] E98. Способ согласно любому из E75–E97, где человек получает терапию интерфероном.

[00117] E99. Способ согласно любому из E75–E98, где человек получает противовирусную терапию.

[00118] E100. Способ согласно любому из E75–E91, где у человека имеется генетический полиморфизм, ассоциированный с увеличенным уровнем TNF- $\alpha$ .

[00119] E101. Способ согласно E100, где полиморфизм представляет собой TNF -308G>A.

[00120] E102. Способ согласно любому из E75–E101, где у человека имеется генетический полиморфизм, ассоциированный с увеличенным уровнем IL10.

[00121] E103. Способ согласно E102, где полиморфизм представляет собой аллель 134 микросателлита IL10G.

[00122] E104. Способ согласно любому из E75–E103, где человеку назначался прием фактора свертывания крови в течение менее 150 дней (ED).

[00123] E105. Способ согласно E104, где человеку назначался прием в течение менее 50 ED.

[00124] E106. Способ согласно E105, где человеку назначался прием в течение менее 20 ED.

[00125] E107. Способ согласно любому из E75–E106, где фактор свертывания крови представляет собой фактор VIII (FVIII).

[00126] E108. Способ согласно любому из E75–E107, где химерный белок содержит FVIII-Fc.

[00127] E109. Способ согласно любому из E75–E108, где химерный белок содержит часть FVIII и часть VWF, где часть FVIII включает полипептид FVIII или его фрагмент, где часть VWF включает полипептид VWF или его фрагмент, где часть FVIII соединена с первой Fc-областью, где часть VWF соединена со второй Fc-областью, и где первая Fc-область и вторая Fc-область связаны друг с другом.

[00128] E110. Способ согласно любому из E75–E109, где полипептид FVIII включает зрелый FVIII.

[00129] E111. Способ согласно любому из E75–E109, где

полипептид FVIII включает FVIII с делецией домена В.

[00130] E112. Способ согласно E110, где FVIII с делецией домена В содержит делецию всего домена В из FVIII или его части.

[00131] E113. Способ согласно E110 или E111, где FVIII с делецией домена В содержит делецию аминокислотных остатков 746–1648 зрелого FVIII.

[00132] E114. Способ согласно любому из E109–E113, где полипептид VWF включает фрагмент VWF, содержащий домен D' и домен D3 из VWF.

[00133] E115. Способ согласно любому из E75–E114, где химерный белок дополнительно содержит компонент, обеспечивающий продление периода полужизни.

[00134] E116. Способ согласно E115, где компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, включает альбумин или его фрагмент, компонент, связывающий альбумин, последовательность PAS, последовательность NAP, трансферрин или его фрагмент, полиэтиленгликоль (PEG), полисиаловую кислоту, гидроксипропилкрахмал (HES), их производное или любую их комбинацию.

[00135] E116. Способ согласно E115 или E116, где компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, вставлен в фактор свертывания крови.

[00136] E117. Способ согласно E115 или E116, где компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, вставлен между фактором свертывания крови и Fc-областью.

[00137] E118. Способ согласно любому из E75–E118, где эффективное количество химерного белка, содержащего FVIII и Fc-область, составляет от приблизительно 50 МЕ/кг до приблизительно 300 МЕ/кг.

[00138] E120. Способ согласно E119, где эффективное количество химерного белка, содержащего FVIII-Fc, составляет от приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 300 МЕ/кг, от приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 200 МЕ/кг, от приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 290 МЕ/кг, от приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 280 МЕ/кг, от приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 270 МЕ/кг, от

приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 260 МЕ/кг, от  
 приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 250 МЕ/кг, от  
 приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 240 МЕ/кг, от  
 приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 230 МЕ/кг, от  
 приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 220 МЕ/кг, от  
 приблизительно 100 МЕ/кг до приблизительно 210 МЕ/кг, от  
 приблизительно 150 МЕ/кг до приблизительно 300 МЕ/кг, от  
 приблизительно 150 МЕ/кг до приблизительно 290 МЕ/кг, от  
 приблизительно 150 МЕ/кг до приблизительно 280 МЕ/кг, от  
 приблизительно 150 МЕ/кг до приблизительно 270 МЕ/кг, от  
 приблизительно 150 МЕ/кг до приблизительно 260 МЕ/кг, от  
 приблизительно 150 МЕ/кг до приблизительно 250 МЕ/кг, от  
 приблизительно 150 МЕ/кг до приблизительно 240 МЕ/кг, от  
 приблизительно 140 МЕ/кг до приблизительно 250 МЕ/кг, от  
 приблизительно 130 МЕ/кг до приблизительно 260 МЕ/кг, от  
 приблизительно 120 МЕ/кг до приблизительно 270 МЕ/кг, от  
 приблизительно 110 МЕ/кг до приблизительно 280 МЕ/кг, от  
 приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 290 МЕ/кг, от  
 приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 280 МЕ/кг, от  
 приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 270 МЕ/кг, от  
 приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 260 МЕ/кг, от  
 приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 250 МЕ/кг, от  
 приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 240 МЕ/кг, от  
 приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 230 МЕ/кг, от  
 приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 220 МЕ/кг или от  
 приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 210 МЕ/кг.

[00139] E121. Способ согласно E119 или E120, где  
 эффективное количество химерного белка, содержащего FVIII-Fc,  
 составляет приблизительно 50 МЕ/кг, приблизительно 60 МЕ/кг,  
 приблизительно 70 МЕ/кг, приблизительно 80 МЕ/кг, приблизительно  
 90 МЕ/кг, приблизительно 100 МЕ/кг, приблизительно 110 МЕ/кг,  
 приблизительно 120 МЕ/кг, приблизительно 130 МЕ/кг,  
 приблизительно 140 МЕ/кг, приблизительно 150 МЕ/кг,  
 приблизительно 160 МЕ/кг, приблизительно 170 МЕ/кг,  
 приблизительно 180 МЕ/кг, приблизительно 190 МЕ/кг,  
 приблизительно 200 МЕ/кг, приблизительно 225 МЕ/кг,

приблизительно 250 МЕ/кг, приблизительно 275 МЕ/кг или приблизительно 300 МЕ/кг.

[00140] E122. Способ согласно любому из E75-E121, где эффективное количество химерного белка составляет приблизительно 200 МЕ/кг, и его вводят ежедневно.

[00141] E123. Способ согласно любому из E75-E122, где химерный белок, содержащий FVIII-Fc, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим приблизительно два дня, приблизительно три дня, приблизительно четыре дня, приблизительно пять дней, приблизительно шесть дней, приблизительно семь дней, приблизительно восемь дней, приблизительно девять дней, приблизительно десять дней, приблизительно 11 дней, приблизительно 12 дней, приблизительно 13 дней, приблизительно 14 дней, приблизительно 15 дней, приблизительно 16 дней, приблизительно 17 дней, приблизительно 18 дней, приблизительно 19 дней, приблизительно 20 дней, приблизительно 21 день, приблизительно 22 дня, приблизительно 23 дня или приблизительно 24 дня.

[00142] E124. Способ согласно любому из E75-E121, где химерный белок, содержащий FVIII-Fc, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим от приблизительно 1 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 13 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 12 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 11 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 10 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 9 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 8 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 7 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 6 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 5 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 4 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 3 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 2 дней, от приблизительно 2 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 3 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 4 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 5 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 6 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 7 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 8 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 9

до приблизительно 14 дней, от приблизительно 10 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 11 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 12 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 13 до приблизительно 14 дней или от приблизительно 5 до приблизительно 10 дней.

[00143] E125. Способ согласно любому из E75-E122, где химерный белок, содержащий FVIII-Fc, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим от приблизительно 3 дней до приблизительно 5 дней.

[00144] E126. Способ согласно любому из E75-E125, где химерный белок содержит часть FVIII, часть VWF, первую Fc-область и вторую Fc-область;

[00145] где часть FVIII включает полипептид FVIII или его фрагмент;

[00146] где часть VWF включает полипептид VWF или его фрагмент;

[00147] где часть FVIII соединена с первой Fc-областью;

[00148] где часть VWF соединена со второй Fc-областью; и

[00149] где первая Fc-область и вторая Fc-область связаны друг с другом.

[00150] E127. Способ согласно любому из E75-E126, где у человека ранее сформировался ингибирующий иммунный ответ на FVIII.

[00151] E128. Способ согласно E127, где ингибирующий иммунный ответ на FVIII сформировался в ответ на продукт FVIII, выбранный из группы, состоящей из ADVATE®, RECOMBINATE®, KOGENATE FS®, HELIXATE FS®, XYNTHA/REFACTO AB®, HEMOFIL-M®, MONARC-M®, MONOCLATE-P®, HUMATE-P®, ALPHANATE®, KOATE-DVI®, AFSTYLA® и NYATE:C®.

[00152] E129. Способ согласно E128, где ингибирующий иммунный ответ на FVIII сформировался в ответ на рекомбинантный продукт FVIII.

[00153] E130. Способ согласно любому из E75-E129, где у человека имеется связанное с кровотечением состояние, выбранное из группы, состоящей из связанного с кровотечением нарушения свертываемости крови, гемартроза, мышечного кровотечения,

внутриротового кровотечения, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, внутриротового кровоизлияния, травмы, черепно-мозговой травмы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома кости, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве и кровотечения во влагалище подвздошно-поясничной мышцы.

[00154] E131. Способ согласно E130, где связанное с кровотечением нарушение свертываемости крови представляет собой гемофилию А.

[00155] E132. Способ согласно любому из E75-E131, где эффективное количество химерного белка вводят в двух или более дозах в течение дня.

[00156] E133. Способ согласно любому из E75-E132, где схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы химерного белка, составляющей от приблизительно 50 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг.

[00157] E134. Способ согласно любому из E75-E133, где снижающуюся дозу вводят один раз в день, один раз в два дня или три раза в неделю.

[00158] E135. Способ согласно любому из E75-E134, где снижающуюся дозу вводят в течение по меньшей мере приблизительно 1 недели, по меньшей мере приблизительно 2 недель, по меньшей мере приблизительно 3 недель, по меньшей мере приблизительно 4 недель, по меньшей мере приблизительно 5 недель, по меньшей мере приблизительно 6 недель, по меньшей мере приблизительно 7 недель, по меньшей мере приблизительно 8 недель, по меньшей мере приблизительно 9 недель, по меньшей мере приблизительно 10 недель, по меньшей мере приблизительно 11 недель, по меньшей мере приблизительно 12 недель, по меньшей мере приблизительно 13 недель, по меньшей мере приблизительно 14 недель, по меньшей мере приблизительно 15 недель, по меньшей мере приблизительно 16 недель, по меньшей мере приблизительно 17 недель, по меньшей мере приблизительно 18 недель, по меньшей мере приблизительно 19 недель, по меньшей мере приблизительно 20 недель, по меньшей мере

мере приблизительно 21 недели, по меньшей мере приблизительно 22 недель, по меньшей мере приблизительно 23 недель, по меньшей мере приблизительно 24 недель, по меньшей мере приблизительно 25 недель, по меньшей мере приблизительно 26 недель, по меньшей мере приблизительно 27 недель, по меньшей мере приблизительно 28 недель, по меньшей мере приблизительно 29 недель, по меньшей мере приблизительно 30 недель, по меньшей мере приблизительно 31 недели или по меньшей мере приблизительно 32 недель.

[00159] E136. Способ согласно любому из E74–E135, где схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы химерного белка, составляющей приблизительно 50 МЕ/кг или приблизительно 100 МЕ/кг.

[00160] E137. Способ согласно любому из E75–E136, где схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы химерного белка, составляющей приблизительно 50 МЕ/кг, один раз в день от недели 1 до недели 6 после индуцирования иммунологической толерантности.

[00161] E138. Способ согласно любому из E75–E136, где схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы химерного белка, составляющей приблизительно 100 МЕ/кг, один раз в день от недели 1 до недели 6 после индуцирования иммунологической толерантности.

[00162] E139. Способ согласно E137 или E138, где схема со снижением дозы дополнительно включает введение снижающейся дозы химерного белка, составляющей приблизительно 50 МЕ/кг или приблизительно 100 МЕ/кг, один раз в два дня от недели 6 до недели 12 после индуцирования иммунологической толерантности.

[00163] E140. Способ согласно E139, где схема со снижением дозы дополнительно включает введение снижающейся дозы химерного белка, составляющей приблизительно 50 МЕ/кг или приблизительно 100 МЕ/кг, один раз в два дня с 12-й недели по 16-ю неделю.

[00164] E141. Способ согласно любому из E77–E140, где профилактическая доза составляет от приблизительно 50 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг.

[00165] E142. Способ согласно любому из E77–E141, где профилактическую дозу вводят приблизительно один раз в неделю,

приблизительно два раза в неделю, приблизительно три раза в неделю или приблизительно три раза в неделю.

[00166] E143. Способ согласно любому из E79-E91 и 94-E142, где химерный белок, содержащий фактор свертывания крови и Fc-область, вводят человеку через менее приблизительно 1 день, менее приблизительно 2 дня, менее приблизительно 3 дня, менее приблизительно 4 дня, менее приблизительно 5 дней, менее приблизительно 6 дней, менее приблизительно 7 дней, менее приблизительно 2 недели, менее приблизительно 3 недели, менее приблизительно 4 недели, менее приблизительно 2 месяца, менее приблизительно 3 месяца, менее приблизительно 4 месяца, менее приблизительно 5 месяцев, менее приблизительно 6 месяцев или менее приблизительно 1 год после измерения уровня ингибирующего иммунного ответа у человека.

[00167] E144. Способ согласно любому из E79-E91 и 94-E143, где химерный белок, содержащий фактор свертывания крови и Fc-область, вводят человеку через менее приблизительно 1 день после измерения уровня ингибирующего иммунного ответа у человека.

[00168] E145. Способ согласно любому из E79-E91 и 94-E144, где химерный белок, содержащий фактор свертывания крови и Fc-область, вводят человеку через менее приблизительно 12 часов после измерения уровня ингибирующего иммунного ответа у человека.

[00169] E146. Способ согласно любому из E1-E145, где введение химерного белка приводит к снижению времени индуцирования толерантности у человека по сравнению со временем индуцирования толерантности у человека после лечения с помощью фактора свертывания крови в отдельности.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[00170] Фиг. 1 представляет собой блок-схему, в общих чертах описывающую способы, используемые для исследования эффектов rFVIIIFc в отношении связывания FcγR, его интернализации, опосредованной им передачи сигнала и выработки цитокинов и изменений экспрессии генов, а также последующих взаимодействий с T-клетками и эффектов в их отношении *in vitro*.

[00171] Фиг. 2A-2C представляют собой графические

представления относительных уровней экспрессии Fcγ-рецепторов CD16 (фиг. 2A), CD32 (фиг. 2B) и CD64 (фиг. 2C) на поверхности макрофагов и дендритных клеток после обработки иммунными комплексами с пероксидазой хрена (HRP-IC; положительный контроль), IgG1, рекомбинантным FVIII (rFVIII) или слитым белком rFVIII-Fc (rFVIII-Fc). Звездочки (\*) указывают на степень значимости (n=3; \*\* = P ≤ 0,01, \*\*\* = P ≤ 0,005, значимость для HRP-IC по сравнению с другими видами обработки не показана).

[00172] Фиг. 3A-3C представляют собой графические представления, иллюстрирующие относительную передачу сигнала после обработки с помощью rFVIII или rFVIII-Fc. На фиг. 3A показана передача сигнала, измеренная по фосфорилированию Syk, в клеточной линии моноцитов THP-1 ("THP-1"), моноцитах, моноцитарных макрофагах из периферической крови ("макрофагах") и моноцитарных дендритных клетках из периферической крови, обработанных с помощью HRP-IC, IgG1, rFVIII или rFVIII-Fc в течение 15 минут. На фиг. 3B показано относительное фосфорилирование Syk в макрофагах, обработанных с помощью rFVIII-Fc ("WT"), мутантного rFVIII-Fc, который не способен связываться с неонатальным Fc-рецептором ("FcRn-мутант"), или мутантного rFVIII-Fc, который не способен связываться с FcγR ("FcγR-мутант"). На фиг. 3C показана относительная выработка провоспалительных цитокинов, интерлейкина 1b (IL-1b), IL-6, IL-8, IL-10 и фактора некроза опухоли альфа (TNFα), в макрофагах через двадцать четыре часа после обработки с помощью HRP-IC, IgG1, rFVIII или rFVIII-Fc.

[00173] На фиг. 4 показан статус относительного фосфорилирования фосфатазы-1, содержащей домен области гомологии Src 2 (SHP1), pSHP2, фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат-5-фосфатазы 1 (SHIP1) и pSHIP2 через одну минуту, пять минут и тридцать минут после обработки с помощью rFVIII или rFVIII-Fc. Звездочки (\*) указывают на степень значимости (n=3; \*\*P ≤ 0,01, \*\*\*P ≤ 0,005).

[00174] Фиг. 5A-5M представляют собой графические представления паттернов экспрессии генов в толерогенных макрофагах после обработки с помощью rFVIII или rFVIII-Fc. Фиг.

5А–5В представляют собой диаграммы Венна, иллюстрирующие распределение генов, экспрессия которых была значительно снижена (фиг. 5А), и распределение генов, экспрессия которых была значительно повышена (фиг. 5В), в моноцитарных макрофагах, обработанных с помощью IgG1, rFVIII или rFVIIIIFc в течение шести часов (n=3). Фиг. 5С–5Г представляют собой графики, демонстрирующие относительные уровни экспрессии различных генов путей NRF2 и метаболизма липидов, таких как ген гемоксигеназы 1 (Hmox1; фиг. 5С), активируемого пролифератором пероксисом рецептора гамма (PPAR $\gamma$ ; фиг. 5D), липопротеинлипазы (LPL; фиг. 5E), белка раннего ростового ответа 2 (EGR2; фиг. 5F) и представителя 4A1 семейства транспортеров органических анионов, являющегося переносчиком растворенных веществ (SLC04A1; фиг. 5G); CD206 через 6 часов (фиг. 5I) и 12 часов (фиг. 5J) после обработки и аргиназы 1 (ARG1; фиг. 5L), измеренные с помощью количественной ПЦР после обработки с помощью rFVIII или rFVIIIIFc. Звездочки (\*) указывают на степень значимости (n=8; \*P  $\leq$  0,05, \*\*P  $\leq$  0,01, \*\*\*P  $\leq$  0,005; фиг. 5С–5G). Фиг. 5K и 5M представляют собой графики, демонстрирующие количество клеток, экспрессирующих CD206, определенное с помощью проточной цитометрии. Кроме того, было обнаружено, что rFVIIIIFc-обученные макрофаги проявляют характерный M2-подобный фенотип (фиг. 5I–5M). В частности, макрофаги, обработанные с помощью rFVIIIIFc, характеризовались более высокой относительной экспрессией CD206 (также известного как маннозный рецептор С-типа 1; MRC1), чем клетки, обработанные с помощью rFVIII, через 6 часов (фиг. 5I) и через 24 часа (фиг. 5J), и макрофаги, обработанные с помощью rFVIIIIFc, характеризовались более высокой относительной экспрессией ARG1, чем клетки, обработанные с помощью rFVIII, через 24 часа (фиг. 5M).

[00175] Фиг. 6А представляет собой блок-схему, схематически иллюстрирующую способы, используемые для определения эффектов обработки с помощью rFVIIIIFc в отношении дифференцировки Т-клеток. Фиг. 6В представляет собой графическое представление процентной доли регуляторных Т-клеток через шесть дней после обработки макрофагов или дендритных клеток с помощью IgG1

(контроль), rFVIII или rFVIIIIFc в течение 24 часов с последующим совместным культивированием с необученными CD4-положительными Т-клетками. Фиг. 6С представляет собой графическое представление процентной доли регуляторных Т-клеток после культивирования необученных CD4-положительных Т-клеток в средах, кондиционированных макрофагами или дендритными клетками, предварительно обработанными с помощью IgG1, rFVIII или rFVIIIIFc.

[00176] Фиг. 7 представляет собой иллюстрацию предполагаемого механизма индуцируемой rFVIIIIFc дифференцировки регуляторных Т-клеток.

[00177] Фиг. 8 представляет собой иллюстрацию предполагаемых эффектов rFIXFc в отношении макрофагов.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[00178] В настоящем изобретении предусмотрены способы индуцирования иммунологической толерантности у человека с гемофилией, включающие введение человеку эффективного количества химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, или композиции, содержащей фактор свертывания крови и Fc-область, где у человека выработался ингибитор фактора свертывания крови и имело место отсутствие ответа на один или несколько предшествующих курсов терапии для формирования иммунологической толерантности к фактору свертывания крови. В некоторых вариантах осуществления фактор свертывания крови выбран из группы, состоящей из фактора VII (FVII), фактора VIIa (FVIIa), FVIII, FIX, фактора X (FX), фактора фон Виллебранда (VWF) и любой их комбинации.

#### I. ОПРЕДЕЛЕНИЯ

[00179] Следует отметить, что форма единственного числа объекта относится к одному или нескольким таким объектам; например, под "нуклеотидной последовательностью" понимают одну или несколько нуклеотидных последовательностей. В связи с этим формы единственного числа, термины "один или несколько" и "по меньшей мере один" могут использоваться в данном документе взаимозаменяемо.

[00180] Кроме того, "и/или" при использовании в данном

документе следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, подразумевается, что термин "и/или", используемый в данном документе в такой фразе, как "А и/или В", включает "А и В", "А или В", "А" (отдельно) и "В" (отдельно). Аналогично, подразумевается, что термин "и/или", используемый в такой фразе, как "А, В и/или С", охватывает каждый из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

[00181] Следует понимать, что во всех случаях, когда аспекты описываются в данном документе с формулировкой "содержащий", также предусмотрены другие аналогичные аспекты, описываемые терминами "состоящий из" и/или "состоящий по сути из".

[00182] Если не определено иное, то все используемые в данном документе технические и научные термины имеют то же значение, которое обычно понимает средний специалист в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press обеспечивают специалиста общим словарем многих терминов, используемых в настоящем изобретении.

[00183] Единицы измерения, приставки и символы обозначены в их форме, принятой согласно Международной системе единиц (SI). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, аминокислотные последовательности записаны слева направо в направлении от амино- к карбокси-концу. Приведенные в данном документе заголовки не являются ограничениями различных аспектов настоящего изобретения, которые могут обеспечиваться посредством ссылки на описание в целом. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, более полно определяются посредством ссылки на настоящее описание во всей его полноте.

[00184] Термин "приблизительно" используется в данном

документе в значении примерно, порядка, около или ориентировочно. Если термин "приблизительно" используется в сочетании с числовым диапазоном, то он модифицирует данный диапазон, расширяя границы выше и ниже изложенных числовых значений. Таким образом, "приблизительно 10–20" означает "от приблизительно 10 до приблизительно 20". В целом, термин "приблизительно" может модифицировать числовое значение выше и ниже заявленного значения с отклонением, например на 10 процентов, вверх или вниз (выше или ниже).

[00185] "Введение", как используется в данном документе, означает предоставление фармацевтически приемлемой композиции, например, содержащей химерный белок, раскрытый в данном документе, субъекту фармацевтически приемлемым путем. Пути введения могут быть внутривенными, например, внутривенная инъекция и внутривенная инфузия. Дополнительные пути введения включают, например, подкожное, внутримышечное, пероральное, назальное и легочное введение. Химерный белок и гибридные белки можно вводить в составе фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одно вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления фактор свертывания крови и/или Fc, например, химерный белок, вводят человеку посредством генной терапии, например, где один или несколько полинуклеотидов, кодирующих фактор свертывания крови и/или Fc, например, химерный белок, вводят человеку, и фактор свертывания крови и/или Fc, например, химерный белок, экспрессируются у человека.

[00186] "Лечить", "лечение" или "осуществление лечения", как используется в данном документе, относятся, например, к уменьшению тяжести заболевания или состояния; уменьшению продолжительности течения состояния; облегчению или устранению одного или нескольких симптомов, ассоциированных с заболеванием или состоянием; обеспечению благоприятных эффектов у субъекта с заболеванием или состоянием, при этом не обязательно с излечением заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления термин "лечить" или "осуществлять лечение" означает уменьшение или устранение ингибирующего иммунного ответа на фактор свертывания крови, например, FVIII.

[00187] Термин "индуцировать иммунологическую толерантность", используемый в данном документе, означает вызывать у субъекта состояние, при котором у субъекта отсутствует иммунный ответ при введении определенного стимулирующего вещества, например, при введении фактора свертывания крови (например, FVIII). Данное состояние иммунологической толерантности может быть временным, при котором у субъекта имеется толерантность к стимулирующему веществу в течение определенного периода времени, или длительным, при котором у субъекта имеется толерантность к стимулирующему веществу в течение неопределенного периода времени. В определенных вариантах осуществления у субъекта сохраняется толерантность к стимулирующему веществу до тех пор, пока субъекту вводят стимулирующее вещество. Например, в некоторых вариантах осуществления у субъекта сохраняется толерантность к фактору свертывания крови до тех пор, пока субъекту вводят химерный белок, содержащий фактор свертывания крови и Fc-область, с заданным интервалом между введениями доз. В других вариантах осуществления у субъекта сохраняется толерантность к фактору свертывания крови даже после прекращения введения химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область.

[00188] В некоторых вариантах осуществления иммунный ответ представляет собой "ингибирующий" иммунный ответ. Ингибирующий иммунный ответ представляет собой иммунный ответ, который блокирует или ослабляет эффекты стимулирующего вещества, например, при введении фактора свертывания крови (например, FVIII). В определенных вариантах осуществления ингибирующий иммунный ответ включает выработку ингибирующих антител к стимулирующему веществу, например, ингибирующих антител к FVIII. Используемый в данном документе термин "ингибирующее антитело" или "ингибирующие антитела" относится к антителам, которые блокируют или ослабляют функцию антигена, распознаваемого антителом. Например, ингибирующее антитело к FVIII блокирует или ослабляет активность FVIII. В некоторых вариантах осуществления ингибирующее антитело связывает антиген, например FVIII, и

ускоряет выведение антигена из сыворотки крови человека. Если антитело ускоряет выведение антигена, антитело уменьшает период полужизни антигена.

[00189] Ингибирующие иммунные ответы можно определить с помощью лабораторных тестов, таких как тест Бетезда или тест Бетезда в модификации Nijmegen. Уровень, составляющий по меньшей мере 0,6 единицы Бетезда (BU), может указывать на наличие ингибирующего иммунного ответа. Уровень, составляющий по меньшей мере 5 BU, может указывать на наличие высокого титра ингибитора. Можно также использовать измерения восстановления активности и периода полужизни *in vivo* при болюсной инфузии фактора свертывания крови. В определенных вариантах осуществления иммунологическая толерантность наблюдается, если титр ингибирующих антител у человека составляет менее приблизительно 5 BU, менее приблизительно 4 BU, менее приблизительно 3 BU, менее приблизительно 2 BU, менее приблизительно 1 BU, менее приблизительно 0,9 BU, менее приблизительно 0,8 BU, менее приблизительно 0,7 BU, менее приблизительно 0,6 BU, менее приблизительно 0,5 BU, менее приблизительно 0,4 BU, менее приблизительно 0,3 BU, менее приблизительно 0,2 BU, менее приблизительно 0,1 BU или приблизительно 0 BU. В одном конкретном варианте осуществления иммунологическая толерантность наблюдается, если титр ингибирующих антител у человека составляет менее приблизительно 0,6 BU.

[00190] В других вариантах осуществления иммунный ответ включает клеточно-опосредованный иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления клеточно-опосредованный иммунный ответ включает высвобождение цитокина. В определенных вариантах осуществления цитокины, высвобождаемые в ходе клеточно-опосредованного иммунного ответа, могут быть выбраны из группы, состоящей из IL-12, IL-4, IL-17, TNF- $\alpha$  и любой их комбинации.

[00191] В других вариантах осуществления иммунный ответ включает клинический симптом, выбранный из группы, состоящей из повышенной склонности к кровотечению, высокого потребления фактора свертывания крови, отсутствия ответа на терапию фактором свертывания крови, пониженной эффективности терапии фактором

свертывания крови, сокращенного периода полужизни фактора свертывания крови и любой их комбинации.

[00192] В других вариантах осуществления иммунологическую толерантность измеряют по увеличению периода полужизни фактора свертывания крови после введения человеку. В некоторых вариантах осуществления иммунологическая толерантность индуцируется, когда период полужизни фактора свертывания крови увеличивается на по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 15%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 25%, по меньшей мере приблизительно 30%, по меньшей мере приблизительно 35%, по меньшей мере приблизительно 40%, по меньшей мере приблизительно 45%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 100%, по меньшей мере приблизительно 150%, по меньшей мере приблизительно 200%, по меньшей мере приблизительно 300%, по меньшей мере приблизительно 400%, по меньшей мере приблизительно 500% или по меньшей мере приблизительно 1000% по сравнению с периодом полужизни фактора свертывания крови, вводимого человеку до индуцирования иммунологической толерантности. В определенных вариантах осуществления период полужизни фактора свертывания крови составляет по меньшей мере приблизительно 3 часа, по меньшей мере приблизительно 4 часа, по меньшей мере приблизительно 5 часов, по меньшей мере приблизительно 6 часов, по меньшей мере приблизительно 7 часов, по меньшей мере приблизительно 8 часов, по меньшей мере приблизительно 9 часов, по меньшей мере приблизительно 10 часов, по меньшей мере приблизительно 11 часов, по меньшей мере приблизительно 12 часов, по меньшей мере приблизительно 13 часов, по меньшей мере приблизительно 14 часов или по меньшей мере приблизительно 15 часов после индуцирования иммунологической толерантности.

[00193] Используемый в данном документе термин "сопоставимый" означает, что сравниваемая скорость или уровень, полученные в результате применения, например, химерного белка, равны, практически равны эталонной скорости или уровню или сходны с ними. Используемый в данном документе термин "сходный"

означает, что сравниваемая скорость или уровень отличаются на не более чем 10% или не более чем 15% от эталонной скорости или уровня (например, скорость образования FXa химерным белком, состоящим по сути из двух Fc-частей и процессированного FVIII или состоящим из них, где процессированный FVIII слит с одной Fc из двух Fc-частей). Термин "практический равный" означает, что сравниваемая скорость или уровень отличаются на не более чем на 0,01%, 0,5% или 1% от эталонной скорости или уровня.

[00194] Гемостатическое нарушение, как используется в данном документе, означает генетически наследуемое или приобретенное состояние, характеризующееся склонностью к кровоизлиянию, спонтанно либо в результате травмы, из-за нарушенной способности или неспособности образовывать фибриновый сгусток. Примеры таких нарушений включают формы гемофилии. Тремя основными формами являются гемофилия А (дефицит фактора VIII), гемофилия В (дефицит фактора IX или "болезнь Кристмаса") и гемофилия С (дефицит фактора XI, легкая склонность к кровотечению). Другие гемостатические нарушения включают, например, болезнь фон Виллебранда, дефицит фактора XI (дефицит PTA), дефицит фактора XII, дефициты или аномалии структуры фибриногена, протромбина, фактора V, фактора VII, фактора X или фактора XIII, синдром Бернара-Сулье, который представляет собой дефект или дефицит GPIb. GPIb, рецептор VWF, может быть дефектным и приводить к невозможности образования первичного сгустка (первичного гемостаза) и повышенной склонности к кровотечению, а также к тромбастении Гланцманна-Негели (тромбастении Гланцманна). При печеночной недостаточности (острой и хронической формах) имеет место недостаточная выработка печенью факторов коагуляции; это может увеличивать риск кровотечения.

[00195] "Площадь под кривой зависимости концентрации в плазме крови от времени (AUC)", как используется в данном документе, соответствует термину, общепринятому в области фармакологии, и определяется на основании скорости и степени абсорбции FVIII после введения. AUC определяют за определенный период времени, такой как 12, 18, 24, 36, 48 или 72 часа, или

экстраполируют до бесконечности на основании наклона кривой. Если в данном документе не указано иное, AUC определяют для бесконечности. Определение AUC можно проводить у одного субъекта или в популяции субъектов, для которой рассчитывают среднее значение.

[00196] Под термином "прокоагулянтная активность" подразумевается способность фактора коагуляции, например, FVIII, согласно настоящему изобретению принимать участие в каскаде свертывания крови, заменяя нативный фактор коагуляции, например, нативный FVIII. Доступны несколько анализов для измерения активности фактора VIII, в том числе одностадийный анализ свертывания крови (активированное частичное тромбопластиновое время; aPTT), время образования тромбина (TGA) и ротационная тромбоэластометрия (ROTEM®).

[00197] Все из ссылок на нумерацию аминокислот иммуноглобулинов или фрагментов или областей иммуноглобулинов основаны на Kabat *et al.* 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U. S. Department of Public Health, Bethesda; MD, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. (Рецептор FcRn был выделен у некоторых видов млекопитающих, в том числе у людей. Последовательности FcRn человека, FcRn крысы и FcRn мыши являются известными (Story *et al.*, *J. Exp. Med.* 180: 2377 (1994), включенная в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Fc может содержать CH2- и CH3-домены иммуноглобулина с шарнирной областью иммуноглобулина или без нее. Иллюстративные варианты Fc представлены в WO 2004/101740 и WO 2006/074199, включенных в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00198] "Гибридные" полипептиды и белки, как используется в данном документе, означают комбинацию химерного белка со вторым полипептидом. Химерный белок и второй полипептид в гибридной молекуле могут быть связаны друг с другом посредством белок-белковых взаимодействий, таких как взаимодействия между зарядами или гидрофобные взаимодействия. Химерный белок и второй полипептид в гибридной молекуле могут быть связаны друг с другом посредством дисульфидных или других ковалентных связей.

Гибридные молекулы описаны в WO 2004/101740 и WO 2006/074199, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. См. также патенты США № 7404956 и 7348004, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Второй полипептид может представлять собой вторую копию одного и того же химерного белка или может представлять собой неидентичный химерный белок.

[00199] Как используется в данном документе, "аминокислоту, соответствующую", "сайт, соответствующий" или "эквивалентную аминокислоту" в последовательности белка идентифицируют путем выравнивания для максимального увеличения идентичности или сходства между первой последовательностью белка, например, последовательностью FVIII, и второй последовательностью белка, например, второй последовательностью FVIII. Номер, используемый для идентификации эквивалентной аминокислоты во второй последовательности белка, соответствует номеру, используемому для идентификации соответствующей аминокислоты в первой последовательности белка.

[00200] Используемый в данном документе термин "сайт вставки" относится к номеру аминокислотного остатка в полипептиде (как правило, зрелом полипептиде; например, зрелом полипептиде FVIII) или его фрагменте, варианте или производном, который находится непосредственно выше положения, в которое может быть вставлен гетерологичный компонент. "Сайт вставки" указывается под номером, при этом номер представляет собой номер аминокислоты в указанной последовательности белка, которой соответствует сайт вставки, находящейся непосредственно с N-концевой стороны от положения вставки. Например, фраза "FVIII содержит гетерологичный компонент в сайте вставки, который соответствует аминокислоте 745" в данной последовательности указывает на то, что гетерологичный компонент расположен между двумя аминокислотами, соответствующими аминокислоте 745 и аминокислоте 746 в этой последовательности. Однако специалист в данной области сможет легко идентифицировать соответствующее положение в любом варианте указанного белка, и настоящее изобретение не ограничено вставками, произведенными

исключительно в вариантах, конкретно раскрытых в данном документе. Скорее, раскрытые в данном документе вставки могут быть произведены в любых родственных вариантах или их фрагментах, обладающих активностью, в положении, соответствующем положению в раскрытых в данном документе вариантах.

[00201] Используемая в данном документе фраза "непосредственно ниже аминокислоты" относится к положению прямо после концевой карбоксильной группы аминокислоты. Аналогично, фраза "непосредственно выше аминокислоты" относится к положению прямо после концевой аминогруппы аминокислоты. Следовательно, используемая в данном документе фраза "между двумя аминокислотами в сайте вставки" относится к положению, в котором гетерологичный компонент (например, компонент, обеспечивающий продление периода полужизни) вставлен между двумя соседними аминокислотами.

[00202] Термины "вставленный", "вставлен", "вставлен в" или грамматически родственные термины, используемые в данном документе, относятся к положению гетерологичного компонента (например, компонента, обеспечивающего продление периода полужизни) в слитом полипептиде относительно аналогичного положения в указанном белке (например, белке FVIII). Специалистам в данной области будет понятно, как идентифицировать соответствующие положения для вставки относительно других полипептидных последовательностей, например, других вариантов FVIII. Используемые в данном документе термины относятся к характеристикам рекомбинантного полипептида, раскрытого в данном документе, и не указывают, не подразумевают или не предполагают каких-либо способов или процесса, с помощью которых был получен слитый полипептид. Например, по отношению к слитому полипептиду, предусмотренному в данном документе, фраза "гетерологичный компонент вставлен непосредственно ниже остатка 745 полипептида FVIII" означает, что слитый полипептид содержит гетерологичный компонент непосредственно ниже аминокислоты, соответствующей аминокислоте 745 в конкретном варианте FVIII, например, ограничен аминокислотами, соответствующими аминокислотам 745 и 746 варианта FVIII.

[00203] "Слитый" или "химерный" белок содержит первую аминокислотную последовательность, соединенную со второй аминокислотной последовательностью, с которой она естественным образом не соединена в природе. Аминокислотные последовательности, которые в обычных условиях существуют в отдельных белках, могут быть объединены в слитом полипептиде, или аминокислотные последовательности, которые в обычных условиях существуют в одном и том же белке, могут быть размещены в новом порядке в слитом полипептиде, например, при слиянии домена FVIII согласно настоящему изобретению с Fc-доменом Ig. Слитый белок создают, например, путем химического синтеза или путем создания полинуклеотида, в котором области пептида кодируются в необходимом взаиморасположении, и обеспечения его трансляции. Слитый белок может дополнительно содержать вторую аминокислотную последовательность, связанную с первой аминокислотной последовательностью с помощью ковалентной непептидной связи или нековалентной связи.

[00204] Термины "гетерологичный" и "гетерологичный компонент" означают, что полинуклеотид, полипептид или другой компонент получены из объекта, отличающегося от того объекта, с которым его сравнивают. Например, гетерологичный полипептид может быть синтетическим или полученным от другого вида, из другого типа клеток индивидуума или из того же или другого типа клеток различных индивидуумов. В одном аспекте гетерологичный компонент представляет собой полипептид, слитый с другим полипептидом с получением слитого полипептида или белка. В другом аспекте гетерологичный компонент представляет собой молекулу, не являющуюся полипептидом, как, например, PEG, конъюгированный с полипептидом или белком.

[00205] Термины "соединенный" и "слитый", используемые в данном документе, относятся к первой аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, ковалентно или нековалентно присоединенной соответственно ко второй аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности. Первая аминокислотная или нуклеотидная последовательность может быть непосредственно присоединена ко

второй аминокислотной или нуклеотидной последовательности или объединена с ней, или, в качестве альтернативы, промежуточная последовательность может ковалентно соединять первую последовательность со второй последовательностью. Термин "соединенный" означает не только слияние первой аминокислотной последовательности со второй аминокислотной последовательностью на С-конце или N-конце, но также включает вставку всей первой аминокислотной последовательности (или второй аминокислотной последовательности) между любыми двумя аминокислотами во второй аминокислотной последовательности (или соответственно в первой аминокислотной последовательности). В одном варианте осуществления первая аминокислотная последовательность соединена со второй аминокислотной последовательностью с помощью пептидной связи или линкера. Первая нуклеотидная последовательность может быть соединена со второй нуклеотидной последовательностью с помощью фосфодиэфирной связи или линкера. Линкер может представлять собой пептид или полипептид (в случае полипептидных цепей), или нуклеотид или цепь нуклеотидов (в случае цепей нуклеотидов), или любой химический компонент (как в случае полипептидных, так и полинуклеотидных цепей). Термин "соединенный" также обозначается дефисом (-).

[00206] Используемый в данном документе термин "связанный с" относится к ковалентной или нековалентной связи, образованной между первой цепью аминокислот и второй цепью аминокислот. В одном варианте осуществления термин "связанный с" означает ковалентную непептидную связь или нековалентную связь. Эта связь может быть обозначена двоеточием, т. е. (:). В другом варианте осуществления он означает ковалентную связь, за исключением пептидной связи. Например, аминокислота цистеин содержит тиольную группу, которая может образовывать дисульфидную связь или дисульфидный мостик с тиольной группой во втором цистеиновом остатке. В большинстве встречающихся в природе молекул IgG области CN1 и CL связаны дисульфидной связью, а две тяжелые цепи связаны двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих 239 и 242 согласно системе нумерации по Kabat (положение 226 или 229, система нумерации EU). Примеры

ковалентных связей включают без ограничения пептидную связь, металлическую связь, водородную связь, дисульфидную связь, сигма-связь, пи-связь, дельта-связь, гликозидную связь, агостическую связь, банановую связь, диполярную связь, обратную донорно-акцепторную Рi-связь, двойную связь, тройную связь, четверную связь, пятерную связь, шестерную связь, конъюгацию, гиперконъюгацию, ароматичность, гаптическую или антисвязывание. Неограничивающие примеры нековалентной связи включают ионную связь (например, катионную пи-связь или солевую связь), металлическую связь, водородную связь (например, диводородную связь, диводородный комплекс, низкобарьерную водородную связь или симметричную водородную связь), силу Ван-дер-Ваальса, лондоновскую дисперсионную силу, механическую связь, галогенную связь, ауофильность, интеркаляцию, стэкинг, энтропийную силу или химическую полярность.

[00207] Используемый в данном документе термин "сайт расщепления" или "сайт ферментативного расщепления" относится к сайту, распознаваемому ферментом. Определенные сайты ферментативного расщепления включают сайт внутриклеточного процессинга. В одном варианте осуществления полипептид содержит сайт ферментативного расщепления, расщепляемый ферментом, который активируется во время каскада свертывания крови, так что расщепление таких сайтов происходит в месте образования сгустка. Примеры таких сайтов включают, например, сайты, распознаваемые тромбином, фактором XIa или фактором Ха. Другие сайты ферментативного расщепления известны из уровня техники.

[00208] Используемый в данном документе термин "сайт процессинга" или "сайт внутриклеточного процессинга" относится к типу сайта ферментативного расщепления в полипептиде, который является мишенью для ферментов, функционирующих после трансляции полипептида. В одном варианте осуществления такие ферменты функционируют во время транспорта из полости аппарата Гольджи в транс-отдел аппарата Гольджи. Ферменты внутриклеточного процессинга расщепляют полипептиды перед секрецией белка из клетки. Примеры таких сайтов процессинга включают, например, сайты, на которые нацеливается семейство PASE/фуриновых (где

PACE является аббревиатурой для фермента, расщепляющего белок в месте спаренных основных аминокислот) эндопептидаз. Эти ферменты локализованы на мембране аппарата Гольджи и расщепляют белки с карбоксиконцевой стороны от мотива последовательности Arg-[любой остаток]-(Lys или Arg)-Arg. Как используется в данном документе, семейство "фуриновых" ферментов включает, например, PCSK1 (также известный как PC1/PC3), PCSK2 (также известный как PC2), PCSK3 (также известный как фурин или PACE), PCSK4 (также известный как PC4), PCSK5 (также известный как PC5 или PC6), PCSK6 (также известный как PACE4) или PCSK7 (также известный как PC7/LPC, PC8 или SPC7). Другие сайты процессинга известны из уровня техники.

[00209] Следует понимать, что в конструкциях, которые включают более одного сайта процессинга или расщепления, такие сайты могут быть одинаковыми или разными.

[00210] "Подвергаемый процессингу линкер", как используется в данном документе, относится к линкеру, содержащему по меньшей мере один сайт внутриклеточного процессинга, который описан в данном документе в другом месте.

[00211] "Исходный уровень", как используется в данном документе, представляет собой наиболее низкий измеренный уровень в плазме крови указанного анализируемого вещества, например, фактора свертывания крови (например, FVIII) или антитела (например, антитела к FVIII), у субъекта до введения дозы. Уровни в плазме крови можно измерять в два момента времени до введения дозы: при скрининговом визите и непосредственно перед введением дозы.

[00212] "Эквивалентная доза", как используется в данном документе, означает ту же самую дозу активности фактора свертывания крови, например, активности FVIII, выраженную в международных единицах независимо от молекулярной массы рассматриваемого полипептида. Например, одна международная единица (ME) активности FVIII соответствует примерно количеству FVIII в одном миллилитре нормальной плазмы крови человека. Доступны несколько анализов для измерения активности фактора свертывания крови, в том числе анализ с хромогенным субстратом согласно Европейской фармакопее и одностадийный анализ

свертывания крови.

[00213] "Интервал между введением доз", как используется в данном документе, означает количество времени, проходящее между введением субъекту нескольких доз. Сравнение интервалов между введениями доз можно проводить у одного субъекта или в популяции субъектов, а затем можно рассчитать среднее значение, полученное в популяции.

[00214] "Субъект", как используется в данном документе, означает индивидуума-человека. Субъектом может быть пациент, который в настоящее время страдает от нарушения свертываемости крови или, как ожидается, будет нуждаться в таком лечении. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее никогда не получал лечение фактором свертывания крови (т. е. субъектом является субъект, ранее не получавший лечение, или пациент, ранее не получавший лечение). В некоторых вариантах осуществления субъектом является плод, и способы включают введение композиции или химерного белка матери плода, и введение субъекту происходит от матери через плаценту. В некоторых вариантах осуществления субъектом является ребенок или взрослый. В некоторых вариантах осуществления субъектом является ребенок возрастом менее одного года, менее двух лет, менее трех лет, менее четырех лет, менее пяти лет, менее шести лет, менее семи лет, менее восьми лет, менее девяти лет, менее десяти лет, менее одиннадцати лет или менее двенадцати лет. В некоторых вариантах осуществления возраст ребенка составляет менее одного года. В некоторых вариантах осуществления у субъекта, являющегося ребенком или взрослым, развивается нарушение свертываемости крови, где начало проявления симптомов нарушения свертываемости крови наступает в возрасте от одного года. В некоторых вариантах осуществления введение композиции или химерного белка субъекту является достаточным для предупреждения, ингибирования или снижения темпов развития иммунного ответа, выбранного из гуморального иммунного ответа, клеточно-опосредованного иммунного ответа или как гуморального иммунного ответа, так и клеточно-опосредованного иммунного ответа на фактор свертывания крови. В некоторых вариантах осуществления субъектом является

человек, и у субъекта ранее сформировался иммунный ответ на фактор свертывания крови. В некоторых вариантах осуществления у человека ранее имело место отсутствие ответа на терапию для формирования иммунологической толерантности. В некоторых вариантах осуществления предшествующая терапия для формирования иммунологической толерантности включает введение высокой дозы фактора свертывания крови. В других вариантах осуществления предшествующая терапия для формирования иммунологической толерантности включает введение одного или нескольких иммунодепрессантов. В одном варианте осуществления предшествующая терапия для формирования иммунологической толерантности представляла собой протокол Мальме. В другом варианте осуществления предшествующая терапия для формирования иммунологической толерантности представляла собой Боннский протокол.

[00215] "Терапевтическая доза", "доза", "эффективная доза" или "количество дозы", как используется (взаимозаменяемо) в данном документе, означают дозу, которая обеспечивает достижение терапевтической цели, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления "терапевтическая доза" означает дозу, которая обеспечивает индуцирование иммунологической толерантности у субъекта. В определенных вариантах осуществления "терапевтическая доза" означает дозу, которая обеспечивает индуцирование иммунологической толерантности у субъекта в течение определенного периода времени индуцирования толерантности, например, в течение 12 недель после введения первой дозы.

[00216] Также в настоящее изобретение включены фрагменты или варианты полипептидов и любая их комбинация. Термины "фрагмент" или "вариант" в отношении полипептидов, применяемых в способах согласно настоящему изобретению, включают любые полипептиды, которые сохраняют по меньшей мере некоторые из свойств эталонного полипептида (например, аффинность связывания FcRn для FcRn-связывающего домена или варианта Fc или коагуляционную активность для FVIII). Фрагменты полипептидов включают фрагменты, полученные посредством протеолиза, а также

фрагменты, полученные посредством делеции, в дополнение к конкретным фрагментам антитела, обсуждаемым в данном документе в другом месте, но не включают встречающийся в природе полноразмерный полипептид (или зрелый полипептид). Варианты полипептидных связывающих доменов или связывающих молекул, применяемых в способах согласно настоящему изобретению, включают фрагменты, описанные выше, а также полипептиды с аминокислотными последовательностями, измененными в результате аминокислотных замен, делеций или вставок. Варианты могут быть встречающимися в природе или не встречающимися в природе. Не встречающиеся в природе варианты можно получить с помощью известных из уровня техники методик мутагенеза. Вариантные полипептиды могут содержать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, делеции или добавления.

[00217] "Консервативная аминокислотная замена" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток замещается аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих сходные боковые цепи, были определены в уровне техники, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые 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 замещается другой аминокислотой из того же семейства боковых цепей, то замена считается консервативной. В другом варианте осуществления нить из аминокислот можно подвергнуть консервативному замещению сходной в структурном отношении нитью, которая отличается порядком расположения и/или составом представителей семейства боковых цепей.

[00218] Термин "процентная идентичность последовательностей" между двумя полинуклеотидными или

полипептидными последовательностями относится к числу идентичных совпадающих положений, общих для последовательностей, в окне сравнения с учетом добавлений или делеций (т. е. гэпов), которые должны быть введены для оптимального выравнивания двух последовательностей. Совпадающим положением является любое положение, в котором идентичный нуклеотид или идентичная аминокислота присутствуют как в целевой, так и в эталонной последовательностях. Гэпы, присутствующие в целевой последовательности, не учитываются, поскольку гэпы не представляют собой нуклеотиды или аминокислоты. Аналогично, гэпы, присутствующие в эталонной последовательности, не учитываются, поскольку учитываются нуклеотиды или аминокислоты целевой последовательности, а не нуклеотиды или аминокислоты эталонной последовательности.

[00219] Процентное значение идентичности последовательностей рассчитывают путем определения числа положений, в которых идентичные аминокислотный остаток или основание нуклеиновой кислоты присутствуют в обеих последовательностях, с получением числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения и умножения результата на 100 с получением процентного значения идентичности последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процентной идентичности последовательностей между двумя последовательностями можно выполнять с применением общедоступного программного обеспечения как для применения онлайн, так и для скачивания. Подходящие программы системы программного обеспечения доступны из различных источников и предназначены для выравнивания как белковых, так и нуклеотидных последовательностей. Одной подходящей программой для определения процентной идентичности последовательностей является `bl2seq`, часть пакета программ BLAST, доступного на веб-сайте BLAST Национального центра биотехнологической информации правительства США (`blast.ncbi.nlm.nih.gov`). `Bl2seq` выполняет сравнение между двумя последовательностями с помощью алгоритма BLASTN либо BLASTP. BLASTN применяют для сравнения последовательностей нуклеиновых кислот, тогда как BLASTP

применяют для сравнения аминокислотных последовательностей. Другими подходящими программами являются, например, Needle, Stretcher, Water или Matcher, являющиеся частью пакета биоинформатических программ EMBOSS, а также доступные от Европейского института биоинформатики (ЕБИ) по адресу [www.ebi.ac.uk/Tools/psa](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa).

[00220] Каждая из разных областей в одной целевой полинуклеотидной или полипептидной последовательности, выравненной относительно эталонной полинуклеотидной или полипептидной последовательности, может характеризоваться своей собственной процентной идентичностью последовательности. Следует отметить, что значение процентной идентичности последовательностей округляют до ближайших десятых. Например, 80,11, 80,12, 80,13 и 80,14 округляют в меньшую сторону до 80,1, тогда как 80,15, 80,16, 80,17, 80,18 и 80,19 округляют в большую сторону до 80,2. Также следует отметить, что значение длины всегда будет целым числом.

[00221] Специалисту в данной области будет понятно, что построение выравнения последовательностей для расчета процентной идентичности последовательностей не ограничивается бинарными сравнениями двух последовательностей, основанными исключительно на первичных данных о последовательностях. Выравнивания последовательностей можно получить из множественного выравнивания последовательностей. Одной подходящей программой для построения множественного выравнивания последовательностей является ClustalW2, доступная по адресу [www.clustal.org](http://www.clustal.org). Другой подходящей программой является MUSCLE, доступная по адресу [www.drive5.com/muscle/](http://www.drive5.com/muscle/). ClustalW2 и MUSCLE альтернативно доступны, например, от ЕБИ.

[00222] Также следует понимать, что выравнивания последовательностей можно построить с помощью интеграции данных о последовательностях с данными из неоднородных источников, такими как структурные данные (например, кристаллографические структуры белков), функциональные данные (например, локализация мутаций) или филогенетические данные. Подходящей программой, с помощью которой интегрируют неоднородные данные с построением

множественного выравнивания последовательностей, является T-Coffee, доступная на [www.tcoffee.org](http://www.tcoffee.org) и альтернативно доступная, например, от EBI. Также следует понимать, что конечное выравнивание, применяемое для расчета процентной идентичности последовательностей, можно проверять либо автоматически, либо вручную.

[00223] Варианты полинуклеотидов могут содержать изменения в кодирующих областях, некодирующих областях или как в тех, так и в других. В одном варианте осуществления варианты полинуклеотидов содержат изменения, которые приводят к "молчащим" заменам, добавлениям или делециям, однако не изменяют свойства или виды активностей кодируемого полипептида. В другом варианте осуществления нуклеотидные варианты получены с помощью "молчащих" замен из-за вырожденности генетического кода. В других вариантах осуществления предусмотрены варианты, в которых 5-10, 1-5 или 1-2 аминокислоты подвергнуты замене, делеции или добавлению в любой комбинации. Варианты полинуклеотидов можно получать в силу ряда причин, например, для оптимизации экспрессии кодонов для конкретного хозяина (замена кодонов в мРНК человека другими, например, кодонами хозяина-бактерии, такого как *E. coli*).

[00224] Встречающиеся в природе варианты называются "аллельными вариантами" и относятся к одной из нескольких альтернативных форм гена, занимающей определенный локус на хромосоме организма (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). Эти аллельные варианты могут отличаться на уровне полинуклеотида и/или полипептида и включены в настоящее изобретение. В качестве альтернативы, не встречающиеся в природе варианты можно получить с помощью методик мутагенеза или путем прямого синтеза.

[00225] С применением известных способов белковой инженерии и технологии рекомбинантных ДНК можно создать варианты с улучшением или изменением характеристик полипептидов. Например, одну или несколько аминокислот можно подвергать делеции с N-конца или C-конца секретируемого белка без существенной потери биологической функции. В Ron *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268: 2984-

2988 (1993), включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, сообщаются варианты белки KGF, обладающие гепаринсвязывающей активностью даже после делеции 3, 8 или 27 аминокислотных остатков на амино-конце. Аналогично, интерферон гамма демонстрировал более высокую, до десятикратной, активность после делеции 8-10 аминокислотных остатков на карбоксильном конце этого белка. (Dobeli et al., *J. Biotechnology* 7:199-216 (1988), включенная в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00226] Более того, достаточное количество доказательств демонстрирует, что варианты часто сохраняют биологическую активность, сходную с таковой у встречающегося в природе белка. Например, Gaule и соавторы (*J. Biol. Chem* 268:22105-22111 (1993), включенная в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте) провели обширный мутационный анализ цитокина IL-1a человека. Они использовали случайный мутагенез для создания более 3500 отдельных мутантов IL-1a в среднем с 2,5 аминокислотными заменами на вариант по всей длине молекулы. Множественные мутации исследовали в каждом возможном аминокислотном положении. Исследователи обнаружили, что "[б]ольшая часть молекулы может быть изменена с оказанием небольшого эффекта в отношении [связывания или биологической активности]". (См. реферат.) Фактически только 23 уникальные аминокислотные последовательности из более чем 3500 исследованных нуклеотидных последовательностей обеспечивали белок, активность которого значительно отличалась от дикого типа.

[00227] Как указано выше, варианты полипептидов включают, например, модифицированные полипептиды. Модификации включают, например, ацетилирование, ацилирование, ADP-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение компонента-гема, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, сшивание, циклизацию, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование

ковалентных поперечных связей, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование GPI-якоря, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристоилирование, окисление, пегилирование (Mei et al., *Blood* 116:270-79 (2010), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селеноилирование, сульфатирование, опосредованное транспортной РНК добавление аминокислот к белкам, такое как аргинилирование, и убиквитинирование. В некоторых вариантах осуществления FVIII является модифицированным, например, пегилированным, в любом удобном положении. В некоторых вариантах осуществления FVIII является пегилированным по доступной для взаимодействия аминокислоте FVIII, например, по доступному для взаимодействия цистеину, который может представлять собой сконструированный цистеин. Id. В некоторых вариантах осуществления модифицированный FVIII, например, пегилированный FVIII, является химерным или слитым FVIII.

[00228] Термин "ниже" относится к нуклеотидной последовательности, которая расположена в направлении 3' относительно эталонной нуклеотидной последовательности. "Ниже" также может относиться к пептидной последовательности, которая расположена с С-концевой стороны от эталонной пептидной последовательности.

[00229] Термин "выше" относится к нуклеотидной последовательности, которая расположена в направлении 5' относительно эталонной нуклеотидной последовательности. "Выше" также может относиться к пептидной последовательности, которая расположена с N-концевой стороны от эталонной пептидной последовательности.

[00230] Используемый в данном документе термин "регуляторная область" относится к нуклеотидным последовательностям, расположенным выше (5'-некодирующие последовательности), в пределах или ниже (3'-некодирующие последовательности) кодирующей области, и которые влияют на транскрипцию, процессинг РНК, стабильность или трансляцию

связанной кодирующей области. Регуляторные области могут включать промоторы, лидерные последовательности трансляции, интроны, последовательности, узнающие сайты полиаденилирования, сайты процессинга РНК, сайты связывания эффекторов и структуры "стебель-петля". Если кодирующая область предназначена для экспрессии в эукариотической клетке, сигнал полиаденилирования и последовательность терминации транскрипции обычно будут размещены в направлении 3' относительно кодирующей последовательности.

[00231] Полинуклеотид, который кодирует продукт гена, например, полипептид, может содержать промотор и/или другие элементы, осуществляющие контроль транскрипции или трансляции, функционально связанные с одной или несколькими кодирующими областями. Другие элементы, осуществляющие контроль транскрипции, помимо промотора, например, энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминации транскрипции, также могут быть функционально связаны с кодирующей областью для управления экспрессией продукта гена.

[00232] Специалистам в данной области известны разнообразные области, осуществляющие контроль транскрипции. Они включают без ограничения области, осуществляющие контроль транскрипции, функционирующие в клетках позвоночных, такие как без ограничения промоторные и энхансерные сегменты цитомегаловирусов (промотор гена немедленного раннего ответа вместе с интроном А), вируса обезьян 40 (промотор гена раннего ответа) и ретровирусов (таких как вирус саркомы Рауса). Другие области, осуществляющие контроль транскрипции, включают области, полученные из генов позвоночных, таких как гены актина, белка теплового шока, бычьего гормона роста и  $\beta$ -глобина кролика, а также другие последовательности, способные осуществлять контроль экспрессии генов в эукариотических клетках. Дополнительные подходящие области, осуществляющие контроль транскрипции, включают тканеспецифичные промоторы и энхансеры, а также индуцируемые лимфокинами промоторы (например, промоторы, индуцируемые интерферонами или интерлейкинами).

[00233] Аналогично, разнообразные элементы, осуществляющие

контроль трансляции, известны средним специалистам в данной области. Они включают без ограничения сайты связывания рибосомы, кодоны инициации и терминации трансляции и элементы, полученные из пикорнавирусов (в частности, сайт внутренней посадки рибосомы или IRES, также называемый CITE-последовательностью).

[00234] Термин "экспрессия", используемый в данном документе, относится к процессу, посредством которого из полинуклеотида продуцируется продукт гена, например, РНК или полипептид.

[00235] "Вектор" относится к любому носителю для клонирования нуклеиновой кислоты и/или ее переноса в клетку-хозяина. Вектор может представлять собой репликон, к которому может быть присоединен другой сегмент нуклеиновой кислоты так, чтобы обеспечить репликацию присоединенного сегмента. "Репликон" относится к любому генетическому элементу (например, плазмиде, фагу, космиде, хромосоме, вирусу), который функционирует как автономная единица репликации *in vivo*, т. е. способен реплицироваться 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 количество векторов, в том числе, например, плазмиды, модифицированные вирусы эукариот или модифицированные вирусы бактерий. Вставка полинуклеотида в подходящий вектор может быть осуществлена посредством лигирования соответствующих полинуклеотидных фрагментов в выбранный вектор, который имеет комплементарные "липкие" концы.

[00236] Термин "плазмида" относится к внехромосомному элементу, зачастую несущему ген, который не является частью центрального метаболизма клетки, и обычно имеющему форму кольцевых двухцепочечных молекул ДНК. Такие элементы могут представлять собой автономно реплицирующиеся последовательности, интегрирующиеся в геном последовательности, фаговые или нуклеотидные последовательности, линейные, кольцевые или суперспиральные, из одно- или двухцепочечной ДНК или РНК, полученных из любого источника, в которых ряд нуклеотидных

последовательностей был соединен или рекомбинирован в уникальную конструкцию, которая способна вводить промоторный фрагмент и последовательность ДНК, кодирующую выбранный продукт гена, вместе с соответствующей 3'-нетранслируемой последовательностью в клетку.

[00237] Векторы на основе вирусов эукариот, которые можно применять, включают без ограничения векторы на основе аденовируса, векторы на основе ретровируса, векторы на основе аденоассоциированного вируса и векторы на основе поксвируса, например, векторы на основе вируса осповакцины, векторы на основе бакуловируса или векторы на основе герпесвируса. Невирусные векторы включают плазмиды, липосомы, электрически заряженные липиды (цитофектины), комплексы ДНК-белок и биополимеры.

[00238] "Клонирующий вектор" относится к "репликону", который представляет собой нуклеиновую кислоту единичной длины, которая реплицируется последовательно и которая содержит точку начала репликации, такую как плаزمид, фаг или космида, к которой может быть присоединен другой сегмент нуклеиновой кислоты так, чтобы обеспечить репликацию присоединенного сегмента. Определенные клонирующие векторы способны реплицироваться в одном типе клеток, например, бактериях, а экспрессироваться в другом, например, эукариотических клетках. Клонирующие векторы обычно содержат одну или несколько последовательностей, которые можно применять для отбора клеток, содержащих вектор, и/или один или несколько сайтов множественного клонирования для вставки последовательностей нуклеиновых кислот, представляющих интерес.

[00239] Термин "вектор экспрессии" относится к носителю, сконструированному с возможностью обеспечения экспрессии вставленной последовательности нуклеиновой кислоты после введения в клетку-хозяина. Вставленная последовательность нуклеиновой кислоты находится в функциональной связи с регуляторными областями, как описано выше.

[00240] Векторы вводят в клетки-хозяева с помощью способов, хорошо известных из уровня техники, например, посредством

трансфекции, электропорации, микроинъекции, трансдукции, слияния клеток, DEAE-декстрана, осаждения фосфатом кальция, липофекции (слияния лизосом), применения генной пушки или транспортера ДНК-вектора.

[00241] "Выделенный" полипептид или его фрагмент, вариант или производное относятся к полипептиду, который не находится в своем естественном окружении. Никакого конкретного уровня очистки не требуется. Например, выделенный полипептид может быть просто извлечен из его нативной или природной среды. Полученные рекомбинантным путем полипептиды и белки, экспрессирующиеся в клетках-хозяевах, считаются выделенными для целей настоящего изобретения, равно как и нативные или рекомбинантные полипептиды, которые были отделены, фракционированы или частично или в значительной степени очищены с помощью любой подходящей методики.

[00242] Используемый в данном документе термин "клетка-хозяин" относится к клетке или популяции клеток, содержащих или способных содержать рекомбинантную нуклеиновую кислоту. Клетками-хозяевами могут быть прокариотические клетки (например, *E. coli*), или, в качестве альтернативы, клетками-хозяевами могут быть эукариотические клетки, например, клетки грибов (например, клетки дрожжей, таких как *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* или *Schizosaccharomyces pombe*) и различные клетки животных, такие как клетки насекомых (например, Sf-9) или клетки млекопитающих (например, HEK293F, CHO, COS-7, NIH-3T3).

[00243] "Объем распределения в равновесном состоянии (Vss)", как используется в данном документе, имеет то же значение, что и термин, используемый в области фармакологии, который означает кажущееся пространство (объем), в котором распределяется лекарственное средство.  $V_{ss}$  = количество лекарственного средства в организме, деленное на концентрацию в плазме крови в равновесном состоянии.

## **II. СПОСОБЫ СОГЛАСНО НАСТОЯЩЕМУ ИЗОБРЕТЕНИЮ**

[00244] Настоящее изобретение основано на обнаружении того, что фактор свертывания крови, слитый с Fc-областью, можно применять для индуцирования иммунологической толерантности у

человека с гемофилией, где у человека выработался ингибитор фактора свертывания крови и имело место отсутствие ответа на один или более предшествующих курсов терапии для формирования иммунологической толерантности. Хотя ранее полагали, что лечение химерным белком FVIII-Fc может предотвращать иммунный ответ на лечение с помощью FVIII, в настоящем изобретении неожиданно было обнаружено, что лечение химерным белком на основе фактора свертывания крови-Fc может ослаблять ранее сформированный иммунный ответ у человека, у которого имело место отсутствие ответа на предшествующие курсы терапии для формирования иммунологической толерантности. Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрены способы индуцирования иммунологической толерантности у человека, включающие введение человеку эффективного количества композиции, содержащей фактор свертывания крови и Fc, или химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, или полинуклеотида, кодирующего их.

[00245] Другой аспект настоящего изобретения относится к способу индуцирования иммунологической толерантности у человека с гемофилией, включающему (1) введение человеку эффективного количества композиции, содержащей фактор свертывания крови и Fc, или химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, где эффективное количество композиции или химерного белка обеспечивает индуцирование иммунологической толерантности у человека; и (2) после индуцирования иммунологической толерантности введение человеку композиции или химерного белка по схеме со снижением дозы. В определенных вариантах осуществления индуцирование иммунологической толерантности происходит, если титр ингибирующих антител у человека составляет менее приблизительно 0,6 BU. В определенных вариантах осуществления индуцирование иммунологической толерантности происходит, если титр ингибирующих антител у человека составляет менее приблизительно 0,6 BU и имеет место 60% восстановление активности фактора свертывания крови, как наблюдается по плазме крови. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения способ дополнительно включает (3) после схемы со

снижением дозы введение человеку профилактической дозы фактора свертывания крови. В определенных аспектах человек не получал лечение с помощью предшествующей терапии для формирования иммунологической толерантности к фактору свертывания крови. Композицию или химерный белок, содержащие фактор свертывания крови и Fc-область, можно вводить человеку в любой момент времени, когда было определено, что у человека сформировался ингибирующий иммунный ответ, например, после измерения уровня ингибирующего иммунного ответа у человека. В других вариантах осуществления композицию или химерный белок можно вводить человеку, у которого еще не сформировался один или несколько ингибирующих иммунных ответов, для предупреждения формирования ингибирующего иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления композицию или химерный белок вводят человеку, у которого имеется высокая вероятность (например, семейный анамнез, генетическая предрасположенность или наличие биомаркера) формирования ингибирующего иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает измерение уровня ингибирующего иммунного ответа или вероятности формирования ингибирующего иммунного ответа перед введением. В некоторых вариантах осуществления композицию или химерный белок, содержащие фактор свертывания крови и Fc-область, вводят человеку через менее приблизительно 1 день, менее приблизительно 2 дня, менее приблизительно 3 дня, менее приблизительно 4 дня, менее приблизительно 5 дней, менее приблизительно 6 дней, менее приблизительно 7 дней, менее приблизительно 2 недели, менее приблизительно 3 недели, менее приблизительно 4 недели, менее приблизительно 2 месяца, менее приблизительно 3 месяца, менее приблизительно 4 месяца, менее приблизительно 5 месяцев, менее приблизительно 6 месяцев, менее приблизительно 1 год, менее приблизительно 2 года, менее приблизительно 3 года, менее приблизительно 4 года или менее приблизительно 5 лет после того, как было определено, что у человека сформировался ингибирующий иммунный ответ, или что у человека имеется вероятность формирования ингибирующего иммунного ответа, например, после измерения уровня ингибирующего иммунного ответа или вероятности

формирования ингибирующего иммунного ответа у человека. В определенных вариантах осуществления композицию или химерный белок, содержащие фактор свертывания крови и Fc-область, вводят человеку сразу после определения того, что у человека сформировался ингибирующий иммунный ответ, или что у человека имеется вероятность формирования ингибирующего иммунного ответа, например, после измерения уровня ингибирующего иммунного ответа или вероятности формирования ингибирующего иммунного ответа у человека. В конкретных вариантах осуществления композицию или химерный белок, содержащие фактор свертывания крови и Fc-область, вводят человеку через менее приблизительно 5 минут, менее приблизительно 10 минут, менее приблизительно 15 минут, менее приблизительно 20 минут, менее приблизительно 30 минут, менее приблизительно 45 минут, менее приблизительно 1 час, менее приблизительно 2 часа, менее приблизительно 3 часа, менее приблизительно 4 часа, менее приблизительно 5 часов, менее приблизительно 6 часов, менее приблизительно 7 часов, менее приблизительно 8 часов, менее приблизительно 9 часов, менее приблизительно 10 часов, менее приблизительно 11 часов, менее приблизительно 12 часов, приблизительно 18 часов или менее приблизительно 24 часа после определения того, что у человека сформировался ингибирующий иммунный ответ, или что у человека имеется вероятность формирования ингибирующего иммунного ответа, например, после измерения уровня ингибирующего иммунного ответа или вероятности формирования ингибирующего иммунного ответа у человека. В конкретных вариантах осуществления композицию или химерный белок, содержащие фактор свертывания крови и Fc-область, вводят человеку через приблизительно 5 минут, приблизительно 10 минут, приблизительно 15 минут, приблизительно 20 минут, приблизительно 30 минут, приблизительно 45 минут, приблизительно 1 час, приблизительно 2 часа, приблизительно 3 часа, приблизительно 4 часа, приблизительно 5 часов, приблизительно 6 часов, приблизительно 7 часов, приблизительно 8 часов, приблизительно 9 часов, приблизительно 10 часов, приблизительно 11 часов, приблизительно 12 часов, приблизительно 18 часов или приблизительно 24 часа после определения того, что

у человека сформировался ингибирующий иммунный ответ, или что у человека имеется вероятность формирования ингибирующего иммунного ответа, например, после измерения уровня ингибирующего иммунного ответа или вероятности формирования ингибирующего иммунного ответа у человека. В определенных вариантах осуществления композицию или химерный белок, содержащие фактор свертывания крови и Fc-область, вводят человеку через менее приблизительно 1 день после определения того, что у человека сформировался ингибирующий иммунный ответ, или что у человека имеется вероятность формирования ингибирующего иммунного ответа, например, после измерения уровня ингибирующего иммунного ответа или вероятности формирования ингибирующего иммунного ответа у человека.

[00246] Индуцирование иммунного ответа можно продолжать до тех пор, пока уровень ингибитора не станет ниже определенного уровня или пока ингибиторы не будут обнаруживаться. В определенных вариантах осуществления период индуцирования может продолжаться в течение по меньшей мере приблизительно 24 недель, по меньшей мере приблизительно 26 недель, по меньшей мере приблизительно 28 недель, по меньшей мере приблизительно 30 недель, по меньшей мере приблизительно 32 недель, по меньшей мере приблизительно 34 недель, по меньшей мере приблизительно 36 недель, по меньшей мере приблизительно 38 недель, по меньшей мере приблизительно 40 недель, по меньшей мере приблизительно 42 недель, по меньшей мере приблизительно 44 недель, по меньшей мере приблизительно 46 недель, по меньшей мере приблизительно 48 недель, по меньшей мере приблизительно 50 недель, по меньшей мере приблизительно 52 недель, по меньшей мере приблизительно 54 недель, по меньшей мере приблизительно 56 недель, по меньшей мере приблизительно 58 недель, по меньшей мере приблизительно 60 недель, по меньшей мере приблизительно 62 недель, по меньшей мере приблизительно 64 недель, по меньшей мере приблизительно 66 недель, по меньшей мере приблизительно 68 недель, по меньшей мере приблизительно 70 недель. В конкретном варианте осуществления период индуцирования составляет менее 60 недель.

[00247] Ингибирующий иммунный ответ, лечение которого

осуществляют с помощью способов согласно настоящему изобретению, может включать любой ответ в организме человека, который отрицательно влияет на один или несколько эффектов лечения фактором свертывания крови. В некоторых вариантах осуществления ингибирующий иммунный ответ включает выработку ингибирующих антител к фактору свертывания крови, например, ингибирующих антител к FVIII. В определенных вариантах осуществления способ согласно настоящему изобретению дополнительно включает измерение титра одного или нескольких ингибирующих антител у человека до (например, на исходном уровне) и после введения эффективного количества композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область, или полинуклеотида, кодирующего их. В некоторых вариантах осуществления титр ингибирующих антител перед введением (например, на исходном уровне) составляет по меньшей мере приблизительно 0,6 единицы Бетезда (BU). В определенных вариантах осуществления титр ингибирующих антител перед введением (например, на исходном уровне) составляет по меньшей мере приблизительно 1 BU, по меньшей мере приблизительно 2 BU, по меньшей мере приблизительно 3 BU, по меньшей мере приблизительно 4 BU, по меньшей мере приблизительно 5 BU, по меньшей мере приблизительно 6 BU, по меньшей мере приблизительно 7 BU, по меньшей мере приблизительно 10 BU, по меньшей мере приблизительно 20 BU, по меньшей мере приблизительно 30 BU, по меньшей мере приблизительно 40 BU, по меньшей мере приблизительно 50 BU, по меньшей мере приблизительно 100 BU, по меньшей мере приблизительно 150 BU или по меньшей мере приблизительно 200 BU. В одном конкретном варианте осуществления титр ингибирующих антител перед введением (например, на исходном уровне) составляет по меньшей мере приблизительно 5 BU.

[00248] В некоторых вариантах осуществления способы согласно настоящему изобретению обеспечивают снижение титра ингибирующих антител у субъекта-человека по сравнению с титром ингибирующих антител перед введением. В определенных вариантах осуществления титр ингибирующих антител после введения составляет менее приблизительно 0,6 BU. В некоторых вариантах

осуществления титр ингибирующих антител после введения составляет менее приблизительно 0,5 BU, менее приблизительно 0,4 BU, менее приблизительно 0,3 BU, менее приблизительно 0,2 BU или менее приблизительно 0,1 BU. В одном конкретном варианте осуществления титр ингибирующих антител после введения составляет 0 BU. В других вариантах осуществления титр ингибирующих антител после введения составляет менее 5 BU, менее 4 BU, менее 3 BU, менее 2 BU, менее 1 BU, менее 0,9 BU, менее 0,8 BU, менее 0,7 BU или менее 0,6 BU.

[00249] В некоторых вариантах осуществления введение обеспечивает увеличение дифференцировки макрофагов у человека в сторону M2-подобного фенотипа по сравнению с дифференцировкой макрофагов у не получавших лечение контрольных лиц и у людей, получавших лечение с помощью фактора свертывания крови в отдельности. В некоторых вариантах осуществления M2-подобный фенотип включает повышение экспрессии генов пути с участием NRF2, пути с участием PPAR-гамма или как пути с участием NRF2, так и пути с участием PPAR-гамма. В некоторых вариантах осуществления M2-подобный фенотип включает повышение экспрессии CD206 (MRC1). В некоторых вариантах осуществления M2-подобный фенотип включает повышение экспрессии ARG1. В некоторых вариантах осуществления M2-подобный фенотип включает повышение экспрессии CD206 (MRC1) и ARG1.

[00250] В некоторых вариантах осуществления введение приводит к большей экспрессии одного или нескольких генов у человека по сравнению с экспрессией одного или нескольких генов у не получавшего лечение субъекта или у субъекта, получавшего лечение с помощью фактора свертывания крови в отдельности. В некоторых вариантах осуществления введение приводит к большей экспрессии одного или нескольких генов, выбранных из группы, состоящей из гена Hmox1, PPAR-гамма, LPL, EGR2, SLC04A1, гемоксигеназы 1 (HO-1), индуцируемого окислительным стрессом ингибитора роста 1 (OSGIN1), супероксиддисмутазы 1 (SOD1), глутатиондисульфидредуктазы (GSR), каталитической субъединицы глутаматцистеинлигазы (GCLC), модифицирующей субъединицы глутаматцистеинлигазы (GCLM), NAD(P)H-хинондегидрогеназы 1

(NQ01), белка, связывающего жирные кислоты 5 (FABP5), B7-H3 (CD276), представителя 3 семейства SLAM (SLAMF3; лимфоцитарный антиген 9; LY9), представителя 7 семейства SLAM (SLAMF7), маннозного рецептора C-типа 1 (MRC1), представителя 4 семейства переносчиков растворенных веществ 12 (SLC12A), нейропилина 1 (NRP1) и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления введение приводит к большей экспрессии одного или нескольких генов пути с участием NRF2. В определенных вариантах осуществления один или несколько генов пути с участием NRF2 выбраны из группы, состоящей из гена HO-1, OSGIN1, SOD1, GSR, GCLC, GCLM, NQ01 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления введение приводит к большей экспрессии одного или нескольких генов пути с участием PPAR-гамма. В некоторых вариантах осуществления один или несколько генов пути с участием PPAR-гамма выбраны из группы, состоящей из гена PPAR-гамма, LPL, FABP5, EGR2 и любой их комбинации. В некоторых вариантах осуществления введение приводит к большей экспрессии одного или нескольких генов, выбранных из группы, состоящей из гена B7-H3 (CD276), SLAMF3, SLAMF7, MRC1, SLC12A, NRP1 и любой их комбинации. В конкретных вариантах осуществления введение приводит к большей экспрессии одного или нескольких генов по сравнению с экспрессией одного или нескольких генов у не получавшего лечение человека или у человека, получавшего лечение с помощью фактора свертывания крови в отдельности, где экспрессия является по меньшей мере в приблизительно 1,5 раза больше, по меньшей мере в приблизительно 2 раза больше, по меньшей мере в приблизительно 2,5 раза больше, по меньшей мере в приблизительно 3 раза больше, по меньшей мере в приблизительно 3,5 раза больше, по меньшей мере в приблизительно 4 раза больше, по меньшей мере в приблизительно 4,5 раза больше или по меньшей мере в приблизительно 5 раз больше.

[00251] В некоторых вариантах осуществления отличающаяся экспрессия одного или нескольких генов наблюдается через менее 6 часов после введения. В некоторых вариантах осуществления отличающаяся экспрессия наблюдается через менее 12 часов после введения. В некоторых вариантах осуществления отличающаяся

экспрессия наблюдается через менее 18 часов после введения. В некоторых вариантах осуществления отличающаяся экспрессия наблюдается через менее 24 часа после введения.

[00252] В некоторых вариантах осуществления ингибирующий иммунный ответ включает клеточно-опосредованный иммунный ответ. В определенных вариантах осуществления клеточно-опосредованный иммунный ответ включает высвобождение цитокина. В некоторых вариантах осуществления цитокин представляет собой любой цитокин, ассоциированный с повышенным иммунным ответом. В некоторых вариантах осуществления цитокин выбран из группы, состоящей из IL-1, IL-6, IL-16, IL-12, IL-4, IL-17, фактора некроза опухоли  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), интерферона  $\alpha$ , интерферона  $\gamma$  и любой их комбинации. В одном варианте осуществления клеточно-опосредованный иммунный ответ включает повышенные уровни IL-12 в сыворотке крови. В другом варианте осуществления клеточно-опосредованный иммунный ответ включает повышенные уровни IL-4 в сыворотке крови. В другом варианте осуществления клеточно-опосредованный иммунный ответ включает повышенные уровни IL-17 в сыворотке крови. В другом варианте осуществления клеточно-опосредованный иммунный ответ включает повышенные уровни TNF- $\alpha$  в сыворотке крови.

[00253] Различные генные мутации были связаны с повышенным риском формирования ингибирующего иммунного ответа. Например, полиморфизм TNF- $\alpha$  -308G>A в *Nar2*, который ассоциирован с увеличенными уровнями конститутивной и индуцибельной транскрипции TNF, был связан с повышенным риском формирования ингибирующего иммунного ответа. См. Astermark *et al.*, *Blood* 108: 3739-3745 (2006), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления у человека имеется генетический полиморфизм, ассоциированный с увеличенным уровнем TNF- $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления полиморфизмом является полиморфизм TNF- $\alpha$  -308G>A. В некоторых вариантах осуществления у человека имеется полиморфизм в гене IL10, например, полиморфизм, ассоциированный с увеличенной секрецией IL10. В некоторых вариантах осуществления FVIII-Fc вводят субъекту с аллелем 134

микросателлита IL10G в промоторной области гена IL10. См. Astermark *et al.* *Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Biology* 108: 3739–3745 (2006), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00254] В некоторых вариантах осуществления у человека имеется генетический полиморфизм, ассоциированный с пониженной экспрессией CTLA-4 (антигена 4 цитотоксических Т-лимфоцитов). В некоторых вариантах осуществления у человека имеется мутация в молекулах DR15 (HLA-DR15) или DQB0602 МНС (главного комплекса гистосовместимости) класса II. Другими молекулами МНС класса II, ассоциированными с формированием ингибирующего иммунного ответа у субъектов с гемофилией, являются A3, B7, C7, DQA0102, C2, DQA0103, DQB0603 и DR13 (см. *Inhibitors in Patients with Hemophilia*, E.C. Rodriguez-Merchan & C.A. Lee, Eds., Blackwell Science, Ltd., 2002).

[00255] В некоторых вариантах осуществления способы согласно настоящему изобретению обеспечивают снижение уровня одного или нескольких цитокинов у субъекта по сравнению с уровнем одного или нескольких цитокинов у субъекта после предшествующего лечения с помощью полипептида, состоящего из полипептида FVIII. В другом варианте осуществления способы согласно настоящему изобретению обеспечивают снижение уровня одного или нескольких цитокинов у субъекта по сравнению с уровнем одного или нескольких цитокинов у субъекта перед введением. В других вариантах осуществления экспрессия одной или нескольких толерогенных молекул увеличивается после введения в соответствии со способами согласно настоящему изобретению по сравнению с уровнем экспрессии одной или нескольких толерогенных молекул перед введением. В определенных вариантах осуществления одна или несколько толерогенных молекул выбраны из IL-10, TGF- $\beta$ , IL-35, IDO-1 и любой их комбинации.

[00256] В других вариантах осуществления иммунный ответ включает клинический симптом, выбранный из группы, состоящей из повышенной склонности к кровотечению, высокого потребления фактора свертывания крови, отсутствия ответа на терапию фактором свертывания крови, пониженной эффективности терапии фактором

свертывания крови, сокращенного периода полужизни фактора свертывания крови и любой их комбинации. В определенных вариантах осуществления иммунный ответ включает клинический симптом, выбранный из группы, состоящей из повышенной склонности к кровотечению, высокого потребления фактора свертывания крови, отсутствия ответа на терапию фактором свертывания крови, пониженной эффективности терапии фактором свертывания крови, пониженного восстановления активности фактора свертывания крови, как наблюдается по плазме крови, сокращенного периода полужизни фактора свертывания крови и любой их комбинации.

[00257] В определенных вариантах осуществления у человека ранее диагностировали наличие ингибирующего иммунного ответа. Такой диагноз можно поставить с помощью любых способов, известных из уровня техники. Например, человек может характеризоваться наличием иммунного ответа на фактор свертывания крови, например, FVIII, если у человека имеется одно или несколько из следующего: (a) титр ингибирующих антител к фактору свертывания крови, превышающий или равный 0,6 BU; (b) повышенные уровни одного или нескольких цитокинов в сыворотке крови, выбранных из группы, состоящей из IL-12, IL-4, IL-17 и TNF- $\alpha$ ; (c) повышенная склонность к кровотечению; (d) высокое потребление фактора свертывания крови; (e) отсутствие ответа на терапию фактором свертывания крови; (f) пониженная эффективность терапии фактором свертывания крови; (g) сокращенный период полужизни фактора свертывания крови и любая их комбинация. В одном конкретном варианте осуществления человек характеризуется наличием иммунного ответа на фактор свертывания крови, если у человека титр ингибирующих антител к фактору свертывания крови превышает или равен 0,6 BU.

[00258] В некоторых вариантах осуществления у человека ранее диагностировали наличие сформированного ингибирующего иммунного ответа на фактор свертывания крови за по меньшей мере приблизительно 1 месяц, по меньшей мере приблизительно 2 месяца, по меньшей мере приблизительно 3 месяца, по меньшей мере приблизительно 4 месяца, по меньшей мере приблизительно 5 месяцев, по меньшей мере приблизительно 6 месяцев, по меньшей

мере приблизительно 7 месяцев, по меньшей мере приблизительно 8 месяцев, по меньшей мере приблизительно 9 месяцев, по меньшей мере приблизительно 10 месяцев, по меньшей мере приблизительно 11 месяцев, по меньшей мере приблизительно 12 месяцев, по меньшей мере приблизительно 13 месяцев, по меньшей мере приблизительно 14 месяцев, по меньшей мере приблизительно 15 месяцев, по меньшей мере приблизительно 16 месяцев, по меньшей мере приблизительно 17 месяцев, по меньшей мере приблизительно 18 месяцев, по меньшей мере приблизительно 19 месяцев, по меньшей мере приблизительно 20 месяцев, по меньшей мере приблизительно 21 месяц, по меньшей мере приблизительно 22 месяца, по меньшей мере приблизительно 23 месяца, по меньшей мере приблизительно 24 месяца, по меньшей мере приблизительно 27 месяцев, по меньшей мере приблизительно 30 месяцев, по меньшей мере приблизительно 33 месяца, по меньшей мере приблизительно 36 месяцев, по меньшей мере приблизительно 39 месяцев, по меньшей мере приблизительно 42 месяца, по меньшей мере приблизительно 45 месяцев, по меньшей мере приблизительно 48 лет, по меньшей мере приблизительно 51 месяц, по меньшей мере приблизительно 54 месяца, по меньшей мере приблизительно 57 месяцев, по меньшей мере приблизительно 60 месяцев, по меньшей мере приблизительно 6 лет, по меньшей мере приблизительно 7 лет, по меньшей мере приблизительно 8 лет, по меньшей мере приблизительно 10 лет, по меньшей мере приблизительно 15 лет или по меньшей мере приблизительно 20 лет до введения. В одном варианте осуществления у человека ранее диагностировали наличие сформированного ингибирующего иммунного ответа на фактор свертывания крови за по меньшей мере приблизительно 5 лет до введения.

[00259] В некоторых вариантах осуществления способы согласно настоящему изобретению обеспечивают улучшенное время индуцирования толерантности по сравнению со стандартными способами индуцирования иммунологической толерантности. Используемый в данном документе термин "время индуцирования толерантности" относится к количеству времени между введением первой дозы композиции или химерного белка, содержащих фактор

свертывания крови и Fc-область, и формированием иммунологической толерантности у человека. Сокращение времени индуцирования толерантности может иметь значительные преимущества для человека, в том числе без ограничения уменьшать общее финансовое бремя, необходимое для достижения толерантности. В некоторых вариантах осуществления время индуцирования толерантности составляет от приблизительно 1 до приблизительно 24 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 23 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 22 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 21 недели, от приблизительно 2 до приблизительно 20 недель, от приблизительно 2 до приблизительно 19 недель, от приблизительно 2 до приблизительно 18 недель, от приблизительно 2 до приблизительно 17 недель, от приблизительно 3 до приблизительно 16 недель, от приблизительно 3 до приблизительно 15 недель, от приблизительно 3 до приблизительно 14 недель, от приблизительно 3 до приблизительно 13 недель, от приблизительно 4 до приблизительно 12 недель, от приблизительно 4 до приблизительно 11 недель, от приблизительно 4 до приблизительно 10 недель, от приблизительно 4 до приблизительно 9 недель, от приблизительно 5 до приблизительно 8 недель, от приблизительно 5 до приблизительно 7 недель, от приблизительно 5 до приблизительно 6 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 12 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 11 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 10 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 9 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 8 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 7 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 6 недель, от приблизительно 1 до приблизительно 5 недель или от приблизительно 1 до приблизительно 4 недель. В некоторых вариантах осуществления время индуцирования толерантности составляет менее приблизительно 70 недель, менее приблизительно 65 недель, менее приблизительно 60 недель, менее приблизительно 58 недель, менее приблизительно 56 недель, менее приблизительно 54 недели, менее приблизительно 52 недель, менее приблизительно 50 недель, менее приблизительно 48 недель, менее приблизительно 46 недель, менее приблизительно 44 недель, менее приблизительно



способы согласно настоящему изобретению приводят к более короткому времени индуцирования толерантности у человека после лечения с помощью композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область, по сравнению со временем индуцирования толерантности после лечения с помощью фактора свертывания крови в отдельности.

[00260] В некоторых вариантах осуществления формирование иммунологической толерантности характеризуется титром ингибирующего антитела к фактору свертывания крови, составляющим менее приблизительно 0,6 BU. В некоторых вариантах осуществления формирование иммунологической толерантности характеризуется титром ингибирующего антитела к фактору свертывания крови, составляющим приблизительно 0,5 BU. В некоторых вариантах осуществления формирование иммунологической толерантности характеризуется титром ингибирующего антитела к фактору свертывания крови, составляющим менее приблизительно 0,4 BU. В некоторых вариантах осуществления формирование иммунологической толерантности характеризуется титром ингибирующего антитела к фактору свертывания крови, составляющим менее приблизительно 0,3 BU. В некоторых вариантах осуществления формирование иммунологической толерантности характеризуется титром ингибирующего антитела к фактору свертывания крови, составляющим менее приблизительно 0,2 BU. В некоторых вариантах осуществления формирование иммунологической толерантности характеризуется титром ингибирующего антитела к фактору свертывания крови, составляющим менее приблизительно 0,1 BU. В некоторых вариантах осуществления формирование иммунологической толерантности характеризуется титром ингибирующего антитела к фактору свертывания крови, составляющим 0,0 BU. В определенных вариантах осуществления титр антител, ингибирующих иммунную реакцию, наблюдают при двух последовательных измерениях, например, через две последовательные недели в течение четырехнедельного периода.

[00261] В некоторых вариантах осуществления формирование иммунологической толерантности характеризуется постепенным восстановлением до > 66% (например, постепенным восстановлением до приблизительно 67%, приблизительно 68%, приблизительно 69%,

приблизительно 70%, приблизительно 71%, приблизительно 72%,  
приблизительно 73%, приблизительно 74%, приблизительно 75%,  
приблизительно 76%, приблизительно 77%, приблизительно 78%,  
приблизительно 79%, приблизительно 80%, приблизительно 81%,  
приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%,  
приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%,  
приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%,  
приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%,  
приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%,  
приблизительно 97%, приблизительно 98%, приблизительно 99% или  
приблизительно 100%). "Постепенное восстановление", как  
используется в данном документе, относится к пиковым уровням  
FVIII через 15–30 минут после инфузии.

[00262] После завершения периода индуцирования и периода  
снижения дозы субъект затем может получать профилактическое  
лечение с помощью химерного белка. Иллюстративная схема  
профилактического введения доз может представлять собой  
приблизительно 50 МЕ/кг химерного белка каждые четыре дня или от  
приблизительно 25 МЕ/кг до приблизительно 65 МЕ/кг химерного  
белка с интервалами от трех до пяти дней. Детям возрастом менее  
6 лет можно давать приблизительно 50 МЕ/кг химерного белка два  
раза в неделю или от приблизительно 25 МЕ/кг до приблизительно  
65 МЕ/кг химерного белка с интервалами от трех до пяти дней. См.  
инструкцию по применению ELOCTATE®, доступную во всемирной сети  
Интернет по адресу  
[eloctate.com/\\_assets/pdf/ELOCTATE\\_PI\\_January2017.pdf](http://eloctate.com/_assets/pdf/ELOCTATE_PI_January2017.pdf).

[00263] В некоторых вариантах осуществления человек,  
получающий лечение с применением способов согласно настоящему  
изобретению, получает или недавно получил иммуностимулирующую  
терапию. Например, наличие ингибиторов также сообщалось у  
пациентов с HCV-положительной гемофилией А, проходящих лечение  
интерфероном, а также у пациентов с HIV-положительной гемофилией  
А, имеющих воспалительный синдром восстановления иммунитета,  
ассоциированный с антиретровирусной терапией. См. отчет  
совещания экспертов по продуктам FVIII и выработке ингибиторов,  
Европейское агентство по лекарственным средствам (28 февраля

2006–2 марта 2006). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления человек получает терапию интерфероном. В некоторых вариантах осуществления человек получает противовирусную терапию. В некоторых вариантах осуществления человек получает антиретровирусную терапию, и у него имеется воспалительный синдром восстановления иммунитета.

[00264] В определенных вариантах осуществления человеку назначался прием фактора свертывания крови, например, FVIII, в течение менее 150 дней (ED). В одном варианте осуществления человеку назначался прием в течение менее 50 ED. В другом варианте осуществления человеку назначался прием в течение менее 20 ED.

[00265] Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к способам снижения тяжести или возникновения аллергической или анафилактической реакции на фактор свертывания крови у субъекта, нуждающегося в этом, включающим введение субъекту композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область. В некоторых вариантах осуществления введение композиции или химерного белка обеспечивает снижение тяжести анафилактоидной реакции на фактор свертывания крови. В некоторых вариантах осуществления введение композиции или химерного белка обеспечивает снижение тяжести аллергической реакции на фактор свертывания крови.

#### ***II.A. Химерные белки***

[00266] Способы индуцирования иммунологической толерантности, раскрытые в данном документе, в целом применимы к композициям или химерным белкам, содержащим фактор свертывания крови и Fc-область, где фактор свертывания крови может представлять собой любой известный фактор свертывания крови, его фрагмент или его вариант, и где Fc-область может представлять собой любую известную Fc-область, ее фрагмент или ее вариант. В некоторых вариантах осуществления фактор свертывания крови выбран из группы, состоящей из фактора VII (FVII), фактора VIIa (FVIIa), фактора VIII (FVIII), фактора IX (FIX), фактора X (FX), фактора фон Виллебранда (VWF) или любой их комбинации. Соответственно, настоящее изобретение, относящееся к химерным

белкам FVIII<sub>Fc</sub> и путям их применения, в равной степени применимо к другим химерным белкам, содержащим часть, представляющую собой фактор свертывания крови, и Fc-часть. Любой фактор свертывания крови, или любой его фрагмент, или любой его вариант могут применяться в способах согласно настоящему изобретению. Аналогично, любая Fc, или любой ее фрагмент, или любой ее вариант могут применяться в способах согласно настоящему изобретению. В некоторых конкретных примерах часть химерного белка, представляющая собой фактор свертывания крови, представляет собой FVIII.

[00267] В некоторых вариантах осуществления фактор свертывания крови и Fc находятся на отдельных полипептидных цепях. В некоторых вариантах осуществления фактор свертывания крови и Fc не соединены или не связаны друг с другом посредством ковалентной связи.

[00268] В других вариантах осуществления фактором свертывания крови может быть имитатор фактора свертывания крови. Имитаторы фактора свертывания крови могут проявлять один или несколько видов активности фактора свертывания крови. Например, антитело или его антителосвязывающая часть могут действовать как FVIII путем связывания как с фактором IX, так и с фактором X. Такие антитела или их антигенсвязывающие части можно применять для способов согласно настоящему изобретению, если антитела или их антигенсвязывающие части содержат Fc-область. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови представляет собой пептид, который обладает активностью FVIII.

[00269] В этом отношении в настоящем изобретении в целом предусмотрен способ индуцирования иммунологической толерантности у человека, включающий введение субъекту композиции или химерного белка, содержащих часть, представляющую собой фактор свертывания крови, и Fc-часть.

#### **II.A.1. ФАКТОР VIII**

[00270] "Фактор VIII", сокращенно называемый во всей настоящей заявке как "FVIII", как используется в данном документе, означает функциональный полипептид FVIII с его нормальной ролью в коагуляции, если не указано иное. Таким

образом, термин "FVIII" включает варианты полипептиды, которые являются функциональными. "Белок FVIII" используется взаимозаменяемо с полипептидом (или белком) FVIII или FVIII. Примеры функций FVIII включают без ограничения способность активировать коагуляцию, способность действовать в качестве кофактора для фактора IX или способность образовывать теназный комплекс с фактором IX в присутствии  $Ca^{2+}$  и фосфолипидов, который затем обеспечивает превращение фактора X в активированную форму Xa. Белок FVIII может представлять собой белок FVIII человека, свиньи, собаки, крысы или мыши. Кроме того, путем сравнения FVIII от людей и FVIII от других видов идентифицировали консервативные остатки, которые, вероятно, необходимы для функционирования (Cameron *et al.*, *Thromb. Haemost.* 79:317-22 (1998); US 6251632). Известны полноразмерные полипептидные и полинуклеотидные последовательности, как и многие функциональные фрагменты, мутанты и модифицированные варианты. Различные аминокислотные и нуклеотидные последовательности FVIII раскрыты, например, в публикациях заявок на патент США №№ 2015/0158929 A1, 2014/0308280 A1 и 2014/0370035 A1 и в международной публикации № WO 2015/106052 A1. Полипептиды FVIII включают, например, полноразмерный FVIII, полноразмерный FVIII без Met на N-конце, зрелый FVIII (без сигнальной последовательности), зрелый FVIII с дополнительным Met на N-конце и/или FVIII с полной или частичной делецией домена B. Варианты FVIII содержат делеции домена B, будь то частичные или полные делеции.

[00271] Часть FVIII в факторе свертывания крови или химерном белке, применяемых согласно данному документу, обладает активностью FVIII. Активность FVIII можно измерять с помощью любого известного из уровня техники способа. Доступен ряд тестов для оценки функции системы коагуляции: тест с определением активированного частичного тромбопластинового времени (aPTT), хромогенный анализ, анализ ROTEM, тест с определением протромбинового времени (PT) (также применяется для определения INR), тестирование фибриногена (зачастую с помощью способа Клаусса), подсчет тромбоцитов, тестирование функции тромбоцитов (зачастую с помощью PFA-100), ТСТ, определение времени

свертывания крови, тест смешивания (устраняется ли аномалия при смешивании плазмы крови пациента с нормальной плазмой крови), анализы факторов коагуляции, антител к фосфолипидам, D-димера, генетические тесты (например, фактора V Лейдена, мутации протромбина G20210A), определение времени свертывания с разбавленным ядом гадюки Рассела (dRVVT), различные тесты функции тромбоцитов, тромбоэластография (TEG или Sonoclot), тромбоэластометрия (TEM<sup>®</sup>, например, ROTEM<sup>®</sup>) или определение времени лизиса эуглобулина (ELT).

[00272] Тест аРТТ является показателем функционирования, измеряющим эффективность как "внутреннего" (также называемого контактным путем активации), так и общего путей коагуляции. Этот тест обычно применяют для измерения свертывающей активности коммерчески доступных рекомбинантных факторов свертывания крови, например, FVIII. Он применяется в сочетании с протромбиновым временем (PT), с помощью которого измеряют внешний путь.

[00273] Анализ ROTEM предоставляет информацию обо всей кинетике гемостаза: времени свертывания крови, образовании сгустка, стабильности и лизисе сгустка. Различные параметры тромбоэластометрии зависят от активности системы плазменной коагуляции, функции тромбоцитов, фибринолиза или многих факторов, которые влияют на эти взаимодействия. Этот анализ может дать полное представление о вторичном гемостазе.

[00274] Механизм хромогенного анализа основан на принципах каскада коагуляции крови, где активированный FVIII ускоряет превращение фактора X в фактор Xa в присутствии активированного фактора IX, фосфолипидов и ионов кальция. Активность фактора Xa оценивают путем гидролиза субстрата п-нитроанилида (pNA), специфичного для фактора Xa. Начальная скорость высвобождения п-нитроанилина, измеренная при 405 нМ, прямо пропорциональна активности фактора Xa и, следовательно, активности FVIII в образце.

[00275] Хромогенный анализ является рекомендованным подкомитетом по FVIII и фактору IX научного и стандартизационного комитета (SSC) Международного общества по тромбозу и гемостазу (ISTH). С 1994 года хромогенный анализ

также являлся эталонным способом определения эффективности концентрата FVIII в Европейской фармакопее. Таким образом, в одном варианте осуществления химерный белок, содержащий FVIII, обладает активностью FVIII, сопоставимой с таковой у химерного белка, содержащего зрелый FVIII или BDD FVIII (например, ADVATE<sup>®</sup>, REFACTO<sup>®</sup> или ELOSTATE<sup>®</sup>).

[00276] В другом варианте осуществления химерный белок, содержащий FVIII, согласно настоящему изобретению характеризуется скоростью образования фактора Ха, сопоставимой с таковой у химерного белка, содержащего зрелый FVIII или BDD FVIII (например, ADVATE<sup>®</sup>, REFACTO<sup>®</sup> или ELOSTATE<sup>®</sup>).

[00277] Чтобы активировать фактор X в фактор Ха, активированный фактор IX (фактор IXa) гидролизует одну связь между аргинином и изолейцином в факторе X с образованием фактора Ха в присутствии Ca<sup>2+</sup>, мембранных фосфолипидов и кофактора FVIII. Следовательно, взаимодействие FVIII с фактором IX является критически важным в пути коагуляции. В определенных вариантах осуществления химерный белок, содержащий FVIII, может взаимодействовать с фактором IXa со скоростью, сопоставимой с таковой у химерного белка, содержащего зрелую последовательность FVIII или BDD FVIII (например, ADVATE<sup>®</sup>, REFACTO<sup>®</sup> или ELOSTATE<sup>®</sup>).

[00278] Кроме того, FVIII связывается с фактором фон Виллебранда, находясь в неактивной форме, в кровотоке. FVIII быстро разрушается, когда не связан с VWF, и отщепляется от VWF под действием тромбина. В некоторых вариантах осуществления химерный белок, содержащий FVIII, связывается с фактором фон Виллебранда на уровне, сопоставимом с таковым у химерного белка, содержащего зрелую последовательность FVIII или BDD FVIII (например, ADVATE<sup>®</sup>, REFACTO<sup>®</sup> или ELOSTATE<sup>®</sup>).

[00279] FVIII можно инактивировать с помощью активированного белка С в присутствии кальция и фосфолипидов. Активированный белок С расщепляет тяжелую цепь FVIII после аргинина 336 в домене A1, что разрушает сайт взаимодействия с субстратом фактора X, и расщепляет после аргинина 562 в домене A2, что усиливает диссоциацию домена A2, а также разрушает сайт взаимодействия с фактором IXa. Это расщепление также

обеспечивает разделение пополам домена A2 (43 кДа) и образование доменов A2-N (18 кДа) и A2-C (25 кДа). Таким образом, активированный белок C может катализировать множественные сайты расщепления в тяжелой цепи. В одном варианте осуществления химерный белок, содержащий FVIII, инактивируется активированным белком C на уровне, сопоставимым с таковым у химерного белка, содержащего зрелую последовательность FVIII или BDD FVIII (например, ADVATE<sup>®</sup>, REFACTO<sup>®</sup> или ELOSTATE<sup>®</sup>).

[00280] В других вариантах осуществления химерный белок, содержащий FVIII, обладает активностью FVIII *in vivo*, сопоставимой с таковой у химерного белка, содержащего зрелую последовательность FVIII или BDD FVIII (например, ADVATE<sup>®</sup>, REFACTO<sup>®</sup> или ELOSTATE<sup>®</sup>). В конкретном варианте осуществления химерный белок, содержащий FVIII, способен обеспечивать защиту у мыши с HemA на уровне, сопоставимым с таковым у химерного белка, содержащего зрелую последовательность FVIII или BDD FVIII (например, ADVATE<sup>®</sup>, REFACTO<sup>®</sup> или ELOSTATE<sup>®</sup>), на модели HemA у мышей с разрезом хвостовой вены.

[00281] "Домен В" в FVIII, как используется в данном документе, является тем же доменом В, известным из уровня техники, который определяют по идентичности внутренней аминокислотной последовательности и сайтам протеолитического расщепления тромбином, например, остатки Ser741-Arg1648 зрелого FVIII человека. Другие домены FVIII человека определяют по следующим аминокислотным остаткам относительно зрелого FVIII человека: A1, остатки Ala1-Arg372; A2, остатки Ser373-Arg740; A3, остатки Ser1690-Ile2032; C1, остатки Arg2033-Asn2172; C2, остатки Ser2173-Tyr2332 зрелого FVIII. Номера остатков последовательности, используемые в данном документе, без ссылки на любые номера SEQ ID соответствуют последовательности FVIII без последовательности сигнального пептида (19 аминокислот), если не указано иное. Последовательность A3-C1-C2, также известная как тяжелая цепь FVIII, включает в себя остатки Ser1690-Tyr2332. Оставшаяся последовательность, остатки Glu1649-Arg1689, обычно относится к активационному пептиду легкой цепи FVIII. Из уровня техники также известны расположения граничных

остатков для всех доменов, в том числе доменов В, для FVIII свиньи, мыши и собаки. В одном варианте осуществления домен В FVIII удален посредством делеции ("FVIII с делецией домена В" или "BDD FVIII"). Примером BDD FVIII является REFACTO® (рекомбинантный BDD FVIII). В одном конкретном варианте осуществления вариант FVIII с делецией домена В содержит делецию аминокислотных остатков 746–1648 зрелого FVIII.

[00282] "FVIII с делецией домена В" может характеризоваться полной или частичной делециями, раскрытыми в патентах США №№ 6316226, 6346513, 7041635, 5789203, 6060447, 5595886, 6228620, 5972885, 6048720, 5543502, 5610278, 5171844, 5112950, 4868112 и 6458563 и в международной публикации № WO 2015106052 A1 (PCT/US2015/010738). В некоторых вариантах осуществления последовательность FVIII с делецией домена В, применяемая в способах согласно настоящему изобретению, содержит любую из делеций, раскрытых в кол. 4, строка 4 – кол. 5, строка 28 и в примерах 1–5 патента США № 6316226 (также в US 6346513). В другом варианте осуществления фактор VIII с делецией домена В представляет собой фактор VIII с делецией домена В 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 зрелого FVIII). В некоторых вариантах осуществления FVIII с делецией домена В, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, имеет делецию, раскрытую в кол. 2, строки 26–51 и в примерах 5–8 патента США № 5789203 (также в US 6060447, US 5595886 и US 6228620). В некоторых вариантах осуществления фактор VIII с делецией домена В имеет делецию, раскрытую в кол. 1, строка 25 – кол. 2, строка 40 патента США № 5972885; кол. 6, строки 1–22 и в примере 1 патента США № 6048720; кол. 2, строки 17–46 патента США № 5543502; кол. 4, строка 22 – кол. 5, строка 36 патента США № 5171844; кол. 2, строки 55–68, на фигуре 2 и в примере 1 патента США № 5112950; кол. 2, строка 2 – кол. 19, строка 21 и в таблице 2 патента США № 4868112; кол. 2, строка 1 – кол. 3, строка 19, кол. 3, строка 40 – кол. 4, строка 67, кол. 7, строка 43 – кол. 8, строка 26 и кол. 11, строка 5 – кол. 13,

строка 39 патента США № 7041635 или кол. 4, строки 25–53 патента США № 6458563. В некоторых вариантах осуществления FVIII с делецией домена В имеет делецию большей части домена В, но все еще содержит аминоконцевые последовательности домена В, которые необходимы для протеолитического процессинга *in vivo* первичного продукта трансляции в две полипептидных цепи, как раскрыто в WO 91/09122. В некоторых вариантах осуществления FVIII с делецией домена В конструируют с делецией аминокислот 747–1638, т. е. практически с полной делецией домена В. Noeben R.C., *et al. J. Biol. Chem.* 265 (13): 7318–7323 (1990). Фактор VIII с делецией домена В также может содержать делецию аминокислот 771–1666 или аминокислот 868–1562 FVIII. Meulien P., *et al. Protein Eng.* 2(4): 301–6 (1988). Дополнительные делеции домена В, которые являются частью настоящего изобретения, включают делецию 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 согласно РСТ № WO 87/04187)), 747–1560 (Sarver, *et al., DNA* (1987) 6:553–564)), 741–1648 (Pasek (заявка согласно РСТ № 88/00831)), или 816–1598, или 741–1648 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988) No 82:16–25, EP 295597)). В одном конкретном варианте осуществления FVIII с делецией домена В содержит делецию аминокислотных остатков 746–1648 зрелого FVIII. В другом варианте осуществления FVIII с делецией домена В содержит делецию аминокислотных остатков 745–1648 зрелого FVIII.

[00283] В других вариантах осуществления BDD FVIII включает полипептид FVIII, содержащий фрагменты домена В, в которых сохранены один или несколько N-связанных сайтов гликозилирования, например, остатки 757, 784, 828, 900, 963 или необязательно 943, которые соответствуют аминокислотной последовательности полноразмерной последовательности FVIII. Примеры фрагментов домена В включают 226 аминокислот или 163 аминокислоты из домена В, как раскрыто в Miao, H.Z., *et al., Blood* 103(a): 3412–3419 (2004), Kasuda, A, *et al., J. Thromb. Haemost.* 6. 1352–1359 (2008), и Pipe, S.W., *et al., J. Thromb. Haemost.* 9. 2235–2242 (2011) (т. е. первые 226 аминокислот или

163 аминокислоты из домена В сохранены). В еще нескольких вариантах осуществления BDD FVIII дополнительно содержит точечную мутацию по остатку 309 (из Phe в Ser) для улучшения экспрессии белка BDD FVIII. См. Miao, H.Z., et al., Blood 103(a): 3412-3419 (2004). В еще нескольких вариантах осуществления BDD FVIII включает полипептид FVIII, содержащий часть домена В, но не содержащий один или несколько сайтов расщепления фурином (например, Arg1313 и Arg 1648). См. Pipe, S.W., et al., J. Thromb. Haemost. 9. 2235-2242 (2011). В некоторых вариантах осуществления BDD FVIII включает одноцепочечный FVIII, который содержит делецию аминокислот 765-1652, соответствующих зрелому полноразмерному FVIII (также известный как одноцепочечный rVIII и AFSTYLA®). См. патент США № 7041635. Каждая из вышеизложенных делеций может быть произведена в любой последовательности FVIII.

[00284] Известно множество функциональных вариантов FVIII, обсуждаемых выше и ниже. Кроме того, у пациентов с гемофилией были идентифицированы сотни нефункциональных мутаций в FVIII, и было определено, что эффект данных мутаций в отношении функции FVIII обусловлен в большей степени тем, где они расположены в трехмерной структуре FVIII, а не природой замены (Cutler et al., Hum. Mutat. 19:274-8 (2002), включенная в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Кроме того, путем сравнения FVIII от людей и FVIII от других видов идентифицировали консервативные остатки, которые, вероятно, необходимы для функционирования (Cameron et al., Thromb. Haemost. 79:317-22 (1998); US 6251632, включенные в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[00285] В некоторых вариантах осуществления эффективное количество химерного белка, содержащего FVIII и Fc-область, является эквивалентным эффективному количеству FVIII без Fc-области. В определенных вариантах осуществления эффективное количество составляет от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 400 МЕ/кг. В определенных вариантах осуществления эффективное количество составляет от приблизительно 20 МЕ/кг до приблизительно 300 МЕ/кг. В некоторых вариантах осуществления



приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 240 МЕ/кг, от приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 230 МЕ/кг, от приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 220 МЕ/кг или от приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 210 МЕ/кг.

[00286] В некоторых вариантах осуществления эффективное количество составляет приблизительно 50 МЕ/кг, приблизительно 60 МЕ/кг, приблизительно 70 МЕ/кг, приблизительно 80 МЕ/кг, приблизительно 90 МЕ/кг, приблизительно 100 МЕ/кг, приблизительно 105 МЕ/кг, приблизительно 110 МЕ/кг, приблизительно 115 МЕ/кг, приблизительно 120 МЕ/кг, приблизительно 125 МЕ/кг, приблизительно 130 МЕ/кг, приблизительно 135 МЕ/кг, приблизительно 140 МЕ/кг, приблизительно 145 МЕ/кг, приблизительно 150 МЕ/кг, приблизительно 155 МЕ/кг, приблизительно 160 МЕ/кг, приблизительно 165 МЕ/кг, приблизительно 170 МЕ/кг, приблизительно 175 МЕ/кг, приблизительно 180 МЕ/кг, приблизительно 185 МЕ/кг, приблизительно 190 МЕ/кг, приблизительно 195 МЕ/кг, приблизительно 200 МЕ/кг, приблизительно 225 МЕ/кг, приблизительно 250 МЕ/кг, приблизительно 275 МЕ/кг или приблизительно 300 МЕ/кг. В одном конкретном варианте осуществления эффективное количество составляет приблизительно 150 МЕ/кг. В другом варианте осуществления эффективное количество составляет приблизительно 200 МЕ/кг. В другом варианте осуществления эффективное количество составляет приблизительно 250 МЕ/кг. В другом варианте осуществления эффективное количество составляет приблизительно 50 МЕ/кг. В другом варианте осуществления эффективное количество составляет приблизительно 100 МЕ/кг.

[00287] Интервал между введениями доз при введении химерного белка, содержащего FVIII и Fc-область или их фрагмент, может быть по меньшей мере в приблизительно полтора раза длиннее, чем интервал между введениями доз, требуемый для эквивалентной дозы фактора свертывания крови без Fc-домена. Интервал между введениями доз может быть по меньшей мере приблизительно в полтора-шесть раз длиннее, полтора-пять раз длиннее, полтора-четыре раза длиннее, полтора-три раза длиннее

или полтора-два раза длиннее, чем интервал между введениями доз, требуемый для эквивалентной дозы FVIII без Fc-домена.

[00288] В некоторых вариантах осуществления эффективную дозу химерного белка, содержащего FVIII и Fc-область, вводят человеку с интервалом между введениями доз, составляющим приблизительно один день, приблизительно два дня, приблизительно три дня, приблизительно четыре дня, приблизительно пять дней, приблизительно шесть дней, приблизительно семь дней, приблизительно восемь дней, приблизительно девять дней, приблизительно десять дней, приблизительно 11 дней, приблизительно 12 дней, приблизительно 13 дней, приблизительно 14 дней, приблизительно 15 дней, приблизительно 16 дней, приблизительно 17 дней, приблизительно 18 дней, приблизительно 19 дней, приблизительно 20 дней, приблизительно 21 день, приблизительно 22 дня, приблизительно 23 дня или приблизительно 24 дня. В некоторых вариантах осуществления эффективную дозу химерного белка, содержащего FVIII и Fc-область, вводят человеку с интервалом между введениями доз, составляющим приблизительно 25 дней, приблизительно 26 дней, приблизительно 27 дней, приблизительно 28 дней, приблизительно 29 дней, приблизительно 30 дней, приблизительно 45 дней или приблизительно 60 дней.

[00289] В некоторых вариантах осуществления композицию или химерный белок, содержащие FVIII и Fc-область, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим от приблизительно 1 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 13 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 12 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 11 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 10 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 9 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 8 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 7 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 6 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 5 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 4 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 3 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 2 дней, от приблизительно 2 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 3 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 4 до приблизительно 14 дней, от

приблизительно 5 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 6 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 7 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 8 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 9 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 10 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 11 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 12 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 13 до приблизительно 14 дней или от приблизительно 5 до приблизительно 10 дней. В других вариантах осуществления композицию или химерный белок, содержащие FVIII и Fc-область, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим от приблизительно 1 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 1 до приблизительно 20 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 19 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 18 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 17 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 16 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 15 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 14 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 13 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 12 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 11 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 10 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 9 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 8 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 7 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 6 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 5 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 4 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 3 дней, от приблизительно 1 до приблизительно 2 дней, от приблизительно 2 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 3 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 4 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 5 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 6 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 7 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 8 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 9 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 10 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 11 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 12 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 13 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 14 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 15 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 16

до приблизительно 21 дня, от приблизительно 17 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 18 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 19 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 20 до приблизительно 21 дня, от приблизительно 5 до приблизительно 10 дней, от приблизительно 10 до приблизительно 15 дней, от приблизительно 15 до приблизительно 20 дней. В определенных вариантах осуществления композицию или химерный белок, содержащие FVIII и Fc-область, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим от приблизительно 2 до приблизительно 6 дней. В другом варианте осуществления композицию или химерный белок, содержащие FVIII и Fc-область, вводят с интервалом между введениями доз, составляющим от приблизительно 3 до приблизительно 5 дней.

[00290] В одном варианте осуществления эффективная доза составляет 25–65 МЕ/кг (25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 62, 64 или 65 МЕ/кг), и интервал между введениями доз соответствует введению один раз в 3–5, 3–6, 3–7, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или больше дней, или три раза в неделю, или не более трех раз в неделю. В другом варианте осуществления эффективная доза составляет 65 МЕ/кг, и интервал между введениями доз соответствует введению один раз в неделю или один раз в 6–7 дней. Дозы можно вводить повторно до тех пор, пока имеется необходимость в них (например, в течение по меньшей мере 10, 20, 28, 30, 40, 50, 52 или 57 недель, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет). В одном конкретном варианте осуществления эффективная доза составляет приблизительно 25–65 МЕ/кг, и интервал между введениями доз соответствует введению один раз в 3–5 дней.

[00291] В одном варианте осуществления эффективное количество составляет приблизительно 200 МЕ/кг, и эффективное количество вводят ежедневно. В другом варианте осуществления эффективное количество составляет приблизительно 50 МЕ/кг, и эффективное количество вводят приблизительно три раза в неделю.

[00292] В определенных вариантах осуществления эффективное количество или эффективную дозу вводят в виде однократной дозы.

В некоторых вариантах осуществления эффективное количество или эффективную дозу вводят в двух или более дозах в течение дня.

[00293] В некоторых вариантах осуществления композицию или химерный белок, содержащие FVIII и Fc-область, вводят человеку в дозе приблизительно 200 МЕ/кг один раз в день, пока не наблюдается приобретение толерантности. В некоторых вариантах осуществления период приобретения толерантности длится от приблизительно 4 недель до приблизительно 36 месяцев. В некоторых вариантах осуществления период приобретения толерантности длится приблизительно 4 недели, приблизительно 5 недель, приблизительно 6 недель, приблизительно 7 недель, приблизительно 8 недель, приблизительно 9 недель, приблизительно 10 недель, приблизительно 11 недель, приблизительно 12 недель, приблизительно 3 месяца, приблизительно 4 месяца, приблизительно 5 месяцев, приблизительно 6 месяцев, приблизительно 7 месяцев, приблизительно 8 месяцев, приблизительно 9 месяцев, приблизительно 10 месяцев, приблизительно 11 месяцев, приблизительно 12 месяцев, приблизительно 13 месяцев, приблизительно 14 месяцев, приблизительно 15 месяцев, приблизительно 16 месяцев, приблизительно 17 месяцев, приблизительно 18 месяцев, приблизительно 19 месяцев, приблизительно 20 месяцев, приблизительно 21 месяцев, приблизительно 22 месяцев, приблизительно 23 месяцев, приблизительно 24 месяцев, приблизительно 25 месяцев, приблизительно 26 месяцев, приблизительно 27 месяцев, приблизительно 28 месяцев, приблизительно 29 месяцев, приблизительно 30 месяцев, приблизительно 31 месяцев, приблизительно 32 месяцев, приблизительно 33 месяцев, приблизительно 34 месяцев, приблизительно 35 месяцев или приблизительно 36 месяцев.

[00294] В определенных вариантах осуществления по достижении иммунологической толерантности человек будет подвергаться периоду снижения дозы. Используемые в данном документе термины "период снижения дозы" и "схема со снижением дозы" используются взаимозаменяемо для обозначения схемы введения доз, при которой вводят одну или несколько снижающихся



200 МЕ/кг до приблизительно 300 МЕ/кг. В другом варианте осуществления период снижения дозы предусматривает введение дозы, составляющей от приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 290 МЕ/кг. В других вариантах осуществления период снижения дозы предусматривает введение дозы, составляющей от приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 280 МЕ/кг, от приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 270 МЕ/кг, от приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 260 МЕ/кг, от приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 250 МЕ/кг, от приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 240 МЕ/кг, от приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 230 МЕ/кг, от приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 220 МЕ/кг или от приблизительно 200 МЕ/кг до приблизительно 210 МЕ/кг. В другом варианте осуществления схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы композиции или химерного белка, составляющей от приблизительно 50 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг. В одном конкретном варианте осуществления схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы композиции или химерного белка, составляющей приблизительно 50 МЕ/кг. В другом варианте осуществления схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы композиции или химерного белка, составляющей приблизительно 150 МЕ/кг. В другом варианте осуществления схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы композиции или химерного белка, составляющей приблизительно 125 МЕ/кг. В другом конкретном варианте осуществления схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы композиции или химерного белка, составляющей приблизительно 100 МЕ/кг. В другом варианте осуществления схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы композиции или химерного белка, составляющей приблизительно 90 МЕ/кг. В другом варианте осуществления схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы композиции или химерного белка, составляющей приблизительно 80 МЕ/кг. В другом варианте осуществления схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы композиции или химерного белка, составляющей приблизительно 75 МЕ/кг. В другом варианте осуществления схема

со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы композиции или химерного белка, составляющей приблизительно 70 МЕ/кг. В другом варианте осуществления схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы композиции или химерного белка, составляющей приблизительно 60 МЕ/кг. В другом варианте осуществления схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы композиции или химерного белка, составляющей приблизительно 40 МЕ/кг. В другом варианте осуществления схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы композиции или химерного белка, составляющей приблизительно 30 МЕ/кг. В другом варианте осуществления схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы композиции или химерного белка, составляющей приблизительно 25 МЕ/кг. В другом варианте осуществления схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы композиции или химерного белка, составляющей приблизительно 20 МЕ/кг. В другом варианте осуществления схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы композиции или химерного белка, составляющей приблизительно 10 МЕ/кг.

[00295] В некоторых вариантах осуществления период снижения дозы предусматривает введение композиции или химерного белка каждый день. В других вариантах осуществления период снижения дозы предусматривает введение композиции или химерного белка один раз в приблизительно два дня, один раз в приблизительно три дня, один раз в приблизительно четыре дня, один раз в приблизительно пять дней, один раз в приблизительно шесть дней, один раз в приблизительно семь дней, один раз в приблизительно восемь дней, один раз в приблизительно девять дней, один раз в приблизительно десять дней, один раз в приблизительно одиннадцать дней, один раз в приблизительно двенадцать дней, один раз в приблизительно тринадцать дней или один раз в приблизительно четырнадцать дней.

[00296] В определенных вариантах осуществления снижающуюся дозу вводят один раз в день, один раз в два дня или три раза в неделю. В некоторых вариантах осуществления снижающуюся дозу вводят в течение по меньшей мере приблизительно 1 недели, по

меньшей мере приблизительно 2 недель, по меньшей мере приблизительно 3 недель, по меньшей мере приблизительно 4 недель, по меньшей мере приблизительно 5 недель, по меньшей мере приблизительно 6 недель, по меньшей мере приблизительно 7 недель, по меньшей мере приблизительно 8 недель, по меньшей мере приблизительно 9 недель, по меньшей мере приблизительно 10 недель, по меньшей мере приблизительно 11 недель, по меньшей мере приблизительно 12 недель, по меньшей мере приблизительно 13 недель, по меньшей мере приблизительно 14 недель, по меньшей мере приблизительно 15 недель, по меньшей мере приблизительно 16 недель, по меньшей мере приблизительно 17 недель, по меньшей мере приблизительно 18 недель, по меньшей мере приблизительно 19 недель, по меньшей мере приблизительно 20 недель, по меньшей мере приблизительно 21 недели, по меньшей мере приблизительно 22 недель, по меньшей мере приблизительно 23 недель, по меньшей мере приблизительно 24 недель, по меньшей мере приблизительно 25 недель, по меньшей мере приблизительно 26 недель, по меньшей мере приблизительно 27 недель, по меньшей мере приблизительно 28 недель, по меньшей мере приблизительно 29 недель, по меньшей мере приблизительно 30 недель, по меньшей мере приблизительно 31 недели или по меньшей мере приблизительно 32 недель. В конкретном варианте осуществления снижающуюся дозу вводят в течение приблизительно 16 недель или меньше.

[00297] В определенных вариантах осуществления дозу композиции или химерного белка постепенно снижают в ходе периода снижения дозы, и интервал между введениями доз остается таким же. В других вариантах осуществления интервал между введениями доз увеличивают в ходе периода снижения дозы, и доза композиции или химерного белка остается такой же. В некоторых вариантах осуществления дозу композиции или химерного белка постепенно снижают в ходе периода снижения дозы, и интервал между введениями доз постепенно увеличивают.

[00298] В одном конкретном варианте осуществления период снижения дозы предусматривает введение приблизительно 200 МЕ/кг химерного фактора свертывания крови один раз в два дня с последующим дополнительным снижением дозировки и интервала между

введениями доз. В других вариантах осуществления дозы химерного белка, необходимые на день, можно разделить на две дозы, три дозы или больше. Например, приблизительно 200 МЕ/кг химерного белка можно разделить на приблизительно 100 МЕ/кг два раза в день, приблизительно 70 МЕ/кг три раза в день или приблизительно 50 МЕ/кг четыре раза в день.

[00299] В некоторых вариантах осуществления период снижения дозы длится от приблизительно 1 месяца до приблизительно 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления период снижения дозы длится приблизительно 1 месяц, приблизительно 2 месяца, приблизительно 3 месяца, приблизительно 4 месяца, приблизительно 5 месяцев или приблизительно 6 месяцев. В одном конкретном варианте осуществления период снижения дозы длится приблизительно 4 месяца.

[00300] В определенных вариантах осуществления схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы химерного белка приблизительно, составляющей 100 МЕ/кг, один раз в день от недели 1 до недели 6 после индуцирования иммунологической толерантности. В определенных вариантах осуществления схема со снижением дозы дополнительно предусматривает введение снижающейся дозы химерного белка, составляющей приблизительно 100 МЕ/кг, один раз в два дня от недели 6 до недели 12 после индуцирования иммунологической толерантности. В определенных вариантах осуществления схема со снижением дозы дополнительно предусматривает введение снижающейся дозы химерного белка, составляющей приблизительно 50 МЕ/кг, один раз в два дня от недели 12 до недели 16.

[00301] В некоторых вариантах осуществления за периодом снижения дозы следует период последующего наблюдения. В некоторых вариантах осуществления период последующего наблюдения предусматривает профилактическое лечение с помощью композиции или химерного белка. В некоторых вариантах осуществления период последующего наблюдения предусматривает профилактическое лечение с помощью фактора свертывания крови. Фактор свертывания крови, применяемый в ходе периода последующего наблюдения, может быть выбран из фактора свертывания крови, применяемого в ходе

периодов приобретения толерантности и снижения дозы, с Fc-областью или без таковой и любых его вариантов. Фактор свертывания крови может включать без ограничения нативный фактор свертывания, любой вариант, описанный в данном документе (например, варианты FVIII с делецией домена B), и любой химерный фактор свертывания крови, описанный в данном документе (например, FVIII-Fc, FVIII-альбумин и т. д.). В определенных вариантах осуществления профилактическое лечение предусматривает введение одобренной профилактической дозы, например, рекомбинантного FVIII-Fc. В некоторых вариантах осуществления профилактическое лечение предусматривает 25–65 МЕ/кг (25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 62, 64 или 65 МЕ/кг), и интервал между введениями доз соответствует введению один раз в 3–5, 3–6, 3–7, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или больше дней, или три раза в неделю, или не более трех раз в неделю. В другом варианте осуществления профилактическое лечение предусматривает 65 МЕ/кг, и интервал между введениями доз составляет один раз в неделю или один раз в 6–7 дней. В другом варианте осуществления профилактическое лечение предусматривает введение дозы фактора свертывания крови, составляющей 50 МЕ/кг. В другом варианте осуществления профилактическое лечение предусматривает введение дозы фактора свертывания крови, составляющей 50 МЕ/кг, и интервал между введениями доз соответствует введению приблизительно три раза в неделю. В одном конкретном варианте осуществления профилактическое лечение предусматривает введение дозы фактора свертывания крови, составляющей 50 МЕ/кг, и интервал между введениями доз соответствует введению один раз в 3–5 дней. В определенных вариантах осуществления период последующего наблюдения длится приблизительно 8 месяцев.

[00302] В одном конкретном варианте осуществления химерный белок, например, FVIII-Fc, вводят при приблизительно 200 МЕ/кг/день до тех пор, пока не будет наблюдаться иммунологическая толерантность, например, если титр ингибирующих антител у человека составляет менее приблизительно 0,6 BU; то после индуцирования иммунологической толерантности введение

осуществляют согласно схеме со снижением дозы, где схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы химерного белка, например, FVIII<sub>h</sub>Fc, составляющей приблизительно 100 МЕ/кг, один раз в день от недели 1 до недели 6 после индуцирования иммунологической толерантности, введение снижающейся дозы химерного белка, например, FVIII<sub>h</sub>Fc, составляющей приблизительно 100 МЕ/кг, один раз в два дня от недели 6 до недели 12 после индуцирования иммунологической толерантности, и введение снижающейся дозы химерного белка, например, FVIII<sub>h</sub>Fc, составляющей приблизительно 50 МЕ/кг, один раз в два дня от недели 12 до недели 16; а затем после схемы со снижением дозы профилактическую дозу фактора свертывания крови, составляющую приблизительно 50 МЕ/кг, вводят приблизительно три раза в неделю.

[00303] Композиция или химерный белок, содержащие FVIII и Fc-область, могут быть составлены для любого подходящего способа введения, в том числе, например, местного (например, трансдермального или глазного), перорального, буккального, назального, вагинального, ректального или парентерального введения.

[00304] Термин "парентеральный", используемый в данном документе, включает подкожную, внутрикожную, внутрисосудистую (например, внутривенную), внутримышечную, спинномозговую, внутричерепную, интратекальную, внутриглазную, периокулярную, внутриорбитальную, интрасиновиальную и внутрибрюшинную инъекцию, а также любую подобную методику инъекции или инфузии. Композиция также может представлять собой, например, суспензию, эмульсию, состав с замедленным высвобождением, крем, гель или порошок. Композиция может быть составлена в виде суппозитория с традиционными связующими веществами и носителями, такими как триглицериды.

[00305] В одном примере фармацевтический состав представляет собой жидкий состав, например, забуференный изотонический водный раствор. В другом примере фармацевтическая композиция характеризуется значением pH, которое является физиологическим или близким к физиологическому. В других

примерах водный состав характеризуется физиологическими или близкими к физиологическим значениями осмолярности и содержания солей. Он может содержать хлорид натрия и/или ацетат натрия.

[00306] В некоторых вариантах осуществления химерный белок, содержащий FVIII и Fc-область, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, составлен в фармацевтическую композицию, содержащую: (a) химерный белок; (b) один или несколько стабилизаторов, выбранных из сахарозы, трегалозы, рафинозы, аргинина или их смеси; (c) хлорид натрия (NaCl); (d) L-гистидин; (e) хлорид кальция и (f) полисорбат 20 или полисорбат 80. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит: (a) от 50 МЕ/мл до 2500 МЕ/мл химерного белка; (b) от 10 мг/мл до 25 мг/мл сахарозы; (c) от 8,8 мг/мл до 14,6 мг/мл хлорида натрия (NaCl); (d) от 0,75 мг/мл до 2,25 мг/мл L-гистидина; (e) от 0,75 мг/мл до 1,5 мг/мл дигидрата хлорида кальция и (f) от 0,08 мг/мл до 0,25 мг/мл полисорбата 20 или полисорбата 80. В некоторых примерах фармацевтическая композиция, применяемая в способах согласно настоящему изобретению, является лиофилизированной.

[00307] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция не содержит иммунную клетку. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция не содержит клетку.

[00308] В определенных вариантах осуществления у человека, получающего лечение с применением способов согласно настоящему изобретению, ранее сформировался ингибирующий иммунный ответ на FVIII. В некоторых вариантах осуществления ранее сформированный ингибирующий иммунный ответ на FVIII сформировался в ответ на рекомбинантный FVIII. В некоторых вариантах осуществления ранее сформированный ингибирующий иммунный ответ на FVIII сформировался в ответ на продукт FVIII, выбранный из группы, состоящей из ADVATE<sup>®</sup>, RECOMBINATE<sup>®</sup>, KOGENATE FS<sup>®</sup>, HELIXATE FS<sup>®</sup>, ХУНТНА/РЕФАКТО АВ<sup>®</sup>, НЕМОФИЛ-М<sup>®</sup>, МОНАРС-М<sup>®</sup>, МОНОСЛАТ-Р<sup>®</sup>, НУМАТ-Р<sup>®</sup>, АЛФНАТ<sup>®</sup>, КОАТ-ДВИ<sup>®</sup>, АФСТИЛА<sup>®</sup> и НУАТ:С<sup>®</sup>.

[00309] В некоторых вариантах осуществления после приобретения толерантности, о чем соответствуют сниженные титры

ингибирующих антител, фактор свертывания крови в сыворотке крови поддерживается на уровне от приблизительно 100 МЕ/дл до приблизительно 200 МЕ/дл. В некоторых вариантах осуществления эффективное количество композиции или химерного белка снижают перед началом схемы со снижением дозы для поддержания фактора свертывания крови в сыворотке крови на уровне от приблизительно 100 МЕ/дл до приблизительно 200 МЕ/дл. В определенных вариантах осуществления эффективное количество композиции или химерного белка снижают до приблизительно 175 МЕ/кг/день, если уровень фактора свертывания крови в сыворотке крови превышает или равняется 200 МЕ/дл. В определенных вариантах осуществления эффективное количество композиции или химерного белка снижают до приблизительно 150 МЕ/кг/день, если уровень фактора свертывания крови в сыворотке крови превышает или равняется 200 МЕ/дл. В определенных вариантах осуществления эффективное количество композиции или химерного белка снижают до приблизительно 125 МЕ/кг/день, если уровень фактора свертывания крови в сыворотке крови превышает или равняется 200 МЕ/дл. В определенных вариантах осуществления эффективное количество композиции или химерного белка снижают до приблизительно 100 МЕ/кг/день, если уровень фактора свертывания крови в сыворотке крови превышает или равняется 200 МЕ/дл. В определенных вариантах осуществления эффективное количество композиции или химерного белка снижают до приблизительно 75 МЕ/кг/день, если уровень фактора свертывания крови в сыворотке крови превышает или равняется 200 МЕ/дл. В определенных вариантах осуществления эффективное количество композиции или химерного белка снижают до приблизительно 50 МЕ/кг/день, если уровень фактора свертывания крови в сыворотке крови превышает или равняется 200 МЕ/дл. В определенных вариантах осуществления эффективное количество композиции или химерного белка снижают до приблизительно 25 МЕ/кг/день, если уровень фактора свертывания крови в сыворотке крови превышает или равняется 200 МЕ/дл.

[00310] Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к способам индуцирования иммунологической толерантности у человека с гемофилией, включающим введение

человеку композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область, в дозе, составляющей приблизительно 200 МЕ/кг. В определенных вариантах осуществления композицию или химерный белок вводят один раз в два дня. В других вариантах осуществления композицию или химерный белок вводят ежедневно.

[00311] В других аспектах настоящее изобретение относится к способам индуцирования иммунологической толерантности у человека с гемофилией, включающим введение человеку композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область, в дозе, составляющей приблизительно 202 МЕ/кг. В определенных вариантах осуществления композицию или химерный белок вводят ежедневно.

[00312] В других аспектах настоящее изобретение относится к способам индуцирования иммунологической толерантности у человека с гемофилией, включающим введение человеку композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область, в дозе, составляющей приблизительно 150 МЕ/кг. В определенных вариантах осуществления композицию или химерный белок вводят ежедневно.

[00313] В других аспектах настоящее изобретение относится к способам индуцирования иммунологической толерантности у человека с гемофилией, включающим введение человеку композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область, в дозе, составляющей приблизительно 130 МЕ/кг. В определенных вариантах осуществления композицию или химерный белок вводят ежедневно.

[00314] В других аспектах настоящее изобретение относится к способам индуцирования иммунологической толерантности у человека с гемофилией, включающим введение человеку композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область, в дозе, составляющей приблизительно 115 МЕ/кг. В определенных вариантах осуществления композицию или химерный белок вводят один раз в два дня.

[00315] В других аспектах настоящее изобретение относится к способам индуцирования иммунологической толерантности у человека

с гемофилией, включающим введение человеку композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область, в дозе, составляющей приблизительно 100 МЕ/кг. В определенных вариантах осуществления композицию или химерный белок вводят ежедневно. В других вариантах осуществления композицию или химерный белок вводят три раза в неделю.

[00316] В других аспектах настоящее изобретение относится к способам индуцирования иммунологической толерантности у человека с гемофилией, включающим введение человеку композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область, в дозе, составляющей приблизительно 102 МЕ/кг. В определенных вариантах осуществления композицию или химерный белок вводят один раз в два дня.

[00317] В других аспектах настоящее изобретение относится к способам индуцирования иммунологической толерантности у человека с гемофилией, включающим введение человеку композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область, в дозе, составляющей приблизительно 96 МЕ/кг. В определенных вариантах осуществления композицию или химерный белок вводят ежедневно.

[00318] В других аспектах настоящее изобретение относится к способам индуцирования иммунологической толерантности у человека с гемофилией, включающим введение человеку композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область, в дозе, составляющей приблизительно 85 МЕ/кг. В определенных вариантах осуществления композицию или химерный белок вводят ежедневно.

[00319] В других аспектах настоящее изобретение относится к способам индуцирования иммунологической толерантности у человека с гемофилией, включающим введение человеку композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область, в дозе, составляющей приблизительно 50 МЕ/кг. В определенных вариантах осуществления композицию или химерный белок вводят три раза в неделю.

[00320] Определенные аспекты настоящего изобретения относятся к способам индуцирования иммунологической

толерантности у человека с гемофилией, включающим (1) введение человеку композиции или химерного белка, содержащих фактор свертывания крови и Fc-область, в дозе, составляющей приблизительно 200 МЕ/кг, где композиция или химерный белок обеспечивают индуцирование иммунологической толерантности у человека; и (2) после индуцирования иммунологической толерантности введение человеку композиции или химерного белка по схеме со снижением дозы.

### **II.A.2 Fc**

[00321] В некоторых вариантах осуществления композиции, химерные белки и/или факторы свертывания крови согласно настоящему изобретению включают Fc-домен или его часть, которые связываются с Fc-рецептором (FcR; например, FcRn). В некоторых вариантах осуществления Fc-домен слит с фактором свертывания крови, например, как часть химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область. В других вариантах осуществления Fc-домен слит с полипептидом, отличным от фактора свертывания крови, где композиция содержит (1) фактор свертывания крови и (2) химерный белок, содержащий Fc-домен и дополнительный полипептид. Fc-домен или его часть могут улучшать фармакокинетические или фармакодинамические свойства химерного белка. В определенных вариантах осуществления Fc-домен или его часть обеспечивают продление периода полужизни молекулы, слитой с Fc-доменом или его частью.

[00322] Используемый в данном документе термин "Fc-домен" из "Fc-области", как используется в данном документе, означает функциональные партнеры по связыванию FcR (например, FcRn), если не указано иное. Fc-домен является частью полипептида, которая соответствует Fc-домену нативного Ig, т. е. образован путем димерной ассоциации соответствующих Fc-доменов двух его тяжелых цепей. Нативный Fc-домен образует гомодимер с другим Fc-доменом. В отличие от этого, термины "генетически слитая Fc-область" или "одноцепочечная Fc-область" (scFc-область), используемые в данном документе, относятся к синтетической димерной Fc-области, состоящей из Fc-доменов, генетически соединенных в одну полипептидную цепь (т. е. кодируемых одной непрерывной

генетической последовательностью).

[00323] В одном варианте осуществления "Fc-область" относится к части одной тяжелой цепи Ig, начинающейся в шарнирной области непосредственно выше сайта расщепления папаином (т. е. остатка 216 в IgG, если принять первый остаток константной области тяжелой цепи за 114) и заканчивающейся на C-конце антитела. Соответственно, полный Fc-домен содержит по меньшей мере шарнирный домен, CH2-домен и CH3-домен.

[00324] Fc-область константной области Ig в зависимости от изоформа Ig может включать в себя домены CH2, CH3 и CH4, а также шарнирную область. Химерные белки, содержащие Fc-область Ig, наделяют химерный белок несколькими необходимыми свойствами, включая увеличенную стабильность, увеличенный период полужизни в сыворотке крови (см. Capon *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 посредством ссылки во всей своей полноте).

[00325] Рецептор FcRn был выделен у некоторых видов млекопитающих, в том числе у людей. 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 Ig, такие как IgA, IgM, IgD и IgE) при относительно низком значении pH, осуществляет активный транспорт IgG через клетку по направлению от просвета к серозной оболочке, а затем высвобождает IgG при относительно более высоком значении pH, обнаруживаемом в интерстициальных жидкостях. Он экспрессируется в эпителиальной ткани взрослых (патенты США №№ 6485726, 6030613, 6086875; WO 03/077834; US2003-0235536A1), в том числе в эпителии легких и кишечника (Israel *et al.* 1997, *Immunology* 92:69), эпителии почечных проксимальных канальцев (Kobayashi *et al.* 2002, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282: F358), а также эпителии полости носа, на поверхностях влагалища и поверхностях желчных протоков.

[00326] Fc-области, применимые в настоящем изобретении, охватывают молекулы, которые могут специфично связывать FcR, в

том числе целый IgG, Fc-фрагмент IgG и другие фрагменты, которые включают в себя полную связывающую область для FcR. Область Fc-части IgG, которая связывается, например, с рецептором FcRn, была описана на основе рентгеноструктурной кристаллографии (Burmeister et al. 1994, Nature 372:379). Основная область контакта Fc с FcRn находится вблизи стыка доменов CH2 и CH3. Все области контакта Fc-FcRn находятся в пределах одной тяжелой цепи Ig. Fc-области включают целый IgG, Fc-фрагмент IgG и другие фрагменты IgG, которые включают в себя полную связывающую область для FcRn. Основные сайты контакта включают аминокислотные остатки 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 и 314 из домена CH2 и аминокислотные остатки 385-387, 428 и 433-436 из домена CH3. Все из ссылок на нумерацию аминокислот Ig или фрагментов или областей Ig основаны на Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md.

[00327] "Специфично связанный" относится к двум молекулам, образующим комплекс, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфичное связывание характеризуется высокой аффинностью и емкостью от низкой до умеренной, в отличие от неспецифичного связывания, которое обычно характеризуется низкой аффинностью и емкостью от умеренной до высокой. Как правило, связывание считается специфичным, если константа аффинности  $KA$  превышает  $10^6 \text{ M}^{-1}$  или превышает  $10^8 \text{ M}^{-1}$ . При необходимости неспецифичное связывание можно уменьшить без существенного влияния на специфичное связывание путем изменения условий связывания. Соответствующие условия связывания, такие как концентрация молекул, ионная сила раствора, температура, допустимое время связывания, концентрация блокирующего средства (например, сывороточного альбумина, казеина молока) и т. д., могут быть оптимизированы специалистом в данной области с применением обычных методик.

[00328] В определенных вариантах осуществления химерный белок согласно настоящему изобретению содержит одну или несколько усеченных Fc-областей, которых, тем не менее, достаточно для придания Fc-области свойств связывания FcR.

Например, часть Fc-области, которая связывается с FcRn (т. е. FcRn-связывающая часть), содержит приблизительно аминокислоты 282-438 из IgG1 согласно нумерации EU, при этом основными сайтами контакта являются аминокислоты 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 и 314 из CH2-домена и аминокислотные остатки 385-387, 428 и 433-436 из CH3-домена. Таким образом, Fc-область согласно настоящему изобретению может содержать FcRn-связывающую часть или состоять из нее.

[00329] FcR-связывающие части могут быть получены из тяжелых цепей любого изотипа, в том числе IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В одном варианте осуществления применяют FcR-связывающую часть из антитела изотипа IgG1 человека. В другом варианте осуществления применяют FcR-связывающую часть из антитела изотипа IgG4 человека.

[00330] В другом варианте осуществления "Fc-область" включает аминокислотную последовательность Fc-домена или аминокислотную последовательность, полученную из Fc-домена. В определенных вариантах осуществления Fc-область содержит по меньшей мере одно из шарнирного (например, верхней, средней и/или нижней шарнирной области) домена (приблизительно аминокислоты 216-230 Fc-области антитела в соответствии с нумерацией EU), CH2-домена (приблизительно аминокислоты 231-340 Fc-области антитела в соответствии с нумерацией EU), CH3-домена (приблизительно аминокислоты 341-438 Fc-области антитела в соответствии с нумерацией EU), CH4-домена или их варианта, части или фрагмента. В других вариантах осуществления Fc-область содержит полный Fc-домен (т. е. шарнирный домен, CH2-домен и CH3-домен). В некоторых вариантах осуществления Fc-область содержит шарнирный домен (или его часть), слитый с CH3-доменом (или его частью), шарнирный домен (или его часть), слитый с CH2-доменом (или его частью), CH2-домен (или его часть), слитый с CH3-доменом (или его частью), CH2-домен (или его часть), слитый как с шарнирным доменом (или его частью), так и с CH3-доменом (или его частью), состоит по сути из них или состоит из них. В еще нескольких вариантах осуществления Fc-область не содержит по меньшей мере части CH2-домена (например, всего или части CH2-

домена). В конкретном варианте осуществления Fc-область содержит аминокислоты 221-447 в соответствии с нумерацией EU или состоит из них.

[00331] Fc-области, обозначенные в данном документе как F, F1 или F2, могут быть получены из ряда различных источников. В одном варианте осуществления Fc-область полипептида получена из Ig человека. Однако следует понимать, что Fc-область может быть получена из Ig другого вида млекопитающего, в том числе, например, вида грызуна (например, мыши, крысы, кролика или морской свинки) или отличного от человека примата (например, шимпанзе, макака). Более того, полипептидные Fc-домены или их части могут быть получены из любого класса Ig, в том числе IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изоформа Ig, в том числе IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В другом варианте осуществления применяют изоформ IgG1 человека.

[00332] В определенных вариантах осуществления вариант Fc обеспечивает изменение по меньшей мере одной эффекторной функции, придаваемой Fc-областью, содержащей Fc-домен дикого типа (например, улучшение или снижение способности Fc-области к связыванию с Fc-рецепторами (например, улучшение или снижение связывания с FcγRI, FcγRII или FcγRIII), белками системы комплемента (например, C1q) или другими партнерами по связыванию для Fc (например, DC-SIGN) или индуцировать антителозависимую цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз или комплементзависимую цитотоксичность (CDCC)). В других вариантах осуществления вариант Fc предоставляет сконструированный цистеиновый остаток.

[00333] В качестве Fc-областей согласно настоящему изобретению могут использоваться известные из уровня техники варианты Fc, которые, как известно, обеспечивают изменение (например, усиление или снижение) эффекторной функции и/или связывания FcR или FcRn. В частности, связывающая молекула согласно настоящему изобретению может содержать, например, изменение (например, замену) в одном или нескольких аминокислотных положениях, раскрытых в международных публикациях согласно PCT WO88/07089A1, WO96/14339A1, WO98/05787A1, WO98/23289A1, WO99/51642A1, WO99/58572A1, WO00/09560A2,

W000/32767A1, W000/42072A2, W002/44215A2, W002/060919A2,  
W003/074569A2, W004/016750A2, W004/029207A2, W004/035752A2,  
W004/063351A2, W004/074455A2, W004/099249A2, W005/040217A2,  
W004/044859, W005/070963A1, W005/077981A2, W005/092925A2,  
W005/123780A2, W006/019447A1, W006/047350A2 и W006/085967A2;  
публикациях заявок на патент США №№ US2007/0231329,  
US2007/0231329, US2007/0237765, US2007/0237766, US2007/0237767,  
US2007/0243188, US2007/0248603, US2007/0286859, US2008/0057056  
или патентах США №№ 5648260; 5739277; 5834250; 5869046; 6096871;  
6121022; 6194551; 6242195; 6277375; 6528624; 6538124; 6737056;  
6821505; 6998253; 7083784; 7404956 и 7317091. В одном варианте  
осуществления конкретное изменение (например, конкретная замена  
одной или нескольких аминокислот, раскрытых в уровне техники)  
может быть осуществлено в одном или нескольких раскрытых  
аминокислотных положениях. В другом варианте осуществления может  
быть осуществлено другое изменение в одном или нескольких  
раскрытых аминокислотных положениях (например, другая замена в  
одном или нескольких аминокислотных положениях, раскрытых в  
уровне техники).

[00334] Fc-область может быть модифицирована в соответствии  
с хорошо известными процедурами, такими как сайт-направленный  
мутация и т. п., с получением модифицированных Fc-фрагментов  
или их частей, которые будут связываться Fc $\gamma$ RIIB и/или DC-SIGN.  
Такие модификации включают модификации, удаленные от сайтов  
контакта Fc $\gamma$ RIIB и/или DC-SIGN, а также модификации в пределах  
сайтов контакта, которые обеспечивают сохранение или даже  
усиление связывания с Fc $\gamma$ RIIB и/или DC-SIGN. Например, следующие  
отдельные аминокислотные остатки в Fc IgG1 человека (Fc $\gamma$ 1) могут  
быть заменены без значительной потери аффинности связывания Fc в  
отношении Fc $\gamma$ RIIB и/или DC-SIGN: P238A, S239A, K246A, K248A,  
D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A,  
D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A,  
N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A,  
S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A,  
N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A,  
A330Q, P331A, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A,

R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A и K447A, где, например, P238A представляет собой пролин дикого типа, замененный на аланин в положении под номером 238. В качестве примера, конкретный вариант осуществления включает мутацию N297A, обеспечивающую удаление высококонсервативного сайта N-гликозилирования. Аминокислоты дикого типа в положениях, указанных выше, могут быть заменены, в дополнение к аланину, другими аминокислотами. Мутации могут быть введены в Fc по отдельности, что приводит к образованию более ста Fc-областей, отличных от нативного Fc. Кроме того, комбинации из двух, трех или более из этих отдельных мутаций могут быть введены вместе, что приводит к образованию сотен других Fc-областей. Более того, одна из Fc-областей конструкции согласно настоящему изобретению может быть подвергнута мутации, а другая Fc-область конструкции вообще не подвергнута мутации, или они обе могут быть подвергнуты мутации, но с помощью разных мутаций.

[00335] Определенные из вышеуказанных мутаций могут придавать новое функциональное свойство Fc-области или партнеру по связыванию FcRn. Например, один вариант осуществления включает N297A, обеспечивающую удаление высококонсервативного сайта N-гликозилирования. Эффект этой мутации заключается в снижении иммуногенности, за счет чего увеличивается период полужизни Fc-области в кровотоке, и обеспечении отсутствия способности у Fc-области к связыванию с FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB и FcγRIIIA без нарушения аффинности в отношении FcRn (Routledge et al. 1995, Transplantation 60:847; Friend et al. 1999, Transplantation 68:1632; Shields et al. 1995, J. Biol. Chem. 276:6591). В качестве дополнительного примера нового функционального свойства, возникающего в результате вышеописанных мутаций, аффинность в отношении FcRn в некоторых случаях может превышать таковую у дикого типа. Эту увеличенную аффинность могут отражать увеличенная скорость ассоциации,

сниженная скорость диссоциации или как увеличенная скорость ассоциации, так и сниженная скорость диссоциации. Примеры мутаций, которые, как полагают, придают увеличенную аффинность в отношении FcRn, включают без ограничения T256A, T307A, E380A и N434A (Shields et al. 2001, J. Biol. Chem. 276:6591).

[00336] Кроме того, по меньшей мере три Fc-гамма-рецептора человека, по-видимому, распознают сайт связывания на IgG в нижней шарнирной области, обычно аминокислоты 234-237. Следовательно, другой пример нового функционального свойства и потенциальной сниженной иммуногенности может возникать в результате мутаций в этой области, например, путем замены аминокислот 233-236 "ELLG" IgG1 человека на соответствующую последовательность "PVA" из IgG2 (с делецией одной аминокислоты). Было показано, что FcγRI, FcγRII и FcγRIII, которые опосредуют различные эффекторные функции, не будут связываться с IgG1 при введении таких мутаций. Ward and Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77, и Armour et al. 1999, Eur. J. Immunol. 29:2613.

[00337] В одном варианте осуществления Fc-домен или его часть представляют собой полипептид, содержащий SEQ ID NO: 3 из патента США № 5739277, и необязательно дополнительно содержащий последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 11, 1, 2 и 31 из патента США № 5739277.

[00338] В определенных вариантах осуществления Fc-домен или его часть являются полугликозилированными. Например, химерный белок, содержащий две Fc-области, может содержать первую гликозилированную Fc-область (например, гликозилированную CH2-область) и вторую негликозилированную Fc-область (например, негликозилированную CH2-область). В одном варианте осуществления линкер может быть помещен между гликозилированной и негликозилированной Fc-областями. В другом варианте осуществления Fc-область является полностью гликозилированной, т. е. все Fc-области являются гликозилированными. В других вариантах осуществления Fc-область может быть негликозилированной, т. е. ни один из Fc-компонентов не является гликозилированным.

[00339] В определенных вариантах осуществления химерный белок согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную замену в Fc-домене или его части (например, варианты Fc), обеспечивающую изменение независимых от антигена эффекторных функций Fc-домена, в частности периода полужизни белка в кровотоке.

[00340] Такие белки демонстрируют увеличенное либо сниженное связывание с FcR по сравнению с белками, не содержащими таких замен, и, следовательно, характеризуются соответственно увеличенным или сниженным периодом полужизни в сыворотке крови. Предполагается, что варианты Fc с улучшенной аффинностью в отношении FcR характеризуются более длительными периодами полужизни в сыворотке крови, и такие молекулы имеют полезную применимость в способах лечения млекопитающих, при которых необходим длительный период полужизни введенного полипептида, например, для лечения хронического заболевания или нарушения (см., например, патенты США 7348004, 7404956 и 7862820). В отличие от этого, ожидается, что варианты Fc со сниженной аффинностью связывания FcR будут характеризоваться более короткими периодами полужизни, и такие молекулы также применимы, например, для введения млекопитающему, при котором целесообразным может быть сокращенное время циркуляции, например, для диагностической визуализации *in vivo* или в ситуациях, когда исходный полипептид оказывает токсические побочные эффекты, если присутствует в кровотоке в течение длительных периодов. Варианты Fc со сниженной аффинностью связывания FcRn также с меньшей долей вероятности пересекают плацентарный барьер и, таким образом, также являются применимыми в лечении заболеваний или нарушений у беременных женщин. Кроме того, другие пути применения, при которых может быть необходимой сниженная аффинность связывания FcRn, включают такие пути применения, при которых необходима локализация в головном мозге, почке и/или печени. В одном иллюстративном варианте осуществления химерный белок согласно настоящему изобретению характеризуется сниженным транспортом через эпителий клубочков почки из сосудистой сети. В другом варианте осуществления

химерный белок согласно настоящему изобретению характеризуется сниженным транспортом через гематоэнцефалический барьер (BBB) из головного мозга в сосудистое пространство. В одном варианте осуществления белок с измененным связыванием FcR содержит по меньшей мере одну Fc-область (например, одну или две Fc-области), имеющую одну или несколько аминокислотных замен в пределах "FcR-связывающей петли" константной области Ig. FcR-связывающая петля в одном варианте осуществления состоит из аминокислотных остатков 280-299 (в соответствии с нумерацией EU) полноразмерной Fc-области дикого типа. В других вариантах осуществления константная область Ig или ее часть в химерном белке согласно настоящему изобретению, характеризующемся измененной аффинностью связывания FcR, включает по меньшей мере одну Fc-область, имеющую одну или несколько аминокислотных замен в пределах "зоны контакта" FcR длиной 15 Å. Используемый в данном документе термин "зона контакта" FcR длиной 15 Å включает остатки в следующих положениях полноразмерного Fc-компонента дикого типа: 243-261, 275-280, 282-293, 302-319, 336-348, 367, 369, 372-389, 391, 393, 408, 424, 425-440 (нумерация EU). В других вариантах осуществления Fc-домен или его часть согласно настоящему изобретению, характеризующиеся измененной аффинностью связывания FcR, содержат по меньшей мере одну Fc-область, имеющую одну или несколько аминокислотных замен в аминокислотном положении, соответствующем любому из следующих EU-положений: 256, 277-281, 283-288, 303-309, 313, 338, 342, 376, 381, 384, 385, 387, 434 (например, N434A или N434K) и 438. Иллюстративные аминокислотные замены, обеспечивающие изменение FcR-связывающей активности, раскрыты в международной публикации согласно РСТ № W005/047327, которая включена в данный документ посредством ссылки.

[00341] Fc-область, применяемая в настоящем изобретении, также может содержать известную из уровня техники аминокислотную замену, обеспечивающую изменение гликозилирования химерного белка. Например, Fc-область химерного белка, соединенная с белком FVIII, может включать Fc-область, имеющую мутацию, приводящую к пониженному гликозилированию (например, N- или O-

связанному гликозилированию), или может включать измененную гликоформу Fc-компонента дикого типа (например, гликан с низким содержанием фукозы или не содержащий фукозы гликан).

[00342] В одном варианте осуществления непроцессированный химерный белок согласно настоящему изобретению может содержать генетически слитую Fc-область (т. е. scFc-область), имеющую две или более составляющих ее константных областей Ig или их частей, независимо выбранных из константной области Ig или ее части, описанных в данном документе. В одном варианте осуществления Fc-области димерной Fc-области являются одинаковыми. В другом варианте осуществления по меньшей мере две Fc-области являются разными. Например, Fc-области белков согласно настоящему изобретению содержат одинаковое количество аминокислотных остатков, или они могут отличаться по длине одним или несколькими аминокислотными остатками (например, приблизительно 5 аминокислотными остатками (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными остатками), приблизительно 10 остатками, приблизительно 15 остатками, приблизительно 20 остатками, приблизительно 30 остатками, приблизительно 40 остатками или приблизительно 50 остатками). В еще нескольких других вариантах осуществления Fc-области белка согласно настоящему изобретению могут отличаться по последовательности в одном или нескольких аминокислотных положениях. Например, по меньшей мере две из Fc-областей могут отличаться по приблизительно 5 аминокислотным положениям (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотным положениям), приблизительно 10 положениям, приблизительно 15 положениям, приблизительно 20 положениям, приблизительно 30 положениям, приблизительно 40 положениям или приблизительно 50 положениям.

[00343] В некоторых вариантах осуществления химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит более одной полипептидной цепи. В некоторых вариантах осуществления химерный белок содержит две полипептидных цепи. В определенных вариантах осуществления первая полипептидная цепь содержит фактор свертывания крови и первую Fc-область, а вторая полипептидная цепь содержит вторую Fc-область. В определенных

вариантах осуществления первая Fc-область и вторая Fc-область связаны посредством ковалентной связи. В одном варианте осуществления первая Fc-область и вторая Fc-область связаны посредством пептидной связи. В другом варианте осуществления первая Fc-область и вторая Fc-область связаны посредством дисульфидной связи.

[00344] В одном конкретном варианте осуществления химерный белок содержит часть, представляющую собой фактор VIII, и часть, представляющую собой фактор фон Виллебранда (VWF), где часть FVIII включает полипептид FVIII или его фрагмент, где часть VWF включает полипептид VWF или его фрагмент, где часть FVIII соединена с первой Fc-областью, где часть VWF соединена со второй Fc-областью, и где первая Fc-область и вторая Fc-область связаны друг с другом. В определенных вариантах осуществления часть VWF содержит домены D' и D3 из VWF. В одном варианте осуществления первый полипептид, второй полипептид или как первый полипептид, так и второй полипептид дополнительно содержат один или несколько компонентов, обеспечивающих продление периода полужизни.

[00345] Fc-область или ее часть для получения химерного белка, применяемого в способах согласно настоящему изобретению, могут быть получены из ряда различных источников. В некоторых вариантах осуществления Fc-область или ее часть получены из Ig человека. Однако следует понимать, что Fc-область или ее часть могут быть получены из Ig другого вида млекопитающего, в том числе, например, вида грызуна (например, мыши, крысы, кролика, морской свинки) или отличного от человека примата (например, шимпанзе, макака). Более того, Fc-область или ее часть могут быть получены из любого класса Ig, в том числе IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа Ig, в том числе IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В одном варианте осуществления применяют изотип IgG1 человека.

[00346] Разнообразные последовательности генов Fc-областей (например, последовательности генов Fc человека) доступны в форме общедоступных депонирований. Можно выбрать последовательности Fc, обладающие конкретной эффекторной

функцией (или не обладающие конкретной эффекторной функцией) или имеющие конкретную модификацию для снижения иммуногенности. Было опубликовано большое количество последовательностей антител и генов, кодирующих антитела, и подходящие последовательности Fc-области могут быть получены из этих последовательностей с применением методик, известных из уровня техники. Генетический материал, полученный с применением любого из вышеуказанных способов, можно затем подвергать изменению или синтезу с получением химерных белков, применяемых в способах согласно настоящему изобретению. Дополнительно следует понимать, что объем настоящего изобретения охватывает аллели, варианты и мутации последовательностей ДНК константной области.

[00347] Последовательности Fc или ее части могут быть клонированы, например, с применением полимеразной цепной реакции и праймеров, выбранных для обеспечения амплификации представляющего интерес домена. Для клонирования последовательности Fc-области или ее части из антитела мРНК можно выделить из клеток гибридомы, селезенки или лимфатических клеток, подвергнуть обратной транскрипции с образованием ДНК и амплифицировать гены антитела с помощью ПЦР. Способы ПЦР-амплификации подробно описаны 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). ПЦР можно инициировать консенсусными праймерами для константной области или более специфичными праймерами на основе опубликованных последовательностей ДНК и аминокислотных последовательностей тяжелой и легкой цепей. Как обсуждалось выше, ПЦР также можно применять для выделения клонов ДНК, кодирующих легкую и тяжелую цепи антитела. В этом случае библиотеки могут быть подвергнуты скринингу с помощью консенсусных праймеров или более крупных гомологичных зондов, таких как зонды для константной области мыши. Из уровня техники известны многочисленные наборы праймеров, подходящие для амплификации генов антител (например, 5'-праймеры на основе N-концевой последовательности очищенных

антител (Benhar and Pastan. 1994. Protein Engineering 7:1509); праймеры для быстрой амплификации концов кДНК (Ruberti, F. et al. 1994. J. Immunol. Methods 173:33); праймеры для лидерных последовательностей антител (Larrick et al. 1989 Biochem. Biophys. Res. Commun. 160:1250)). Клонирование последовательностей антител дополнительно описано в выданном Newman et al. патенте США № 5658570, поданном 25 января 1995 г., который включен в данный документ посредством ссылки.

**II.B. Компоненты, обеспечивающие продление периода полужизни**

[00348] В некоторых вариантах осуществления химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, дополнительно содержит один или несколько компонентов, обеспечивающих продление периода полужизни. Период полужизни фактора свертывания крови можно определить с помощью любого способа, известного специалистам в данной области, например, с помощью анализов активности FVIII (хромогенного анализа или одностадийного анализа свертывания крови aPTT) с выявлением уровней активности FVIII в плазме крови или ELISA для FVIII с выявлением уровня антигена FVIII в плазме крови. В конкретном варианте осуществления период полужизни свертывающей активности фактора свертывания крови определяют с помощью одностадийного анализа свертывания крови. В более конкретном варианте осуществления период полужизни свертывающей активности фактора свертывания крови определяют у мышей – у мышей с *НемА* либо у мышей с двойным нокаутом (DKO) генов FVIII и фактора фон Виллебранда.

[00349] В определенных аспектах гетерологичный компонент, который обеспечивает увеличение периода полужизни фактора свертывания крови согласно настоящему изобретению, включает без ограничения гетерологичный полипептид, такой как альбумин, Fc-область иммуноглобулина, последовательность XTEN, C-концевой пептид (СТР)  $\beta$ -субъединицы хорионического гонадотропина человека, последовательность PAS, последовательность НАР, трансферрин, компоненты, связывающие альбумин, или любые фрагменты, производные, варианты или комбинации этих

полипептидов. В других связанных аспектах компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, может включать сайт присоединения компонента, не являющегося полипептидом, такого как полиэтиленгликоль (PEG), гидроксипропилкрахмал (HES), полисиаловая кислота или любые производные, варианты или комбинации этих компонентов. В определенных вариантах осуществления компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, включает альбумин или его фрагмент, компонент, связывающий альбумин, последовательность PAS, последовательность HAP, трансферрин или его фрагмент, полиэтиленгликоль (PEG), полисиаловую кислоту, гидроксипропилкрахмал (HES), их производное или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, не содержит ХТЕН. В других вариантах осуществления компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, содержит ХТЕН.

[00350] В других вариантах осуществления химерный белок согласно настоящему изобретению конъюгирован с одним или несколькими полимерами. Полимер может быть растворимым в воде или нерастворимым в воде. Полимер может быть присоединен посредством ковалентной или нековалентной связи к фактору свертывания крови, Fc или к другим компонентам, конъюгированным с фактором свертывания крови либо с Fc. Неограничивающими примерами полимера могут быть поли(алкиленоксид), поли(винилпирролидон), поли(виниловый спирт), полиоксазолин или поли(акрилоилморфолин). Дополнительные типы, например, конъюгированного с полимером FVIII раскрыты в патенте США № 7199223, который включен посредством ссылки во всей своей полноте.

[00351] В определенных аспектах химерный белок согласно настоящему изобретению может содержать один, два, три или больше компонентов, обеспечивающих продление периода полужизни, каждый из которых может представлять собой одну и ту же или разные молекулы.

[00352] В некоторых вариантах осуществления компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, слит с N-концом или C-концом химерного белка. В некоторых вариантах осуществления

компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, слит с N-концом или C-концом фактора свертывания крови. В некоторых вариантах осуществления компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, слит с N-концом или C-концом Fc. В определенных вариантах осуществления компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, вставлен в фактор свертывания крови в составе химерного белка.

[00353] В некоторых вариантах осуществления химерный белок содержит FVIII или его часть, и компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, вставлен в FVIII в одном или нескольких положениях, раскрытых в публикации заявки на патент США № 2015-0158929 A1 и/или международной публикации № WO 2015106052 A1, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В одном конкретном варианте осуществления компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, вставлен в домен В (или его фрагмент) FVIII. В одном конкретном варианте осуществления компонент, обеспечивающий продление периода полужизни, вставлен в FVIII непосредственно ниже аминокислотного остатка 745 зрелого FVIII.

#### **II.B.1. Альбумины**

[00354] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один полипептид альбумин или его фрагмент, вариант или производное. Сывороточный альбумин человека (HSA или HA), белок из 609 аминокислот в своей полноразмерной форме, ответственен за значительную долю осмотического давления сыворотки крови, а также выполняет функцию носителя эндогенных и экзогенных лигандов. Термин "альбумин", используемый в данном документе, включает полноразмерный альбумин или его функциональный фрагмент, вариант, производное или аналог. Примеры альбумина или его фрагментов или вариантов раскрыты в публикациях заявок на патент США №№ 2008/0194481A1, 2008/0004206 A1, 2008/0161243 A1, 2008/0261877 A1 или 2008/0153751 A1 или в публикациях заявок согласно РСТ №№ 2008/033413 A2, 2009/058322 A1 или 2007/021494 A2, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00355] Полипептиды, связывающие альбумин (АВР), могут включать без ограничения бактериальные домены, связывающие альбумин, пептиды, связывающие альбумин, или фрагменты антител, связывающие альбумин, которые могут связываться с альбумином. Домен 3 из стрептококкового белка G, раскрытого в Kraulis *et al.*, FEBS Lett. 378:190-194 (1996) и Linhult *et al.*, Protein Sci. 11:206-213 (2002), является примером бактериального домена, связывающего альбумин. Примеры пептидов, связывающих альбумин, раскрыты в Dennis *et al.*, J. Biol. Chem. 2002, 277: 35035-35043 (2002). Примеры фрагментов антител, связывающих альбумин, раскрыты в Muller and Kontermann, Curr. Opin. Mol. Ther. 9:319-326 (2007); Roovers *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. 56:303-317 (2007) и Holt *et al.*, Prot. Eng. Design Sci., 21:283-288 (2008), которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00356] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один сайт присоединения малой молекулы, не являющейся полипептидом, ее варианта или производного, которые могут связываться с альбумином. Например, химерный белок может содержать один или несколько органических компонентов, связывающих альбумин. Примером таких компонентов, связывающих альбумин, является 2-(3-малеимидопропанамидо)-6-(4-(4-йодфенил)бутанамидо)гексаноат (метка "Albu"), раскрытый в Trussel *et al.*, Bioconjugate Chem. 20:2286-2292 (2009).

### **II.B.2. ХТЕН**

[00357] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один полипептид ХТЕН или его фрагмент, вариант или производное. Как используется в данном документе, "последовательность ХТЕН" относится к полипептидам увеличенной длины с не встречающимися в природе по сути неповторяющимися последовательностями, которые состоят в основном из небольших гидрофильных аминокислот, при этом последовательность характеризуется низкой степенью образования или отсутствием вторичной или третичной структуры при физиологических условиях.

В качестве партнера для химерного белка ХТЕН могут служить в качестве носителя, придавая определенные необходимые фармакокинетические, физико-химические и фармацевтические свойства, например, при слиянии с фактором свертывания крови в составе химерного белка или вставке в него. Такие необходимые свойства включают без ограничения улучшенные фармакокинетические параметры и характеристики растворимости.

[00358] Последовательность ХТЕН, слитая с фактором свертывания крови в составе химерного белка, применяемого в способах согласно настоящему изобретению, или вставленная в него, может придавать химерному белку одно или несколько из следующих преимущественных свойств: конформационную гибкость, повышенную растворимость в воде, высокую степень устойчивости к протеазам, низкую иммуногенность, слабое связывание с рецепторами млекопитающих или увеличенные значения гидродинамического радиуса (или радиуса Стокса). В определенных аспектах последовательность ХТЕН может обеспечивать увеличение фармакокинетических свойств, как, например, обеспечивать более длительный период полужизни (например, период полужизни *in vivo*) или увеличенную площадь под кривой (AUC), так что химерный белок сохраняется *in vivo* и обладает прокоагулянтной активностью в течение увеличенного периода времени по сравнению с химерным белком без ХТЕН.

[00359] Примеры последовательностей ХТЕН, которые могут быть вставлены в рекомбинантные белки FVIII согласно настоящему изобретению, раскрыты, например, в публикациях заявок на патент США № 2010/0239554 A1, 2010/0323956 A1, 2011/0046060 A1, 2011/0046061 A1, 2011/0077199 A1 или 2011/0172146 A1 или публикациях международных патентных заявок WO 2010091122 A1, WO 2010144502 A2, WO 2010144508 A1, WO 2011028228 A1, WO 2011028229 A1, WO 2011028344 A2 или WO 2015106052 A1, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### **II.B.3. VWF или его фрагмент**

[00360] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей

мере один полипептид VWF или его фрагмент, вариант или производное. VWF (также известный как F8VWF) представляет собой крупный мультимерный гликопротеин, присутствующий в плазме крови и вырабатываемый конститутивно в эндотелии (в тельцах Вайбеля-Паладе), мегакариоцитах ( $\alpha$ -гранулах тромбоцитов) и субэндотелиальной соединительной ткани. Основным мономером VWF является белок из 2813 аминокислот. Каждый мономер содержит ряд специфических доменов с конкретной функцией - домен D'/D3 (который связывается с фактором VIII), домен A1 (который связывается с тромбоцитарным рецептором GPIb, гепарином и/или, возможно, коллагеном), домен A3 (который связывается с коллагеном), домен C1 (в котором домен RGD связывается с тромбоцитарным интегрином  $\alpha$ IIb $\beta$ 3, когда он активирован) и домен "цистеиновый узел" на С-конце белка (который является общим для VWF и тромбоцитарного фактора роста (PDGF), трансформирующего фактора роста  $\beta$  (TGF $\beta$ ) и  $\beta$ -субъединицы хорионического гонадотропина человека ( $\beta$ HCG)).

[00361] В одном варианте осуществления полипептид VWF представляет собой фрагмент VWF. Термин "фрагмент VWF", используемый в данном документе, включает без ограничения функциональные фрагменты VWF, содержащие домен D' и домен D3, которые способны ингибировать связывание эндогенного VWF с FVIII. В одном варианте осуществления химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит фактор свертывания крови, Fc-область и фрагмент VWF, где фактор свертывания крови включает FVIII, и где фрагмент VWF связывается с белком FVIII. В другом варианте осуществления фрагмент VWF блокирует сайт связывания VWF на белке FVIII, тем самым ингибируя взаимодействие белка FVIII с эндогенным VWF. Фрагменты VWF включают производные, варианты, мутанты или аналоги, у которых сохраняются эти виды активности VWF. В определенных вариантах осуществления фрагмент VWF содержит домен D' и домен D3 VWF.

[00362] Последовательность мономера из 2813 аминокислот VWF человека приведена в Genbank под номером доступа NP\_000543.2. Нуклеотидная последовательность, кодирующая VWF человека,

приведена в Genbank под номером доступа \_\_NM\_000552.3\_.

[00363] В определенных вариантах осуществления белок VWF, применимый согласно данному документу, может быть дополнительно модифицирован для улучшения его взаимодействия с FVIII, например, для улучшения аффинности связывания с FVIII. В других вариантах осуществления белки VWF, применимые для настоящего изобретения, могут иметь другие модификации, например, белок может быть пегилированным, гликозилированным, гезилированным или полисиалилированным. Иллюстративные последовательности VWF, применимые в способах согласно настоящему изобретению, представлены, например, в публикациях заявок на патент США № US 2015/0023959 A1, US 2015/0266943 A1 и US 2015/0158929. В определенных вариантах осуществления белок VWF или его фрагмент слит или совместно вводится с партнером по связыванию FcRn. В некоторых вариантах осуществления белок VWF или его фрагмент слит с Fc или совместно вводится с Fc или полипептидом, содержащим Fc. В некоторых вариантах осуществления белок VWF или его фрагмент слит с альбумином или совместно вводится с альбумином или полипептидом, содержащим альбумин.

#### **II.B.4. СТР**

[00364] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один С-концевой пептид (СТР)  $\beta$ -субъединицы хорионического гонадотропина человека или его фрагмент, вариант или производное. Известно, что СТР-пептиды обеспечивают увеличение периода полужизни данного белка. См., например, патент США № 5712122, включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Неограничивающие иллюстративные СТР-пептиды раскрыты в публикации заявки на патент США № US 2009/0087411 A1, включенной посредством ссылки.

#### **II.B.5. PAS**

[00365] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один пептид PAS или его фрагмент, вариант или производное. Пептид PAS или последовательность PAS, как используется в данном документе, означают аминокислотную последовательность,

содержащую в основном аланиновые и сериновые остатки или содержащую в основном аланиновые, сериновые и пролиновые остатки, при этом аминокислотная последовательность образует произвольную спиральную конформацию при физиологических условиях. Соответственно, последовательность PAS представляет собой структурный блок, полимер из аминокислот или последовательность-кассету, которые содержат аланин, серин и пролин, состоят по сути из них или состоят из них, которые можно применять в качестве части гетерологичного компонента в химерном белке. Полимер из аминокислот также может образовывать произвольную спиральную конформацию при добавлении в последовательность PAS остатков, отличных от аланина, серина и пролина, в качестве дополнительного компонента. Под "дополнительным компонентом" подразумевается, что аминокислоты, отличные от аланина, серина и пролина, могут быть добавлены в последовательность PAS в определенной мере, например, не более приблизительно 12%, т. е. приблизительно 12 из 100 аминокислот последовательности PAS, не более приблизительно 10%, не более приблизительно 9%, не более приблизительно 8%, приблизительно 6%, приблизительно 5%, приблизительно 4%, приблизительно 3%, т. е. приблизительно 2% или приблизительно 1% аминокислот. Аминокислоты, отличные от аланина, серина и пролина, могут быть выбраны из группы, состоящей из Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr и Val. В физиологических условиях пептид PAS образует произвольную спиральную конформацию и за счет этого может обеспечивать увеличенную стабильность рекомбинантного белка согласно настоящему изобретению *in vivo* и/или *in vitro*, а также обладает прокоагулянтной активностью.

[00366] Неограничивающие примеры пептидов PAS раскрыты, например, в публикации заявки на патент США № 2010/0292130 A1; публикации заявки согласно PCT № WO 2008/155134 A1 и выданном европейском патенте № EP2173890.

#### **II.B.6. НАР**

[00367] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей

мере один пептид, являющийся гомополимером из аминокислот (НАР), или его фрагмент, вариант или производное. Пептид НАР может содержать последовательность из повторяющихся глициновых остатков, которая имеет 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. Последовательность НАР может обеспечивать увеличение периода полужизни компонента, слитого или связанного с последовательностью НАР. Неограничивающие примеры последовательности НАР включают без ограничения  $(\text{Gly})_n$ ,  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$  или  $S(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ , где  $n$  равняется 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. В одном варианте осуществления  $n$  равняется 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 26, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40. В другом варианте осуществления  $n$  равняется 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200. См., например, Schlapschy M et al., Protein Eng. Design Selection, 20: 273–284 (2007).

#### **II.B.7. Трансферрин**

[00368] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один пептид трансферрин или его фрагмент, вариант или производное. Любой трансферрин можно сливать с химерным белком, применяемым в способах согласно настоящему изобретению. В качестве примера, Tf человека дикого типа (Tf) представляет собой белок из 679 аминокислот размером приблизительно 75 кДа (без учета гликозилирования) с двумя основными доменами N (приблизительно 330 аминокислот) и C (приблизительно 340 аминокислот), которые, по-видимому, образуются в результате дупликации гена. См. номера доступа в GenBank NM001063, XM002793, M12530, XM039845, XM 039847 и S95936 ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), все из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[00369] Трансферрин транспортирует железо посредством эндоцитоза, опосредованного рецепторами трансферрина (TfR).

После высвобождения железа в эндосомальный компартмент и рециркуляции комплекса Tf-TfR на клеточную поверхность Tf высвобождается обратно во внеклеточное пространство для следующего цикла транспорта железа. Tf обладает длительным периодом полужизни, превышающим 14-17 дней (Li *et al.*, Trends Pharmacol. Sci. 23:206-209 (2002)). Слитые белки, содержащие трансферрин, исследовали в отношении увеличения периода полужизни, целенаправленной доставки противораковых терапевтических средств, доставки при пероральном введении и устойчивой активации проинсулина (Brandsma *et al.*, Biotechnol. Adv., 29: 230-238 (2011); Bai *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:7292-7296 (2005); Kim *et al.*, J. Pharmacol. Exp. Ther., 334:682-692 (2010); Wang *et al.*, J. Controlled Release 155:386-392 (2011)).

#### **II.B.8. PEG**

[00370] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один сайт присоединения гетерологичного компонента, не являющегося полипептидом, или его фрагмента, варианта или производного. Например, химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, может содержать один или несколько компонентов, представляющих собой полиэтиленгликоль (PEG), присоединенных к одному или нескольким аминокислотным остаткам в факторе свертывания крови и/или Fc-области.

[00371] Пегилирование белка может относиться к конъюгату, образуемому между белком и по меньшей мере одной молекулой полиэтиленгликоля (PEG). PEG коммерчески доступен в широком ассортименте с различными значениями молекулярной массы и диапазонами средней молекулярной массы. Типичные примеры диапазонов средней молекулярной массы PEG включают без ограничения приблизительно 200, приблизительно 300, приблизительно 400, приблизительно 600, приблизительно 1000, приблизительно 1300-1600, приблизительно 1450, приблизительно 2000, приблизительно 3000, приблизительно 3000-3750, приблизительно 3350, приблизительно 3000-7000, приблизительно 3500-4500, приблизительно 5000-7000, приблизительно 7000-9000,

приблизительно 8000, приблизительно 10000, приблизительно 8500–11500, приблизительно 16000–24000, приблизительно 35000, приблизительно 40000, приблизительно 60000 и приблизительно 80000 дальтонов. Эти значения средней молекулярной массы приведены исключительно в качестве примеров, а не для ограничения каким-либо образом.

[00372] Химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, может быть пегилирован со включением одного или нескольких (например, 2–4) PEG-компонентов. Пегилирование можно проводить с помощью любой из реакций пегилирования, известных из уровня техники. Способы получения продукта на основе пегилированного белка обычно будут включать (i) осуществление реакции полипептида с полиэтиленгликолем (таким как реакционноспособное сложноэфирное или альдегидное производное PEG) в условиях, при которых происходит присоединение пептида согласно настоящему изобретению к одной или нескольким группам PEG; и (ii) получение продукта(продуктов) реакции. В целом, оптимальные реакционные условия для реакций будут определяться в каждом конкретном случае на основании известных параметров и необходимого результата.

[00373] Существует ряд способов присоединения PEG, которые доступны специалистам в данной области, например, в Malik F *et al.*, *Exp. Hematol.* 20:1028–35 (1992); Francis, *Focus on Growth Factors* 3(2):4–10 (1992); публикациях заявок на европейский патент №№ EP0401384, EP0154316 и EP0401384 и публикациях международных патентных заявок №№ WO92/16221 и WO95/34326. В качестве неограничивающего примера, варианты FVIII могут содержать замены на цистеин, и цистеиновые остатки могут быть дополнительно конъюгированы с полимером PEG. См. Mei *et al.*, *Blood* 116:270–279 (2010) и патент США № 7632921, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

### **II.B.9. HES**

[00374] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один полимер гидроксипроксиэтилкрахмал (HES). HES является

производным встречающегося в природе амилопектина и расщепляется альфа-амилазой в организме. HES проявляет преимущественные биологические свойства и применяется в качестве средства, восполняющего объем крови, и в гемодилюционной терапии в клиниках. См., например, Sommermeyer *et al.*, *Krankenhauspharmazie* 8:271-278 (1987); и Weidler *et al.*, *Arzneim.-Forschung/Drug Res.* 41: 494-498 (1991).

[00375] HES в основном характеризуют по молекулярно-массовому распределению и степени замещения. HES характеризуется средней молекулярной массой (средневзвешенной) от 1 до 300 кДа, от 2 до 200 кДа, от 3 до 100 кДа или от 4 до 70 кДа. Гидроксиэтилкрахмал может дополнительно характеризоваться степенью молярного замещения от 0,1 до 3, от 0,1 до 2, от 0,1 до 0,9 или от 0,1 до 0,8 и соотношением между замещением C2:C6 в диапазоне от 2 до 20 применительно к гидроксиэтильным группам. HES со средней молекулярной массой приблизительно 130 кДа представляет собой VOLUVEN® от Fresenius. VOLUVEN® представляет собой искусственный коллоид, применяемый, например, для восполнения объема, который применяют при терапевтическом показании для терапии и профилактики гиповолемии. Существует ряд способов присоединения HES, доступных специалистам в данной области, например, аналогичные способам присоединения PEG, которые описаны выше.

#### **II.B.10. PSA**

[00376] В определенных аспектах химерный белок, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, содержит по меньшей мере один полимер полисиаловую кислоту (PSA). PSA представляют собой встречающиеся в природе неразветвленные полимеры сиаловой кислоты, вырабатываемые определенными штаммами бактерий и у млекопитающих в определенных клетках. См., например, Roth J. *et al.* (1993) в *Polysialic Acid: From Microbes to Man*, eds. Roth J., Rutishauser U., Troy F. A. (BirkhäuserVerlag, Basel, Switzerland), с. 335-348. PSA могут быть получены с различной степенью полимеризации от  $n \approx 80$  или больше остатков сиаловой кислоты до  $n=2$  путем неполного кислотного гидролиза, или путем расщепления нейраминидазами, или путем

фракционирования природных полученных из бактерий форм полимера. Существует ряд способов присоединения PSA, доступных специалистам в данной области, например, аналогичные способам присоединения PEG, которые описаны выше. В определенных аспектах активированная PSA также может быть присоединена к аминокислотному остатку цистеину в факторе свертывания крови, например, в FVIII, или в Fc-области. См., например, патент США № 5846951.

### **II.B.11.** Рецепторы, опосредующие выведение

[00377] В определенных аспектах период полужизни химерного белка, применяемого в способах согласно настоящему изобретению, может быть увеличен, если фактор свертывания крови в составе химерного белка содержит FVIII и по меньшей мере один фрагмент рецептора, опосредующего выведение FVIII, или его FVIII-связывающий фрагмент, вариант или производное. Посредством вставки растворимых форм рецепторов, опосредующих выведение, таких как белок LRP1, родственные рецепторам липопротеинов низкой плотности, или их фрагментов можно блокировать связывание FVIII с рецепторами, опосредующими выведение, и за счет этого продлевать его период полужизни, например, период полужизни *in vivo*. LRP1 представляет собой интегральный мембранный белок размером 600 кДа, который участвует в рецептор-опосредованном выведении различных белков, в том числе FVIII. См., например, Lenting *et al.*, *Haemophilia* 16:6-16 (2010). Другими подходящими рецепторами, опосредующими выведение FVIII, являются, например, LDLR (рецептор липопротеинов низкой плотности), VLDLR (рецептор липопротеинов очень низкой плотности) и мегалин (LRP-2) или их фрагменты. См., например, Bovenschen *et al.*, *Blood* 106:906-912 (2005); Bovenschen, *Blood* 116:5439-5440 (2010); Martinelli *et al.*, *Blood* 116:5688-5697 (2010).

### **III.** Полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева

[00378] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ индуцирования иммунологической толерантности у человека, включающий введение человеку эффективного количества полинуклеотида или ряда полинуклеотидов, кодирующих фактор свертывания крови и/или Fc-область, например, кодирующих

химерный белок, содержащий фактор свертывания крови и Fc-область, где у человека отсутствовал ответ на один или несколько предшествующих курсов терапии для формирования иммунологической толерантности. В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид или ряд полинуклеотидов находятся в векторе экспрессии или ряде векторов экспрессии. В определенных вариантах осуществления вектор экспрессии или ряд векторов экспрессии находятся в одной или нескольких клетках-хозяевах.

[00379] Полинуклеотид, кодирующий фактор свертывания крови и/или Fc-область, например, кодирующий химерный белок, содержащий фактор свертывания крови и Fc-область, применяемый в способах согласно настоящему изобретению, может представлять собой одну нуклеотидную последовательность, две нуклеотидные последовательности, три нуклеотидные последовательности или больше. В одном варианте осуществления одна нуклеотидная последовательность кодирует химерный белок, содержащий фактор свертывания крови (например, полипептид FVIII) и Fc-область. В другом варианте осуществления полинуклеотид содержит две нуклеотидных последовательности, при этом первая нуклеотидная последовательность кодирует фактор свертывания крови (например, FVIII), а вторая нуклеотидная последовательность кодирует Fc-область. В другом варианте осуществления полинуклеотид содержит две нуклеотидных последовательности, при этом первая нуклеотидная последовательность кодирует фактор свертывания крови (например, FVIII) и Fc-область, а вторая нуклеотидная последовательность кодирует вторую Fc-область. В определенных вариантах осуществления кодируемые Fc-домены образуют ковалентную связь после экспрессии.

[00380] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид является кодон-оптимизированным.

[00381] Как используется в данном документе, вектор экспрессии относится к любой конструкции нуклеиновой кислоты, которая содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей последовательности или, в случае с вектором на основе РНК-содержащего вируса, необходимые элементы для репликации и трансляции при введении в

соответствующую клетку-хозяина. Векторы экспрессии могут включать плазмиды, фагмиды, вирусы и их производные.

[00382] Последовательность, контролирующая экспрессию гена, как используется в данном документе, 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. Последовательность, контролирующая экспрессию гена, может, например, представлять собой промотор млекопитающего или вируса, такой как конститутивный или индуцибельный промотор. Конститутивные промоторы млекопитающих включают без ограничения промоторы следующих генов: гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы (HPRT), аденозиндезаминазы, пируваткиназы, промотор гена бета-актина и другие конститутивные промоторы. Иллюстративные вирусные промоторы, которые функционируют конститутивно в эукариотических клетках, включают в себя, например, промоторы из цитомегаловируса (CMV), вируса обезьян (например, SV40), вируса папилломы, аденовируса, вируса иммунодефицита человека (HIV), вируса саркомы Рауса, цитомегаловируса, длинные концевые повторы (LTR) вируса лейкоза Молони и других ретровирусов, а также промотор гена тимидинкиназы вируса простого герпеса. Специалистам в данной области известны другие конститутивные промоторы. Промоторы, применимые в качестве последовательностей, контролирующих экспрессию генов, согласно настоящему изобретению, также включают в себя индуцибельные промоторы. Индуцибельные промоторы экспрессируются в присутствии индуцирующего средства. Например, промотор гена металлотioneина индуцируется с обеспечением транскрипции и трансляции в присутствии определенных ионов металлов. Другие индуцибельные промоторы известны специалистам в данной области.

[00383] Для целей настоящего изобретения можно применять многочисленные векторные системы экспрессии. Эти векторы экспрессии, как правило, способны реплицироваться в организмах-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде составной части хромосомной ДНК хозяина. Векторы экспрессии могут содержать

последовательности, контролирующие экспрессию, в том числе без ограничения промоторы (например, промоторы, связанные с природным окружением, или гетерологичные промоторы), энхансеры, сигнальные последовательности, сигналы для сплайсинга, энхансерные элементы и последовательности терминации транскрипции. Последовательности, контролирующие экспрессию, предпочтительно представляют собой эукариотические промоторные системы в векторах, способных трансформировать или трансфицировать эукариотические клетки-хозяева. В векторах экспрессии также могут использоваться элементы ДНК, которые получены из вирусов животных, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус полиомы, аденовирус, вирус коровьей оспы, бакуловирус, ретровирусы (RSV, MMTV или MOMLV), цитомегаловирус (CMV) или вирус SV40. В других предусматривается применение полицистронных систем с внутренними сайтами связывания рибосомы.

[00384] Обычно векторы экспрессии содержат селективируемые маркеры (например, ген устойчивости к ампициллину, ген устойчивости к гиромоцину, ген устойчивости к тетрациклину или ген устойчивости к неомицину) для обеспечения выявления тех клеток, которые трансформированы необходимыми последовательностями ДНК (см., например, Itakura *et al.*, патент США № 4704362). Клетки, в хромосомы которых интегрировались ДНК, могут быть отобраны путем введения одного или нескольких маркеров, которые обеспечивают возможность отбора трансфицированных клеток-хозяев. Маркер может обеспечивать прототрофность ауксотрофного хозяина, устойчивость к биоцидам (например, к антибиотикам) или устойчивость к тяжелым металлам, таким как медь. Селективируемый маркерный ген может быть непосредственно связан с последовательностями ДНК, подлежащими экспрессии, либо введен в ту же клетку путем котрансформации.

[00385] Примером вектора, применимого для оптимизированной экспрессии химерных белков, применяемых в способах согласно настоящему изобретению, является NEOSPLA (патент США № 6159730). Этот вектор содержит промотор/энхансер цитомегаловируса, главный промотор бета-глобина мыши, точку начала репликации SV40, последовательность полиаденилирования бычьего гормона роста,

экзон 1 и экзон 2 гена неомицинофосфотрансферазы, ген дигидрофолатредуктазы и лидерную последовательность. Было обнаружено, что этот вектор обеспечивает очень высокий уровень экспрессии антител при включении генов вариабельной и константной областей, трансфекции в клетках с последующим отбором в содержащей G418 среде и амплификацией под действием метотрексата. Векторные системы также описаны в патентах США №№ 5736137 и 5658570, каждый из которых включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Эта система обеспечивает высокие уровни экспрессии, например, > 30 пг/клетка/день. Другие иллюстративные векторные системы раскрыты, например, в патенте США № 6413777.

[00386] В других вариантах осуществления полипептиды согласно настоящему изобретению экспрессируются с применением полицистронных конструкций. В этих системах экспрессии множество представляющих интерес продуктов генов, как, например, множество полипептидов мультимерного связывающего белка, может быть получено из одной полицистронной конструкции. В этих системах преимущественно используют сайт внутренней посадки рибосомы (IRES) для обеспечения относительно высоких уровней полипептидов в эукариотических клетках-хозяевах. Совместимые последовательности IRES раскрыты в патенте США № 6193980, который также включен в данный документ.

[00387] В более общем смысле, после получения вектора или последовательности ДНК, кодирующих полипептид, вектор экспрессии можно вводить в соответствующую клетку-хозяина. Иными словами, клетки-хозяева можно подвергать трансформации. Введение плазмиды в клетку-хозяина можно осуществлять с помощью различных методик, хорошо известных специалистам в данной области, как обсуждалось выше. Трансформированные клетки выращивают в условиях, подходящих для выработки химерного белка, и анализируют в отношении синтеза химерного белка. Иллюстративные методики анализа включают иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA) или анализ с применением клеточного сортера с активацией флуоресценции (FACS), иммуногистохимический анализ и т. п.

[00388] Подробное описание настоящего изобретения станет более понятным при обращении к следующим примерам, которые включены в него исключительно в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения настоящего изобретения.

#### ПРИМЕРЫ

##### **ПРИМЕР 1**

[00389] Гемофилия А ("дефицит фактора VIII [FVIII]") представляет собой редкое нарушение свертываемости крови и наиболее распространенный тип гемофилии. Наиболее серьезным осложнением лечения у пациентов с гемофилией А является выработка ингибирующих антител IgG к FVIII. Ингибиторы приводят к быстрому выведению введенного путем инфузии FVIII и выраженному снижению или отсутствию эффективности. Для лечения острых кровотечений у пациентов, у которых выработались ингибиторы, применяют средства, действующие в обход ингибиторов FVIII, но целью долгосрочного контроля является полное устранение ингибиторов.

[00390] Терапия с целью индуцирования иммунологической толерантности ("ITI") с помощью частых введений высоких доз FVIII является единственной стратегией, которая, как было показано, обеспечивает формирование антигенспецифичной толерантности. С помощью ITI обычно пытаются устранить высокоотвечающие ингибиторы FVIII (титр  $\geq 5$  BU). В нескольких исследованиях была рассмотрена эффективность различных продуктов FVIII в достижении успешной ITI с помощью различных доз и различной частоты инъекций, и для поддержки ITI-подходов в клинической практике были выпущены международные согласованные рекомендации. В международном исследовании ITI пациенты в группе с высокой дозой ("HD") (200 ME/кг/день) достигали отрицательного титра и нормального восстановления показателей значительно быстрее, чем пациенты в группе с низкой дозой ("LD"). *Hay and DiMichele, Blood 119(6):1335-44 (2012)*. Пациенты с HD также испытывали значительно меньше эпизодов кровотечения, чем пациенты с LD, и по этой причине комиссия по отслеживанию данных по вопросам безопасности ("DSMB") рекомендовала прекратить исследование, поскольку она установила, что кровотечение

является вопросом безопасности. Высокая доза 200 МЕ/кг/день является рекомендуемой дозой у пациентов с "высоким риском" (которых определяли как пациентов с максимальным титром в анамнезе > 200 BU, титром до ITI > 10 BU и/или > 5 лет с момента диагностирования наличия ингибитора). Существует возрастающий интерес к исследованию применения rFVIII Fc с увеличенным периодом полужизни ("EHL") при ITI. rFVIII Fc был одобрен в США в 2014 г. под названием ELOSTATE® и в Европе в 2015 г. под названием ELOSTA®.

[00391] rFVIII Fc продуцируется в линии клеток человека ("HEK293") в виде рекомбинантного фактора VIII с делецией В-домена ("BDD"), слитого с Fc-доменом IgG человека. Продуцируемые HEK белки характеризуются посттрансляционными модификациями, схожими с таковыми у нативных белков человека, продуцируемых в линиях клеток от других видов, таких как хомячки (например, клетки CHO). В таких белках отличные от человеческих гликаны (такие как N-гликолилнейраминная кислота, NGNA и галактоза-альфа-1,3-галактоза, альфа-Gal), полученные в результате посттрансляционных модификаций, могут быть потенциально иммуногенными. Ни NGNA, ни альфа-Gal не встречаются в rFVIII Fc. На мышинных моделях также было показано, что rFVIII Fc индуцирует ответы с участием регуляторных Т-клеток на FVIII (см. Batsuli Nemophilia (2016), 22 (Suppl. 5), 31-35), что для некоторых исследователей свидетельствовало о том, что rFVIII Fc может обеспечивать более эффективное ITI, в частности сокращение ITI, чем rFVIII.

#### *Цели*

[00392] Основная цель настоящего исследования заключалась в том, чтобы описать время индуцирования толерантности с помощью rFVIII Fc у пациентов после лечения с целью ITI. Целью исследования также было описание результатов лечения с целью ITI; описание частоты рецидивов в течение определенного периода времени после успешного ITI, реализованного с помощью rFVIII Fc; описания интеркуррентного кровотечения во время ITI и во время периода после успешного ITI, реализованного с помощью rFVIII Fc; описания безопасности и переносимости rFVIII Fc при его

применении для ITI; описания конкретных вопросов качества жизни (QoL) и демонстрации потребления rFVIIIIFc.

#### **ПРИМЕР 2**

[00393] Целью настоящего исследования было описание применения rFVIIIIFc для ITI у пациентов с тяжелой формой гемофилии А, у которых выработались ингибиторы, которые не отвечали на предыдущие курсы ITI-терапии. В частности, основная цель данного исследования заключалась в описании результатов лечения с целью ITI, проведенного с применением rFVIIIIFc, у пациентов, у которых отсутствовал ответ при предыдущих попытках приобретения толерантности, в том числе при применении иммунодепрессантов, после лечения с целью ITI. Вторичные цели и их конечные точки включали: (1) описание времени приобретения толерантности при ITI, реализованном с помощью rFVIIIIFc, у пациентов, у которых отсутствовал ответ при предыдущих попытках приобретения толерантности, в том числе при применении иммунодепрессантов, с конечной точкой, представлявшей собой время до достижения успеха ITI; (2) описание частоты рецидивов после успешного ITI, реализованного с помощью rFVIIIIFc, с конечной точкой, представлявшей собой возникновение рецидива; (3) описание интеркуррентного кровотечения во время ITI и во время периода после успешного ITI, реализованного с помощью rFVIIIIFc, с конечной точкой, представлявшей собой частоту кровотечений; (4) описание безопасности и переносимости rFVIIIIFc при применении для ITI, с конечными точками, представлявшими собой нежелательные явления и/или реакции в месте инъекции; и (5) описание потребления rFVIIIIFc при ITI, реализованном с помощью ELOSTA®, с конечной точкой, представлявшей собой уровень rFVIIIIFc.

#### **ПРИМЕР 3**

[00394] В данном исследовании субъекты мужского пола всех возрастных групп с тяжелой формой гемофилии А и с высоким титром ингибиторов (максимальное значение в анамнезе  $\geq 5$  единиц Бетезда [BU]/мл) получали слитый белок на основе рекомбинантного фактора коагуляции VIII и Fc (rFVIIIIFc) для прохождения впервые терапии с целью индуцирования иммунологической толерантности (ITI) для

устранения и нейтрализации аллоантител к фактору коагуляции VIII (FVIII).

[00395] Участники получали rFVIIIIFc в дозе 200 международных единиц (МЕ)/килограмм (кг) в виде инъекций один раз в день или в виде разделенных на несколько инъекций в день по усмотрению исследователя, начиная с визита исходного уровня и максимум до 48 недель в период ITI. Участники, которые соответствовали критериям успеха индуцирования иммунологической толерантности (ITI), входили в период снижения дозы и получали rFVIIIIFc (в виде порошка для инъекций, вводимого внутривенно) в дозе, скорректированной в соответствии с суждением исследователя (50 или 100 МЕ/кг), один раз в день в течение недель 1-6 и один раз в два дня по неделе 16.

[00396] Первичным критерием результата данного исследования было описание времени приобретения толерантности с помощью rFVIIIIFc в течение периода времени вплоть до 12 месяцев. Приобретение толерантности определяли как титр ингибитора  $< 0,6$  BU/мл, восстановление показателей FVIII  $> 66\%$  и  $t_{1/2} \geq 7$  часов.

[00397] Вторичным показателем результата было количество участников с успехом индуцирования иммунологической толерантности (ITI). Успех ITI определяли как отрицательный титр для ингибитора менее ( $<$ )  $0,6$  BU/мл по результатам модифицированного по Неймегену анализа Бетезда; постепенное восстановление показателей (IR) FVIII  $> 1,3$  международных единиц на децилитр (МЕ/дл) на МЕ/кг в 2 последовательных определениях, представляющих  $66\%$  от ожидаемого IR 2 МЕ/дл на МЕ/кг; период полужизни ( $t_{1/2}$ )  $\geq 7$  часов. Успех ITI отслеживали в течение периода времени вплоть до 48 недель.

[00398] Другим вторичным показателем результата было количество участников, у которых имел место рецидив. Оценивали процентную долю участников с успехом ITI, которые достигали критериев рецидива (определяемых как титр ингибитора  $> 0,6$  BU/мл или аномальные результаты восстановления показателей после достижения толерантности). Рецидив отслеживали в течение периода времени вплоть до 48 недель.

[00399] Другим вторичным показателем результата было

количество эпизодов кровотечения. Эпизод кровотечения, который начинался с первого признака кровотечения и заканчивался не позднее, чем через 72 часа после последнего лечения кровотечения, в течение которого любые симптомы кровотечения в том же местоположении или местах инъекции с интервалом, меньшим или равным 72 часам, считали одним и тем же эпизодом кровотечения. Эпизоды кровотечения отслеживали в течение периода времени вплоть до недели 104.

[00400] Другим вторичным показателем результата было количество участников с возникающими при лечении нежелательными явлениями (АЕ) и возникающими при лечении серьезными нежелательными явлениями (SAE). АЕ представляло собой любое нежелательное медицинское проявление, которое не обязательно имело причинно-следственную связь с данным лечением. SAE представляло собой любое нежелательное медицинское проявление, которое при любой дозе приводило к смерти; по мнению исследователя, подвергало участника непосредственному риску смерти (опасное для жизни явление); приводило к необходимости стационарной госпитализации или продления существующей госпитализации; приводило к постоянной или значительной инвалидизации/нетрудоспособности; приводило к врожденной аномалии/врожденному дефекту; любое другое важное с медицинской точки зрения явление, которое, по мнению исследователя, могло поставить под угрозу участника или потребовать вмешательства для предупреждения возникновения других явлений, перечисленных в данном определении. АЕ и SAE определяли в течение периода времени, составлявшего приблизительно 2 года.

[00401] Другим вторичным показателем результата было количество дней, проведенных вне работы или учебного заведения. Количество дней, пропущенных в учебном заведении или на работе, описательно обобщали за период времени вплоть до недели 104.

[00402] Другим вторичным показателем результата было количество дней госпитализации. Количество дней госпитализации описательно обобщали и отслеживали в течение периода времени вплоть до недели 104.

[00403] Другим вторичным показателем результата было

соблюдение схемы лечения, которое определяли как процент введенных доз относительно запланированных доз и которое отслеживали в течение периода времени вплоть до недели 104.

[00404] Другим вторичным показателем результата было потребление rFVIIIFc. Потребление оценивали по количеству вводимого исследуемого средства лечения, и потребление отслеживали в течение периода времени вплоть до недели 104.

[00405] Настоящее исследование было направлено на участников мужского пола любого возраста, у которых была диагностирована тяжелая форма гемофилии А (что подтверждалось сведениями из медицинской карточки). У субъекта диагностировали высокий титр ингибиторов (максимальное значение в анамнезе, превышающее или равное ( $\geq$ ) 5 биологическим единицам на миллилитр (BU/мл), в соответствии с записями из медицинской карты), и субъекты ранее получали лечение с помощью любого полученного из плазмы или рекомбинантного традиционного FVIII или FVIII с увеличенным периодом полужизни. Критерии исключения включали субъектов, у которых помимо гемофилии А было любое(-ые) другое(-ие) нарушение(-я) свертываемости крови; любую предыдущую ITI-терапию; наличие в анамнезе гиперчувствительности или анафилаксии, ассоциированной с введением любого рекомбинантного фактора коагуляции VIII-Fc (rFVIIIFc); любую аномальную функцию почек (сывороточный креатинин более 2,0 миллиграмма на децилитр [мг/дл]) по результатам оценки в местной лаборатории и/или уровень сывороточной аланинаминотрансферазы или аспаратаминотрансферазы, превышающий в  $> 5$  раз верхний предел нормы (ULN), по результатам оценки в местной лаборатории.

#### **ПРИМЕР 4**

[00406] Неинтервенционный ретроспективный анализ медицинских карт в отношении ITI с помощью rFVIIIFc у пациентов с тяжелой формой гемофилии А и высоким титром ингибиторов (НТИ;  $\geq 5$  BU) проводили в 10 центрах в США и Канаде в период с 1 июля 2014 г. по 1 июня 2017 г. В исследование включали пациентов мужского пола всех возрастных групп с тяжелой формой гемофилии А с НТИ, которые начинали получать лечение с помощью rFVIIIFc с целью ITI в качестве либо первичной, либо резервной терапии,

независимо от ответа.

[00407] После одобрения со стороны ведомственного органа собирали обезличенную клиническую информацию с помощью электронного опроса. Пациентов, которые впервые получали лечение с целью достижения ITI, считали подверженными высокому риску неудачного исхода ITI в соответствии с перечисленными ранее критериями. Отрицательный титр Бетезда определяли как  $\leq 0,6$  BU. Приобретение толерантности определяли как отрицательный титр Бетезда и нормальное восстановление показателей FVIII ( $\geq 66\%$ ) и период полужизни ( $\geq 6$  часов). Основная цель данного исследования заключалась в сообщении клинических характеристик и результатов ITI с применением rFVIIIIFc. Результаты подытоживали с помощью описательной статистики; дедуктивный статистический анализ не проводили.

[00408] Результаты

*Исследуемая популяция*

[00409] Было идентифицировано девятнадцать пациентов. Семь из них впервые получали ITI-терапию, а 12 проходили резервную ITI-терапию (таблицы 1 и 2). Медианный возраст на момент начала ITI-терапии с помощью rFVIIIIFc составлял 1,3 года (диапазон: 0,8-4,3 года) в случае пациентов, впервые получавших ITI-терапию, и 6,4 года (диапазон: 1,6-12,6 года) в случае пациентов, получавших резервную ITI-терапию.

[00410] Пациенты, впервые получавшие ITI-терапию, имели медианный максимальный титр ингибиторов в анамнезе (до получения ITI-терапии), составляющий 151 BU (диапазон: 11-1126 BU); медианный титр ингибиторов на момент начала ITI-терапии с помощью rFVIIIIFc составлял 52 BU (диапазон: 3-1126 BU). На момент начала ITI-терапии шесть из семи пациентов, впервые получавших ITI-терапию, имели титры  $> 10$  BU; четыре из этих шести имели титры  $> 50$  BU. Медианное время от постановки диагноза наличия ингибиторов до начала ITI-терапии с помощью rFVIIIIFc составляло 4,4 недели (диапазон: 0-41 неделя).

[00411] В случае пациентов, получавших резервную ITI-терапию, среднее количество предшествующих курсов ITI-терапии с помощью других продуктов FVIII составляло 2,6 (диапазон: 1-5), а

медианное время от постановки диагноза наличия ингибиторов до начала ИТИ-терапии с помощью rFVIIIIFc составляло 5,5 года (диапазон: 0,8–12 лет). Генотипы FVIII для 18 из 19 пациентов приведены в таблицах 1 и 2.

*Результаты у пациентов, впервые получавших ИТИ-терапию*

[00412] На момент сбора данных четыре из семи пациентов, впервые проходивших ИТИ-терапию (таблица 1), приобрели толерантность, и их переводили на профилактическое лечение с помощью rFVIIIIFc. Трое из этих четырех пациентов достигали отрицательного титра Бетезда, а также нормального восстановления показателей и периода полужизни FVIII; таким образом, они соответствовали стандартному определению приобретения толерантности через 5, 7 и 9 месяцев. Четвертого пациента лечащий врач считал имеющим приобретенную толерантность через 14,8 месяцев на основании отрицательного титра ингибитора, и его переводили на профилактическое лечение; на момент сбора данных этот пациент провел 13 месяцев после завершения ИТИ-терапии с помощью rFVIIIIFc, и у него продолжал оставаться отрицательный титр ингибитор при профилактическом лечении с помощью rFVIIIIFc. В тот же момент времени также сообщали о нормальном периоде полужизни.

**Таблица 1.** Пациенты, впервые получавшие ИТИ-терапию

Пациент	Генотип	Максимальный титр ингибиторов в анамнезе (BU/мл)	Титр ингибиторов до получения ИТИ-терапии с помощью rFVIIIIFc (BU/мл)	Время от положительного титра Бетезда до начала ИТИ-терапии (недели)	Схема ИТИ-терапии с помощью rFVIIIIFc	Текущий титр (BU/мл)	Время до отрицательного титра Бетезда (недели)	Время приобретения толерантности (недели)	Текущий статус
1	миссенс	51,7	51,7	10,9	85 МЕ/кг Г ежедневн о	< 0,6	4	21	Профилактическое лечение с помощью rFVIIIIFc

2	Сдвиг рамок и считывания	150,9	106,9	13,0	100 МЕ/кг Г ежед невн о	< 0,6	24	29	Профилактическое лечение с помощью rFVIIIIFc
3	NR	1126	1126	1,1	200 МЕ/кг Г ежед невн о	< 0,6	31	38	Профилактическое лечение с помощью rFVIIIIFc
4	I-22	11	11	4,4	50 МЕ/кг Г 3 раза /нед .	< 0,6	64	64	Профилактическое лечение с помощью rFVIIIIFc
5	I-22	388	32	41,0	102 МЕ/кг Г EOD	18	NA	N/A	ITI-терапия с помощью rFVIIIIFc
6	I-22	378,7	378,1	1,0	96 МЕ/кг Г ежед невн о	23	NA	N/A	ITI-терапия с помощью rFVIIIIFc
7 <sup>a</sup>	I-22	30	3	0,0	83 МЕ/кг Г ежед невн о	16	NA	N/A	ITI-терапия с помощью rFVIIIIFc

BU – единицы Бетезда; EOD – один раз в два дня; I-22 – инверсия в интроне 22; ITI – индуцирование иммунологической толерантности; NR – не сообщалось; N/A – не применимо; rFVIIIIFc – слитый белок на основе рекомбинантного фактора VIII и Fc. Время приобретения толерантности, основанное на отчетах врача, разрешенного титра Бетезда, нормального восстановления показателей и периода полужизни. Для пациента 4 не было доступной информации о восстановлении показателей и периоде полужизни, но врач регистрировал его в качестве имеющего приобретенную толерантность и переводил на профилактическое лечение с помощью rFVIIIIFc. <sup>a</sup>Получал ритуксимаб.

[00413] Среди четырех пациентов медианное время до достижения отрицательного титра Бетезда составляло 27,7 недели (диапазон: 4,1–64 недели). Схема ITI-терапии для трех из четырех пациентов с приобретенной толерантностью состояла в ежедневном введении rFVIIIIFc (85–200 МЕ/кг) по сравнению с введением доз три раза в неделю (50 МЕ/кг) у четвертого пациента (таблица 1). Медианное время до сообщенной приобретенной толерантности составляло 33,9 недели (7,8 месяца; диапазон: 21–64 недель) у всех четырех пациентов. У трех пациентов, получавших лечение с ежедневным введением rFVIIIIFc (85–200 МЕ/кг), приобретение толерантности занимало 29 недель (6,7 месяца; диапазон: 20,6–38 недель), однако четвертый пациент, получавший лечение с введением 50 МЕ/кг три раза в неделю, приобретал толерантность через 64 недели (14,8 месяца).

[00414] Из остальных пациентов (n=3) двое характеризовались снижением титра Бетезда (с 32 до 18 BU и с 378 до 23 BU соответственно через 18 и 58 недель после получения ITI-терапии). На момент создания данного обзора один пациент характеризовался увеличением титра Бетезда (с 3 до 16 BU через 15 недель после получения ITI-терапии); этот пациент характеризовался нерегулярным ITI и имел прерывания приема rFVIIIIFc и плохое соблюдение согласно отчету лечащего врача (таблица 1). Все семь пациентов, впервые получавших ITI-терапию, продолжали ITI-терапию или профилактическое лечение с помощью rFVIIIIFc.

*Результаты у пациентов, получавших резервную ITI-терапию*

[00415] Семь из 12 пациентов, проходивших резервную ITI-терапию (таблица 2), первоначально достигали отрицательного титра Бетезда при ITI-терапии с помощью rFVIIIIFc. Медианное время до достижения отрицательного титра составляло 14,1 недели (диапазон: 3–67,6 недели). У троих из этих семи пациентов сохранялся отрицательный титр Бетезда, и они продолжали получать ITI-терапию с помощью rFVIIIIFc или их переводили на профилактическое лечение с помощью rFVIIIIFc. У остальных четырех пациентов, которые первоначально достигали отрицательного титра, впоследствии наблюдался титр > 0,6 BU. Из них двое продолжали

получать ITI-терапию с помощью rFVIIIFc, а двоих переводили на ITI-терапию с помощью других факторов (таблица 2).

**Таблица 2.** Пациенты, получавшие резервную ITI-терапию

Пациент	Гено тип	Количество предшествующих курсов ITI-лечения	Максимальный титр ингибиторов в анамнезе (BU/мл)	Титр ингибиторов до ITI-терапии с помощью rFVIIIFc (BU/мл)	Схема ITI-терапии с помощью rFVIIIFc	Текущий титр (BU/мл)	Время до отрицательного титра Бетезда <sup>b</sup> (недели)	Текущий статус
8	I-22	5	250	9	202 ME/кг ежедневно	< 0,6	28	Перевод с ITI-терапии с помощью rFVIIIFc
9	I-22	2	67	4	150 ME/кг ежедневно	< 0,6	3	Другая ITI-терапия
10	Большая делеция	2	70	35	200 ME/кг EOD	< 0,6	31	ITI-терапия с помощью rFVIIIFc
11	I-22	1	178	1	100 ME/кг 3 раза/нед.	< 0,6	14	ITI-терапия с помощью rFVIIIFc
12 <sup>a</sup>	I-22	2	460	200	150 ME/кг ежедневно	2	13	Другая ITI-терапия
13	I-22	3	41,8	22	130 ME/кг	16	68	ITI-терапия

					ежедн евно			с помощью rFVIIIF с
14 <sup>a</sup>	Нонс енс	2	306	129	100 МЕ/кг ежедн евно	23	13	ИТИ- терапия с помощью rFVIIIF с
15	I-22	1	35	36	200 МЕ/кг EOD	22	NA	ИТИ- терапия с помощью rFVIIIF с
16	I-22	3	11	1	100 МЕ/кг EOD	0,9	NA	ИТИ- терапия с помощью rFVIIIF с
17	I-22	2	8	0,6	115 МЕ/кг EOD	1,2	NA	ИТИ- терапия с помощью rFVIIIF с
18	Большая деле ция	4	1024	237	100 МЕ/кг ежедн евно	1024	NA	ИТИ- терапия с помощью rFVIIIF с
19	Нонс енс	4	409	26	100 МЕ/кг ежедн евно	166	NA	Терапия средств ом шунтиру ющего действи я

BU - единицы Бетезда; EOD - один раз в два дня; I-22 -

инверсия в интроне 22; ITI – индуцирование иммунологической толерантности; rFVIIIIFc – слитый белок на основе рекомбинантного фактора VIII и Fc; нед. – неделя. <sup>a</sup>Получал ритуксимаб; <sup>b</sup>время до отрицательного титра Бетезда представляет собой время от начала ITI-терапии с помощью rFVIIIIFc до первого сообщения об отрицательном титре; текущий титр > 0,6 BU/мл может представлять собой рецидив.

[00416] Из семи пациентов, достигших отрицательного титра Бетезда, трое также достигали нормального восстановления показателей FVIII через 3, 14 и 65 недель, а четвертый пациент достигал нормального периода полужизни FVIII через 27 недель. У остальных данные по восстановлению показателей и периоду полужизни не были доступны (таблица 2). Из оставшихся пяти пациентов один характеризовался снижением титра Бетезда (с 36 до 22 BU через 10 недель), а четверо характеризовались титром Бетезда, который либо оставался неизменным, либо увеличивался в ходе получения ITI-терапии (таблица 2). Из этих пяти пациентов четверо продолжали получать ITI-терапию с помощью rFVIIIIFc, а у одного отменяли ITI-терапию и переводили только на терапию средством шунтирующего действия.

*Результаты введения доз, применение средства шунтирующего действия и текущий статус лечения*

[00417] Популяция пациентов, оцениваемая в данном исследовании, получала дозы в широких пределах диапазона/продолжительности (таблицы 1 и 2). При более высоких дозах, вводимых ежедневно, наблюдали тенденцию к быстрому достижению отрицательных титров ингибиторов. Пять из пяти пациентов (один, впервые получавший ITI-терапию, и четыре, получавшие резервную ITI-терапию), которые получали ежедневную дозу rFVIIIIFc  $\geq 130$  МЕ/кг, достигали отрицательного титра Бетезда с медианой, равной 28 недель. Восемнадцать из 19 пациентов применяли средства шунтирующего действия одновременно с ITI-терапией с помощью rFVIIIIFc; четырнадцать были изначально на профилактическом лечении (9 с применением aPCC и 5 с применением rFVIIa), и четыре получали лечение по необходимости с помощью rFVIIa.

[00418] На момент сбора данных всего 16 из 19 пациентов оставались на rFVIIIFc (профилактическое лечение или ITI-терапия) (таблицы 1 и 2).

#### *Безопасность*

[00419] Ни о каких нежелательных явлениях, в том числе тромбозах, не сообщали. Проводили шесть хирургических вмешательств, все без прерывания ITI-терапии с помощью rFVIIIFc (синовэктомия коленного сустава, внутричерепное нейрохирургическое удаление и четыре замены катетера Port-A-Cath). У всех использовали терапию средством шунтирующего действия. В данном исследовании сбор данных по титрам ингибиторов в ходе хирургических вмешательств не проводили.

#### [00420] Выводы

[00421] В совокупности эти результаты демонстрировали, что ITI с помощью rFVIIIFc является возможным и может приводить к устранению ингибиторов и успешному ITI у многих (с высоким риском неудачного исхода ITI) пациентов, впервые проходивших ITI-терапию, и у некоторых пациентов, проходивших резервную ITI-терапию. Кроме того, ITI-терапия с помощью rFVIIIFc демонстрировала быстрое снижение титров Бетезда и короткое время приобретения толерантности у большинства пациентов, впервые получавших ITI-терапию, несмотря на их профиль риска. В случае резервной ITI-терапии труднее делать выводы, поскольку на момент сбора данных большинство этих пациентов все еще проходили ITI-терапию с помощью rFVIIIFc. Тем не менее, некоторые пациенты, получавшие резервное лечение, судя по всему, получали терапевтическую пользу в том, что они либо достигали отрицательного титра Бетезда, либо характеризовались значительным снижением титров ингибиторов. Это было особенно характерно в случае, когда более высокие дозы rFVIIIFc ( $\geq 130$  МЕ/кг) вводили ежедневно.

#### **ПРИМЕР 5**

[00422] Основным осложнением заместительной терапии фактором при гемофилии А является появление ингибиторов (нейтрализующих антител к фактору VIII) у ~30% пациентов с тяжелой формой гемофилии А. Выработка ингибиторов влияет на

эффективность лечения, а также на качество жизни индивидуумов, подвергшихся негативному воздействию. Для дополнительного понимания того, как иммунная система отвечает на рекомбинантный фактор III (rFVIII), продолжают предприниматься усилия по исследованию гемофилии с целью эффективного устранения ингибиторов. Слитый белок на основе rFVIII и Fc (rFVIIIIFc) с увеличенным периодом полужизни является эффективным и хорошо переносимым средством терапии для предупреждения и контроля эпизодов кровотечения. Fc-область данной молекулы не только ответственна за увеличение периода полужизни rFVIII, но и может стимулировать антигенспецифическую толерантность, как показано в доклиническом исследовании на модельном животном (Krishnamoorthy S, et al., *Cell Immunol.* 301:30–39 (2016)) и как свидетельствуют клинические случаи индуцирования иммунологической толерантности (Groomes CL, et al., *Pediatr Blood Cancer* 63(5):922–24 (2016); Malec LM, et al., *Haemophilia* 22(6):e552–e554 (2016); Ragni MV, et al., *Haemophilia* 22(5):e462–e464 (2016)).

[00423] Способы

[00424] APC или моноциты TNP-1 человека из периферической крови применяли для исследования эффектов rFVIIIIFc в отношении связывания FcγR, его интернализации, опосредованной им передачи сигнала и выработки цитокинов и изменений экспрессии генов, а также последующих взаимодействий с Т-клетками и эффектов в их отношении *in vitro* (фиг. 1).

[00425] Результаты

[00426] Сниженная экспрессия FcγR на клеточной поверхности свидетельствовала об интернализации при обработке с помощью rFVIIIIFc (фиг. 2A–2C). Моноцитарные макрофаги и дендритные клетки обрабатывали иммунными комплексами с пероксидазой хрена (HRP-IC) в качестве положительного контроля, иммуноглобулином G1 человека (IgG1) в качестве отрицательного контроля и рекомбинантным фактором VIII (rFVIII) или слитым белком rFVIII-Fc (rFVIIIIFc) в эквимоллярных концентрациях (200 нМ) в течение 24 часов. Экспрессию Fcγ-рецепторов (FcγR) CD16 (фиг. 2A), CD32 (фиг. 2B) и CD64 (фиг. 2C) на клеточной поверхности измеряли с помощью проточной цитометрии (n=3; \*\*P ≤ 0,01, \*\*\*P ≤ 0,005,

значимость для HRP-IC относительно других средств обработки не показана). Обработка с помощью rFVIIIFc коррелировала со сниженной экспрессией CD16 (фиг. 2А), CD32 (фиг. 2В) и CD64 (фиг. 2С) на клеточной поверхности по сравнению с поверхностной экспрессией после обработки с помощью rFVIII.

[00427] rFVIIIFc вовлекал FcγR и индуцировал передачу сигналов у моноцитов и макрофагов без последующей выработки провоспалительных цитокинов (фиг. 3А-3С). Клеточную линию моноцитов THP-1, моноциты, моноцитарные макрофаги из периферической крови и моноцитарные дендритные клетки из периферической крови обрабатывали с помощью HRP-IC, IgG1, rFVIII или rFVIIIFc в течение 15 минут (фиг. 3А). Фосфорилирование Syk измеряли в клеточных лизатах с применением платформы MSD (n=3-7, \*P ≤ 0,05). Фосфорилирование Syk измеряли после обработки макрофагов с помощью rFVIIIFc (WT), мутантного rFVIIIFc, который не способен связываться с неонатальным Fc-рецептором (FcRn-мутант), или мутантного rFVIIIFc, который не способен связываться с FcγR (FcγR-мутант) (n=4, \*P ≤ 0,05) (фиг. 3В). Выработку провоспалительных цитокинов макрофагами, которых подвергали двадцатичетырехчасовой обработке, измеряли с помощью ELISA на платформе MSD (n=4, значимость не указана) (фиг. 3С).

[00428] rFVIIIFc обеспечивал фосфорилирование молекул, принимающих участие в иммунорегуляции, а не молекул, играющих роль в активации и выработке провоспалительных цитокинов (таблица 3 и фиг. 4). Поиск фосфорилированных белков в лизатах моноцитарных макрофагов, обработанных с помощью rFVIIIFc в течение пятнадцати минут, осуществляли с применением наборов с фосфокиназами и фосфоиммунорецепторами Proteome Profiler. Перечень фосфорилированных молекул у обработанных с помощью rFVIIIFc макрофагов, идентифицированных с помощью анализов посредством Proteome Profiler, показан в таблице 3. Фосфорилирование фосфатаз, ответственных за передачу ингибиторных сигналов, измеряли с применением платформы MSD (n=3; \*\*P ≤ 0,01, \*\*\*P ≤ 0,005) (фиг. 4).

**Таблица 3.** Фосфорилированные молекулы у обработанных с помощью rFVIIIFc макрофагов, идентифицированные с помощью

анализов посредством Proteome Profiler.

Фосфорилированные белки						
Иммунорецепторы	ILT6/CD85e	NKp46/ NCR1	FcH5/IRTA2	Киназы	SRC	STAT5
	KIR2DL4	Siglec9	Siglec2/CD22		CREB	cJun
	SLAMF8	SLAMF4	CDCIR/CLEC4 $\alpha$		pRAS40	p53
	Fc $\gamma$ RIIIA/B	Fc $\gamma$ RIIA	ДЕКТИН- 1/CLEC7 $\alpha$		ERK1/2	WNK1
	PECAM/CD31	FcRH4/ IRTA1	KNKp44/NCR2		HSP27	p70S6
	CLEC-2	SHP2	Siglec7		JNK1/2/3	FAK
	TREM2	ILT2/ CD85j	SLAMF5		AMPK $\alpha$ 2	GSK-3 $\alpha/\beta$
	SHP1	ILT3/ CD85k	Siglec3/CD33		STAT2	RSK1/2/3
	TREML1/ TLT-1	ILT4/ CD85d	Siglec5		STAT6	p53

[00429] rFVIIIFc индуцировал паттерн экспрессии генов, характерный для толерогенных макрофагов (фиг. 5A–5G). Проводили исследовательское секвенирование РНК с применением моноцитарных макрофагов, обработанных с помощью IgG1, rFVIII или rFVIIIFc в течение шести часов ( $n = 3$ ), в отношении генов, экспрессия которых была значительно снижена (фиг. 5A), и в отношении генов, экспрессия которых была значительно повышена (фиг. 5B), и проводили анализ путей в отношении генов, экспрессия которых была повышена с помощью rFVIIIFc, с целью исследования молекулярных путей, избирательно представленных в этих клетках по сравнению с клетками, обработанными с помощью rFVIII (таблица 4). Было обнаружено, что экспрессия различных генов путей с участием NRF2 и PPAR-гамма была повышена, а также различных других иммунорегуляторов (фиг. 5H). Избранные гены путей с участием NRF2 и путей метаболизма липидов проверяли с помощью Q-PCR ( $n=8$ ;  $*P \leq 0,05$ ,  $**P \leq 0,01$ ,  $***P \leq 0,005$ ) (фиг. 5C–5G). Кроме того, было обнаружено, что rFVIIIFc-обученные макрофаги проявляют характерный M2-подобный фенотип (фиг. 5I–5M). В

частности, макрофаги, обработанные с помощью rFVIIIIFc, характеризовались более высокой относительной экспрессией CD206, чем клетки, обработанные с помощью rFVIII, через 6 часов (фиг. 5I) и через 24 часа (фиг. 5J), и макрофаги, обработанные с помощью rFVIIIIFc, характеризовались более высокой относительной экспрессией ARG1, чем клетки, обработанные с помощью rFVIII, через 24 часа (фиг. 5M).

**Таблица 4.** Результаты проведенного анализа путей в отношении генов, экспрессия которых была повышена с помощью rFVIIIIFc, с целью исследования молекулярных путей, избирательно представленных в этих клетках по сравнению с клетками, обработанными с помощью rFVIII.

Название пути	Заданный размер	Содержавшиеся кандидаты	P-значение	q-значение
Путь с участием NRF2	142	10 (7,0%)	4,07e-06	0,000273
Метаболизм липопротеинов	68	7 (10,3%)	1,01e-05	0,000338
Расщепление, мобилизация и транспорт липидов	110	8 (7,3%)	3,06e-05	0,000684
Метаболизм цистеина и метионина – Homo sapiens (человек)	45	5 (11,1%)	0,000137	0,00229
Сеть транскрипционных факторов C-MYB	86	6 (7,0%)	0,000389	0,00521
Мета-путь с участием ядерных рецепторов	316	11 (3,5%)	0,000813	0,00908

[00430] Обработанные с помощью rFVIIIIFc антигенпрезентирующие клетки влияли на дифференцировку регуляторных Т-клеток, для которой необходимо клеточное взаимодействие между APC-Т-клеткой (фиг. 6А-6С). Моноцитарные макрофаги из периферической крови обрабатывали с помощью IgG1, rFVIII или rFVIIIIFc, затем подвергали совместному культивированию с необученными CD4-положительными Т-клетками, выделенными из периферической крови от того же донора. Спустя шесть дней совместного культивирования (фиг. 6А) процентную долю регуляторных Т-клеток (CD4+ CD25+ FoxP3+) количественно оценивали с помощью проточной цитометрии (n=4) (фиг. 6В). Также количественно оценивали процентную долю регуляторных Т-клеток при культивировании необученных Т-клеток в средах, кондиционированных APC, предварительно обработанными с помощью IgG1, rFVIII или rFVIIIIFc (n=4) (фиг. 6С).

[00431] Вывод

[00432] rFVIIIFc, по-видимому, связывал Fcγ-рецепторы на APC и индуцировал их интернализацию и опосредованную ими передачу сигналов. Эта передача сигналов не переходила в выработку провоспалительных цитокинов и не активировала APC (данные не показаны). После обработки с помощью rFVIIIFc инициировались иммуномодулирующие события передачи сигналов. Эти события, по-видимому, направляют дифференцировку макрофагов в сторону M2-подобного фенотипа, характеризующегося повышенной экспрессией генов путей с участием NRF2 и PPARγ (фиг. 5H), а также повышенной экспрессией молекул CD206 и аргиназы 1. Повышенную экспрессию также демонстрировали и различные другие иммунорегуляторы, в то время как по меньшей мере растворимая бета-субъединица гуанилатциклазы 1 (2GUCY1B2), протопорфириногеноксидаза (PPOX) и супрессор передачи сигналов цитокина 3 (SOCS3) характеризовались сниженной экспрессией в клетках, обработанных с помощью rFVIIIFc (фиг. 5H). Эти макрофаги могут оказывать полезные иммунологические эффекты, о которых сообщалось ранее, такие как дифференцировка регуляторных T-клеток, приобретение толерантности к FVIII и снижение уровня ингибирующих антител к FVIII (фиг. 7).

#### **ПРИМЕР 6**

[00433] Ранние данные доклинических и клинических исследований свидетельствуют о том, что rFVIIIFc может обеспечивать достижение отрицательного титра ингибиторов в течение относительно короткого периода времени при его применении в лечении с целью ITI, возможно, из-за иммуномодулирующих эффектов, присущих Fc-домену в составе молекулы. Для получения более надежных клинических данных разрабатывали стандартизированный протокол. В нем представлена схема исследования.

[00434] Проспективное интервенционное многоцентровое открытое исследование ReITrate (NCT03103542) было направлено на вовлечение 20 пациентов всех возрастных групп с тяжелой формой HA, у которых выработался ингибитор и отсутствовал ответ при предыдущих попытках ITI. Основная цель исследования заключалась

в описании результатов ITI, реализованного с помощью rFVIIIIFc, в течение периода времени 60 недель. Основной конечной точкой был успех ITI; а вторичные конечные точки, оцениваемые во время лечения с целью ITI, включали время до достижения успеха ITI, возникновение рецидива, количество эпизодов кровотечения, потребление rFVIIIIFc, количество дней, пропущенных в учебном заведении или на работе, количество дней госпитализации и соблюдение схемы лечения. Лечение с целью ITI включало введение rFVIIIIFc в дозе 200 МЕ/кг/день (один раз в день или разделенной на две дозы в день) в течение не более 60 недель. После достижения толерантности следовал период снижения дозы в течение 16 недель и период последующего наблюдения в течение 32 недель с введением rFVIIIIFc в профилактических целях. Критерии успеха включали отрицательный титр ингибиторов ( $< 0,6$  единицы Бетезда), постепенное восстановление показателей  $> 66\%$  от ожидаемого значения и конечный период полужизни  $\geq 7$  часов.

[00435] На фиг. 8 показаны предполагаемые эффекты rFIXFc в отношении макрофагов. rFVIIIIFc, по-видимому, связывал Fc $\gamma$ -рецепторы на APC и индуцировал их интернализацию и опосредованную ими передачу сигналов. Эта передача сигналов не переходила в выработку провоспалительных цитокинов и не активировала APC. Скорее, после обработки с помощью rFVIIIIFc инициировались иммуномодулирующие события передачи сигналов. Эти события, по-видимому, направляют дифференцировку макрофагов в сторону `Мох/М2-подобного` фенотипа, характеризующегося повышенной экспрессией генов путей с участием NRF2 и PPAR $\gamma$ .

[00436] Предшествующее описание конкретных вариантов осуществления настолько полно раскрывает общий характер настоящего изобретения, что другие могут, используя знания в пределах квалификации в данной области техники, легко модифицировать и/или адаптировать такие конкретные варианты осуществления для различных путей применения без излишнего экспериментирования, не отступая от общей концепции настоящего изобретения. Следовательно, такие адаптации и модификации предназначены для того, чтобы находиться в пределах значения и диапазона эквивалентов раскрытых вариантов осуществления,

основанных на идее и принципе, представленных в данном документе. Следует понимать, что формулировки или терминология в данном документе предназначены для целей описания, а не ограничения, вследствие этого терминологию или формулировки в настоящем описании квалифицированному специалисту следует интерпретировать в свете данных идей и принципов.

[00437] Другие варианты осуществления настоящего изобретения будут очевидны специалистам в данной области при рассмотрении описания и практическом применении настоящего изобретения, описанного в данном документе. Предполагается, что описание и примеры должны рассматриваться только как иллюстративные, а действительный охват изобретения и его идея изложены в нижеследующей формуле изобретения.

[00438] Все публикации, патенты и патентные заявки, раскрытые в данном документе, включены посредством ссылки в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка были конкретно и отдельно указаны как включенные посредством ссылки.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Применение химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, в способе индуцирования иммунологической толерантности у человека с гемофилией, где

(1) эффективное количество химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, вводится человеку в течение периода, достаточного для индуцирования иммунологической толерантности, где эффективное количество химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, обеспечивает индуцирование иммунологической толерантности у человека; и

(2) после индуцирования иммунологической толерантности человеку вводится химерный белок, содержащий фактор свертывания крови и Fc-область, по схеме со снижением дозы.

2. Применение по п. 1, где эффективное количество химерного белка, содержащего FVIII и Fc-область, составляет от приблизительно 50 МЕ/кг до приблизительно 300 МЕ/кг.

3. Применение химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, в способе индуцирования иммунологической толерантности у человека с гемофилией, где приблизительно 200 МЕ/кг химерного белка вводится человеку в течение периода, достаточного для индуцирования иммунологической толерантности, и где у человека выработался ингибитор фактора свертывания крови и имело место отсутствие ответа на один или несколько предшествующих курсов терапии для формирования иммунологической толерантности к фактору свертывания крови.

4. Применение по п. 3, где после индуцирования иммунологической толерантности человеку вводится химерный белок, содержащий фактор свертывания крови и Fc-область, по схеме со снижением дозы.

5. Применение по любому из пп. 1-4, где химерный белок, содержащий фактор свертывания крови и Fc-область, содержит фактор VIII-Fc (FVIII-Fc) или фактор IX-Fc (FIXFc).

6. Применение по любому из пп. 1-5, где химерный белок, содержащий фактор свертывания крови и Fc-область, вводится до тех пор, пока не будет наблюдаться иммунологическая толерантность, где иммунологическая толерантность наблюдается,

если титр ингибирующих антител у человека составляет менее приблизительно 0,6 ВU.

7. Применение по любому из п. 1, п. 2 и пп. 4–6, где схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, составляющей от приблизительно 50 МЕ/кг до приблизительно 100 МЕ/кг.

8. Применение по любому из п. 1, п. 2 и пп. 4–7, где снижающаяся доза вводится один раз в день, один раз в два дня или три раза в неделю.

9. Применение по любому из п. 1, п. 2 и пп. 4–8, где снижающаяся доза вводится в течение по меньшей мере приблизительно 1 недели, по меньшей мере приблизительно 2 недель, по меньшей мере приблизительно 3 недель, по меньшей мере приблизительно 4 недель, по меньшей мере приблизительно 5 недель, по меньшей мере приблизительно 6 недель, по меньшей мере приблизительно 7 недель, по меньшей мере приблизительно 8 недель, по меньшей мере приблизительно 9 недель, по меньшей мере приблизительно 10 недель, по меньшей мере приблизительно 11 недель, по меньшей мере приблизительно 12 недель, по меньшей мере приблизительно 13 недель, по меньшей мере приблизительно 14 недель, по меньшей мере приблизительно 15 недель, по меньшей мере приблизительно 16 недель, по меньшей мере приблизительно 17 недель, по меньшей мере приблизительно 18 недель, по меньшей мере приблизительно 19 недель, по меньшей мере приблизительно 20 недель, по меньшей мере приблизительно 21 недели, по меньшей мере приблизительно 22 недель, по меньшей мере приблизительно 23 недель, по меньшей мере приблизительно 24 недель, по меньшей мере приблизительно 25 недель, по меньшей мере приблизительно 26 недель, по меньшей мере приблизительно 27 недель, по меньшей мере приблизительно 28 недель, по меньшей мере приблизительно 29 недель, по меньшей мере приблизительно 30 недель, по меньшей мере приблизительно 31 недели или по меньшей мере приблизительно 32 недель.

10. Применение по любому из п. 1, п. 2 и пп. 4–9, где схема со снижением дозы предусматривает введение снижающейся дозы

химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, составляющей приблизительно 50 МЕ/кг, один раз в день от недели 1 до недели 6 после индуцирования иммунологической толерантности, или введение снижающейся дозы химерного белка, составляющей приблизительно 100 МЕ/кг, один раз в день от недели 1 до недели 6 после индуцирования иммунологической толерантности.

11. Применение по п. 10, где схема со снижением дозы дополнительно предусматривает введение снижающейся дозы химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, составляющей приблизительно 50 МЕ/кг или приблизительно 100 МЕ/кг, один раз в два дня от недели 6 до недели 12 после индуцирования иммунологической толерантности, и/или введение снижающейся дозы химерного белка, составляющей приблизительно 50 МЕ/кг или приблизительно 100 МЕ/кг, один раз в два дня от недели 12 до недели 16.

12. Применение по любому из п. 1, п. 2 и пп. 4-11, дополнительно предусматривающее введение профилактической дозы химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, после схемы со снижением дозы.

13. Применение по любому из пп. 1-12, где время индуцирования толерантности составляет менее приблизительно 24 недель, менее приблизительно 23 недель, менее приблизительно 22 недель, менее приблизительно 21 недели, менее приблизительно 20 недель, менее приблизительно 19 недель, менее приблизительно 18 недель, менее приблизительно 17 недель, менее приблизительно 16 недель, менее приблизительно 15 недель, менее приблизительно 14 недель, менее приблизительно 13 недель, менее приблизительно 12 недель, менее приблизительно 11 недель, менее приблизительно 10 недель, менее приблизительно 9 недель, менее приблизительно 8 недель, менее приблизительно 7 недель, менее приблизительно 6 недель, менее приблизительно 5 недель, менее приблизительно 4 недели, менее приблизительно 3 недели, менее приблизительно 2 недели или менее приблизительно 1 недели.

14. Применение по любому из пп. 5-13, где FVIII включает FVIII с делецией домена В.

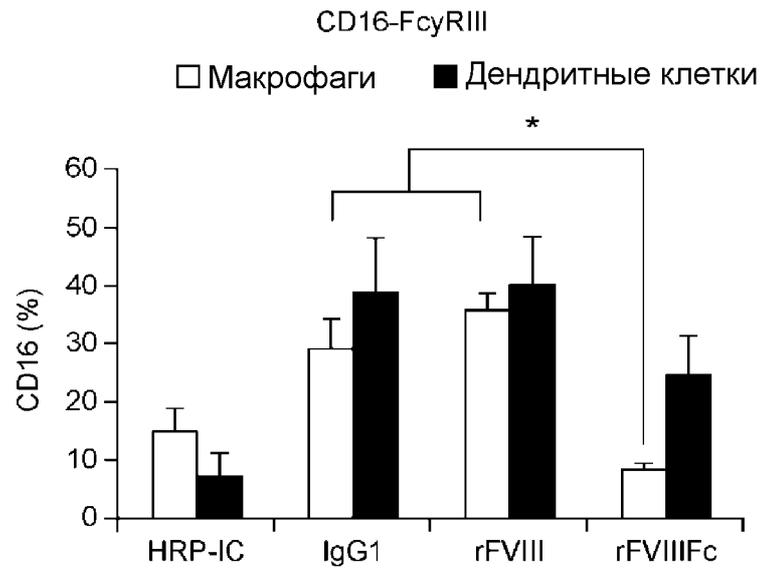
15. Применение по любому из пп. 1-14, где введение химерного белка, содержащего фактор свертывания крови и Fc-область, приводит к сокращению времени индуцирования толерантности у человека по сравнению со временем индуцирования толерантности у человека после лечения с помощью фактора свертывания крови в отдельности.

По доверенности

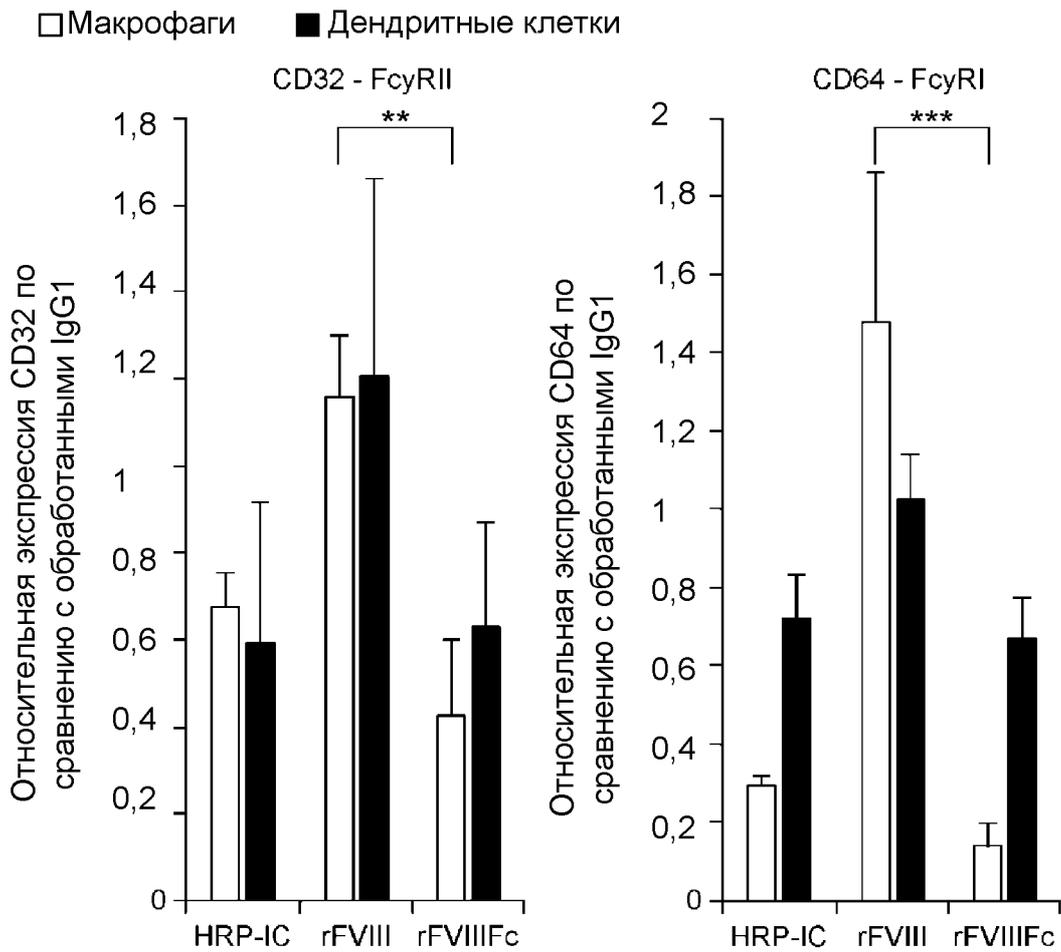
1/15



ФИГ. 1

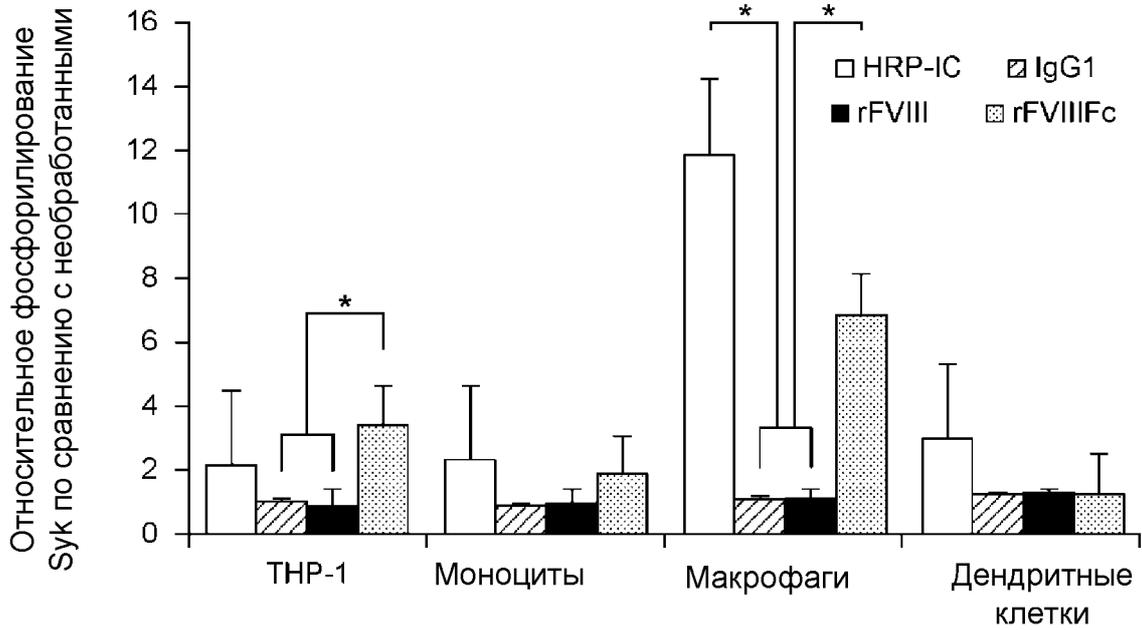


ФИГ. 2А

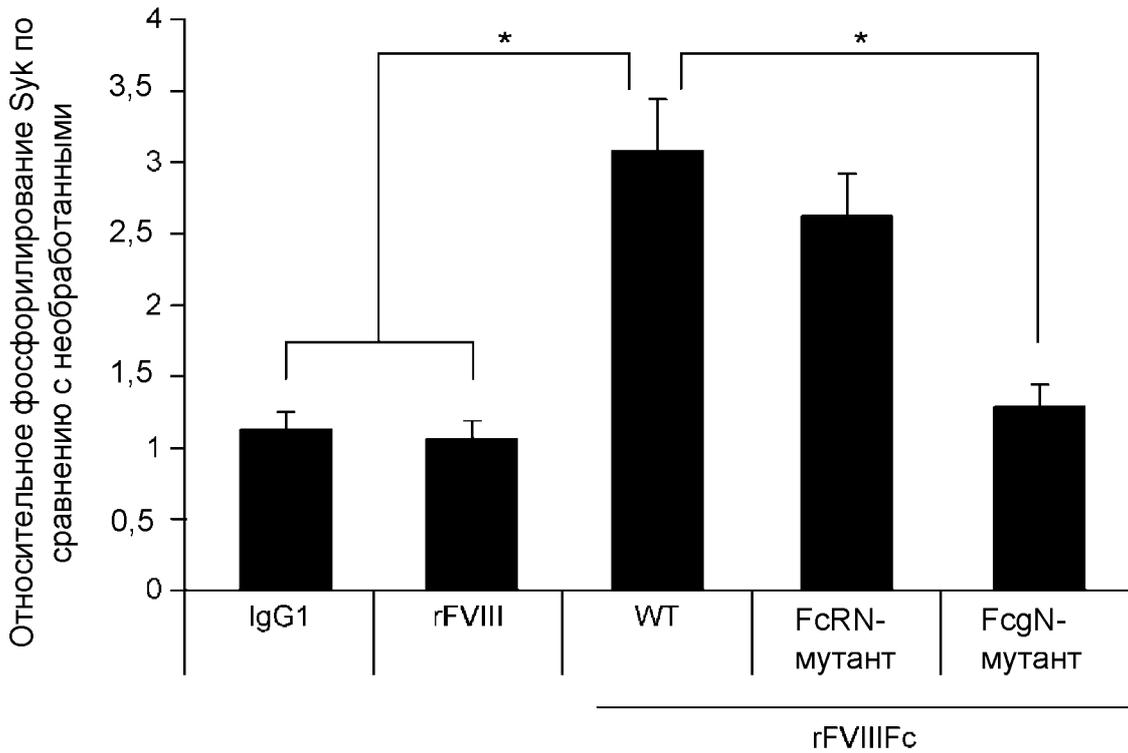


ФИГ. 2В

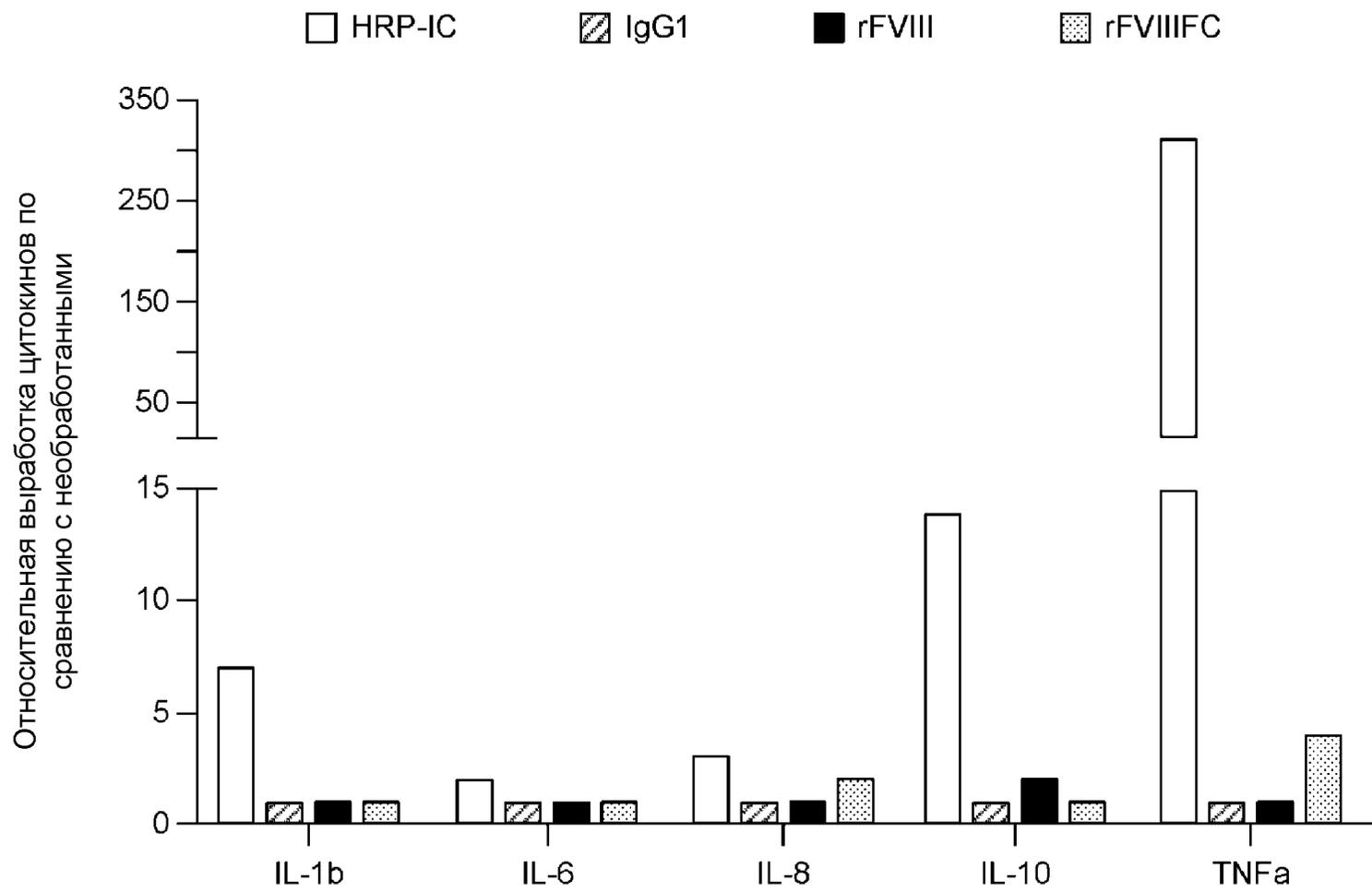
ФИГ. 2С



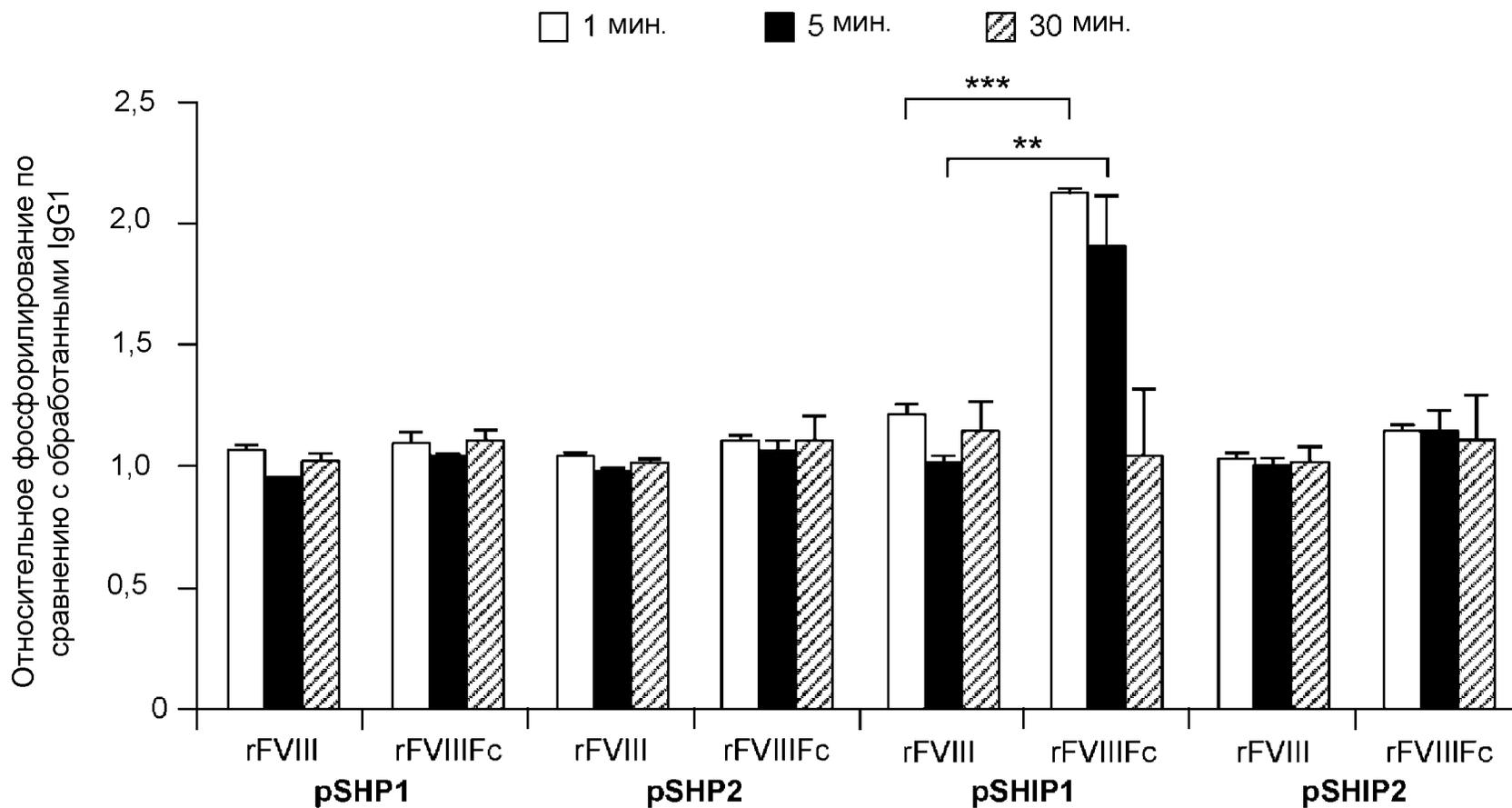
ФИГ. 3А



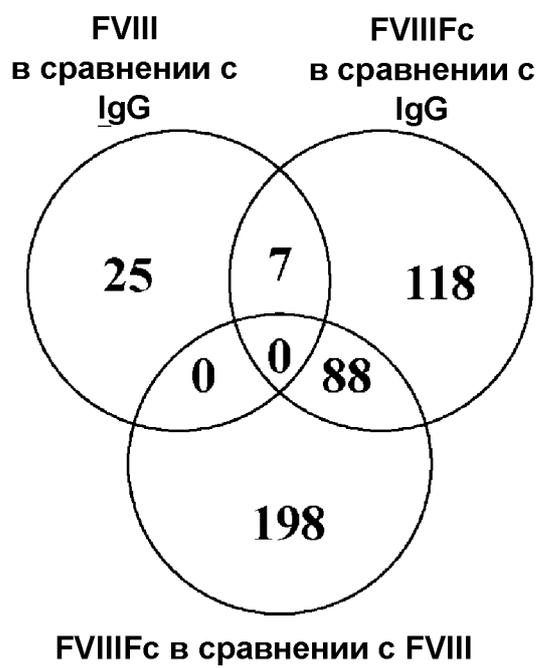
ФИГ. 3В



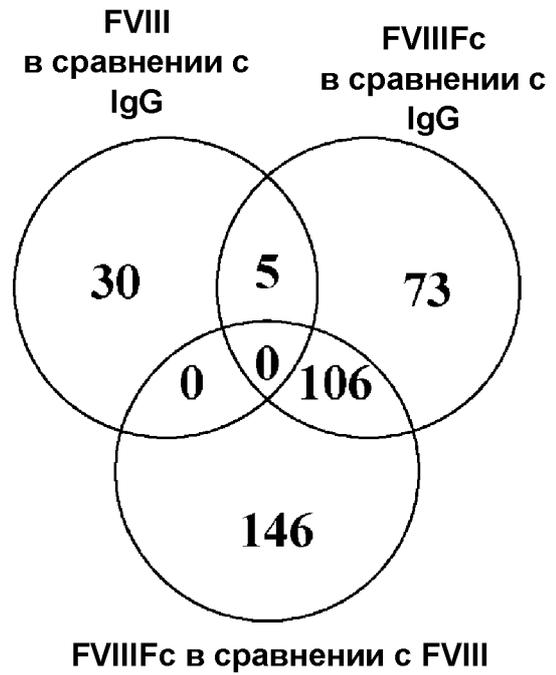
ФИГ. 3С



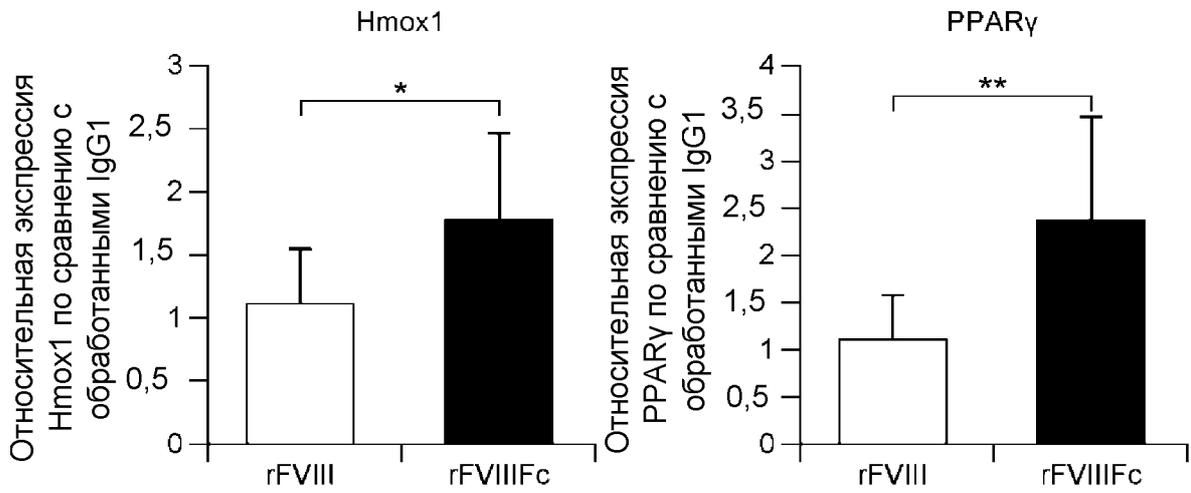
ФИГ. 4



ФИГ. 5А

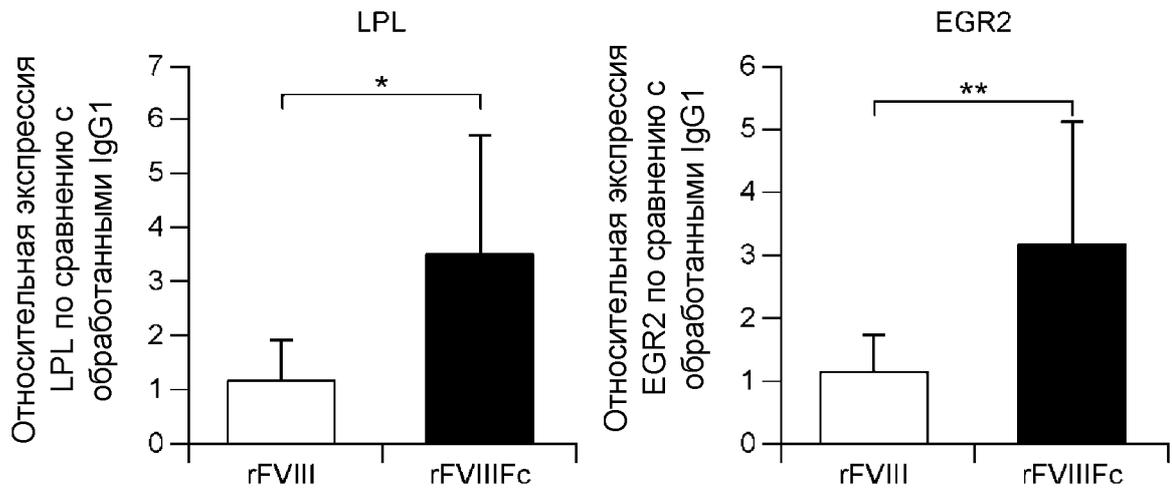


ФИГ. 5В



ФИГ. 5С

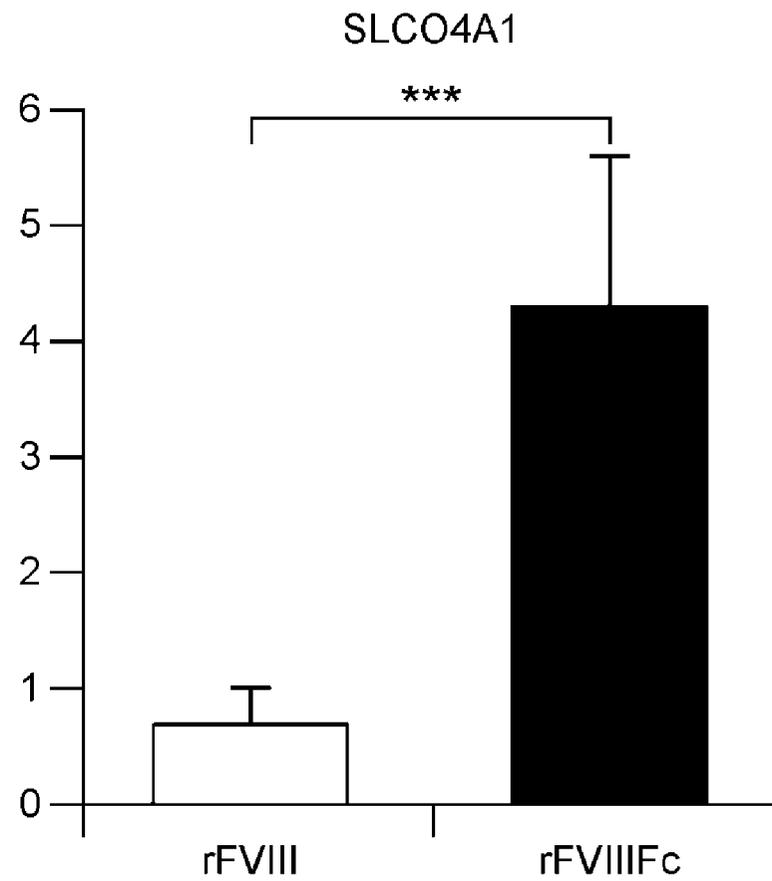
ФИГ. 5D



ФИГ. 5Е

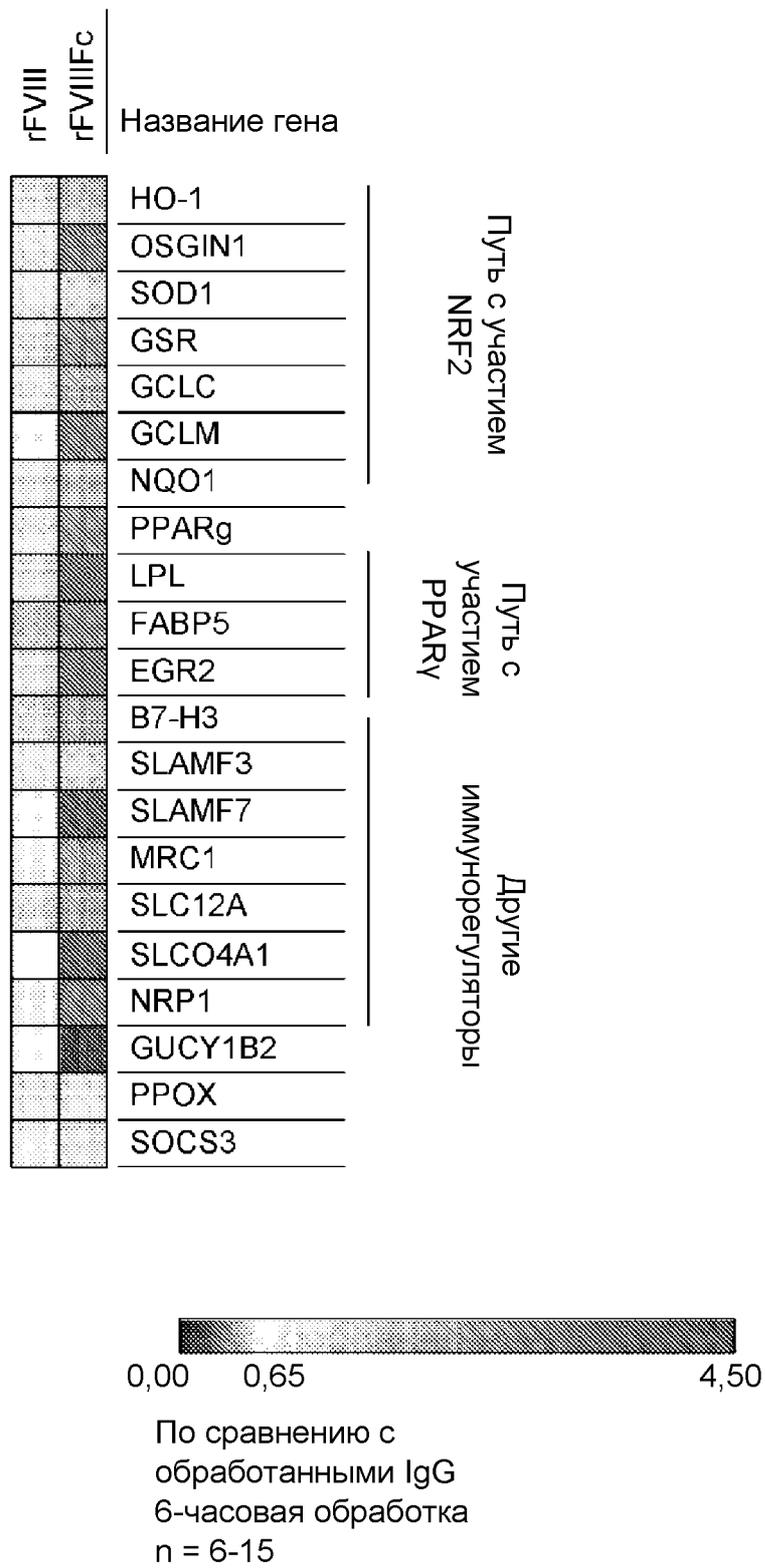
ФИГ. 5F

Относительная экспрессия SLCO4A1 по сравнению с обработанными IgG1

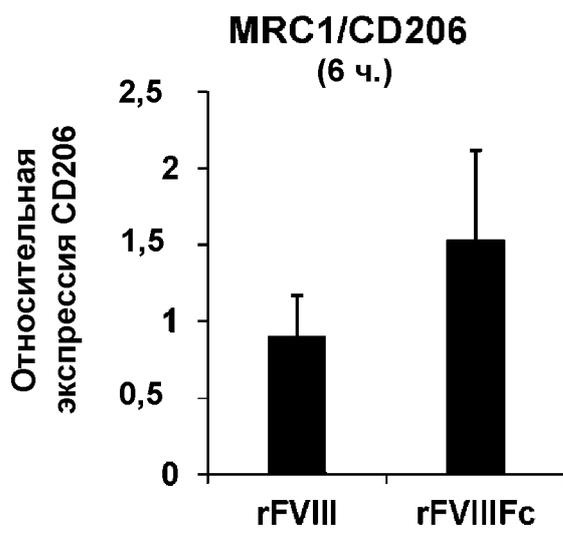


8/15

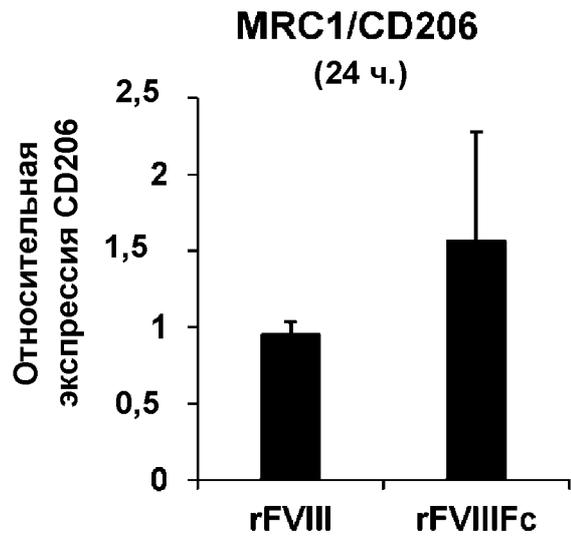
ФИГ. 5G



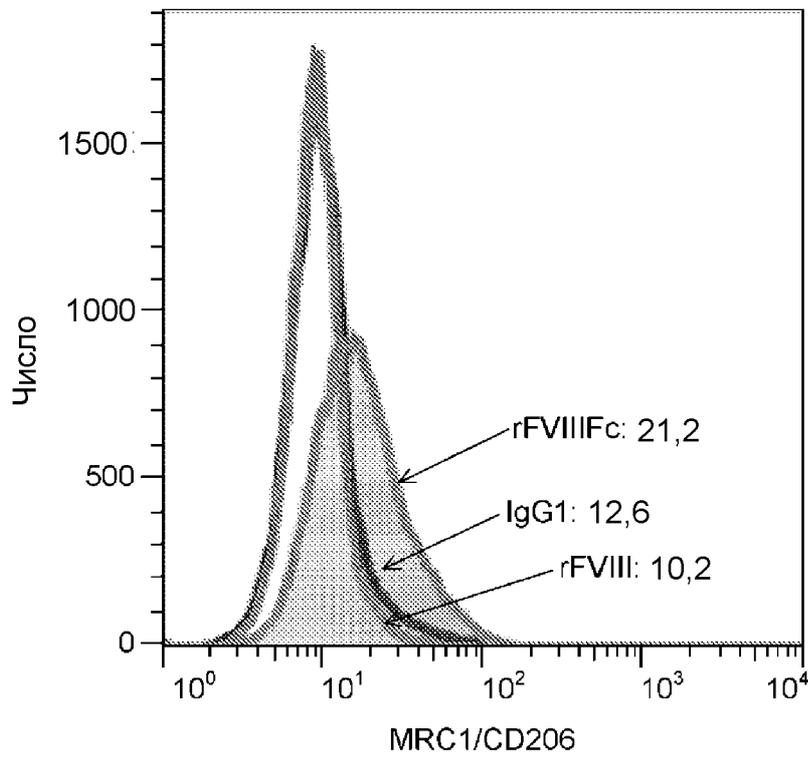
**ФИГ. 5H**



ФИГ. 5I



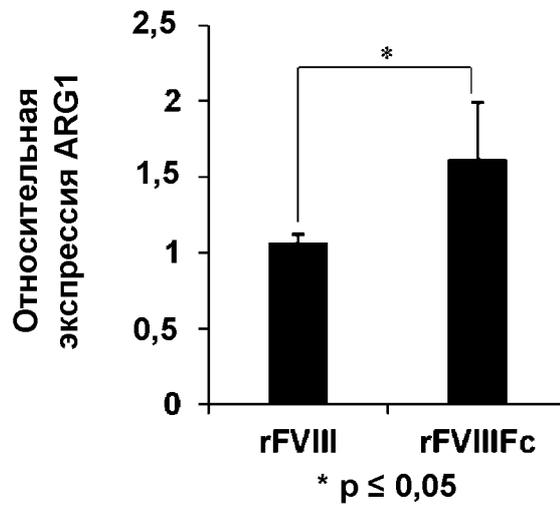
ФИГ. 5J



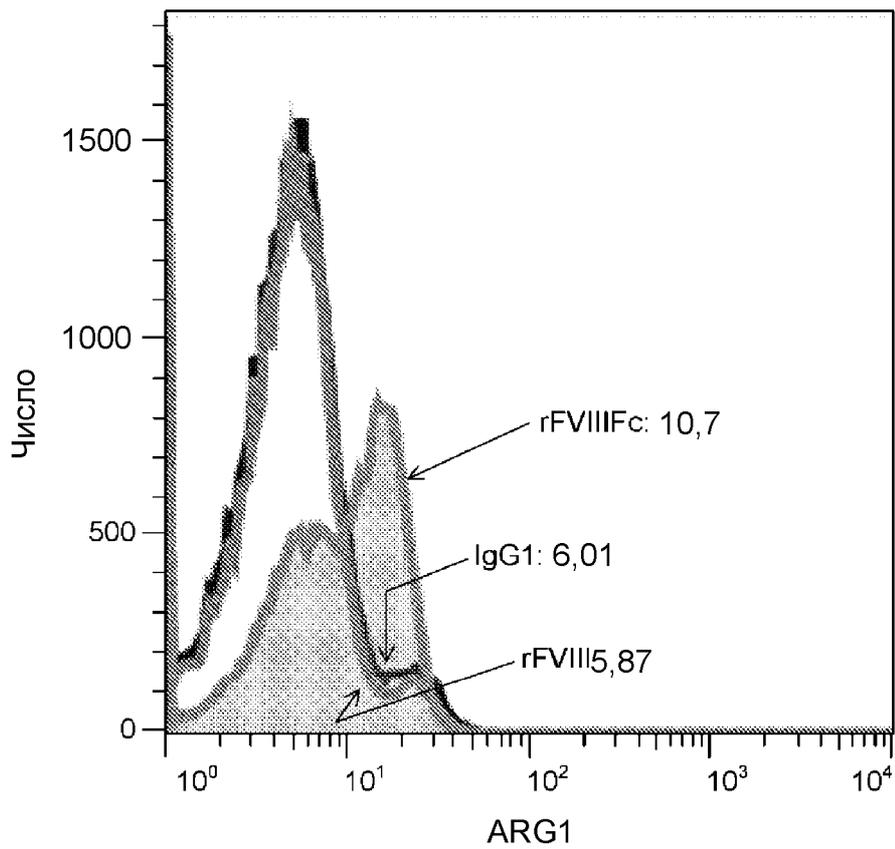
ФИГ. 5K

11/15

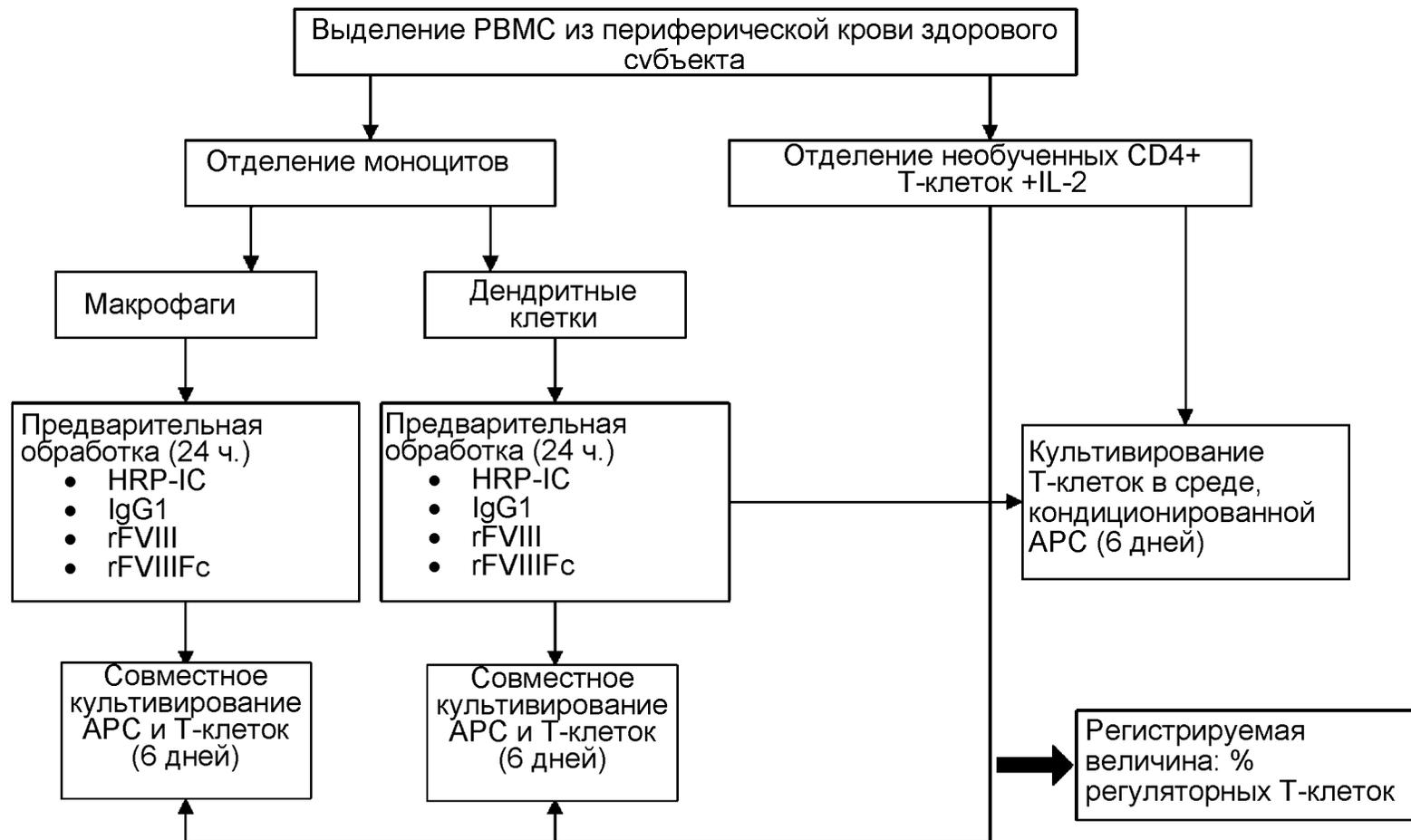
ARG1  
(24 ч.)



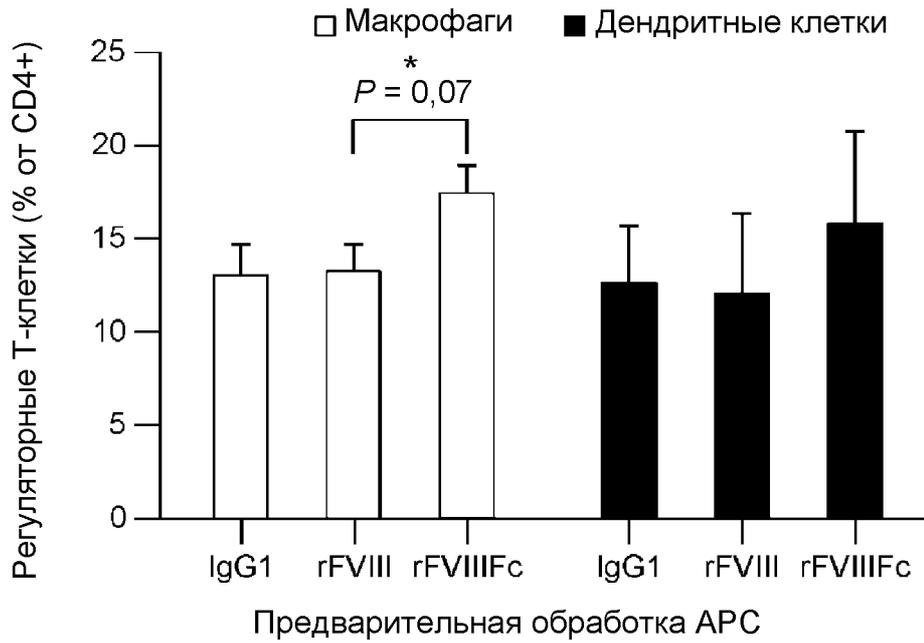
ФИГ. 5L



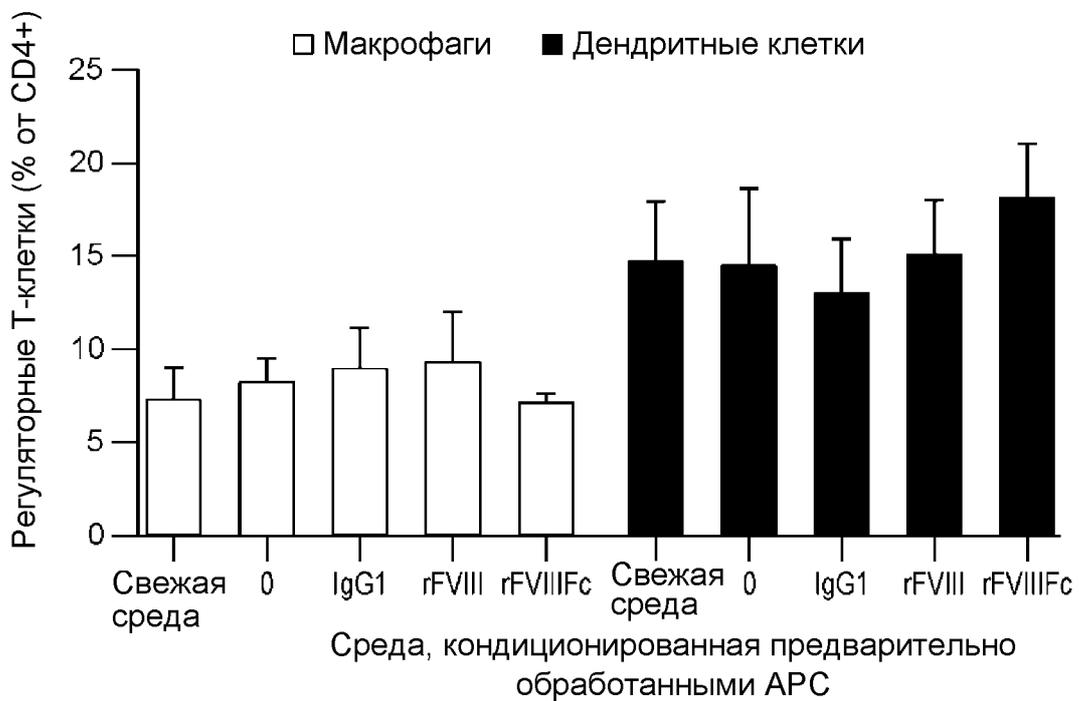
ФИГ. 5M



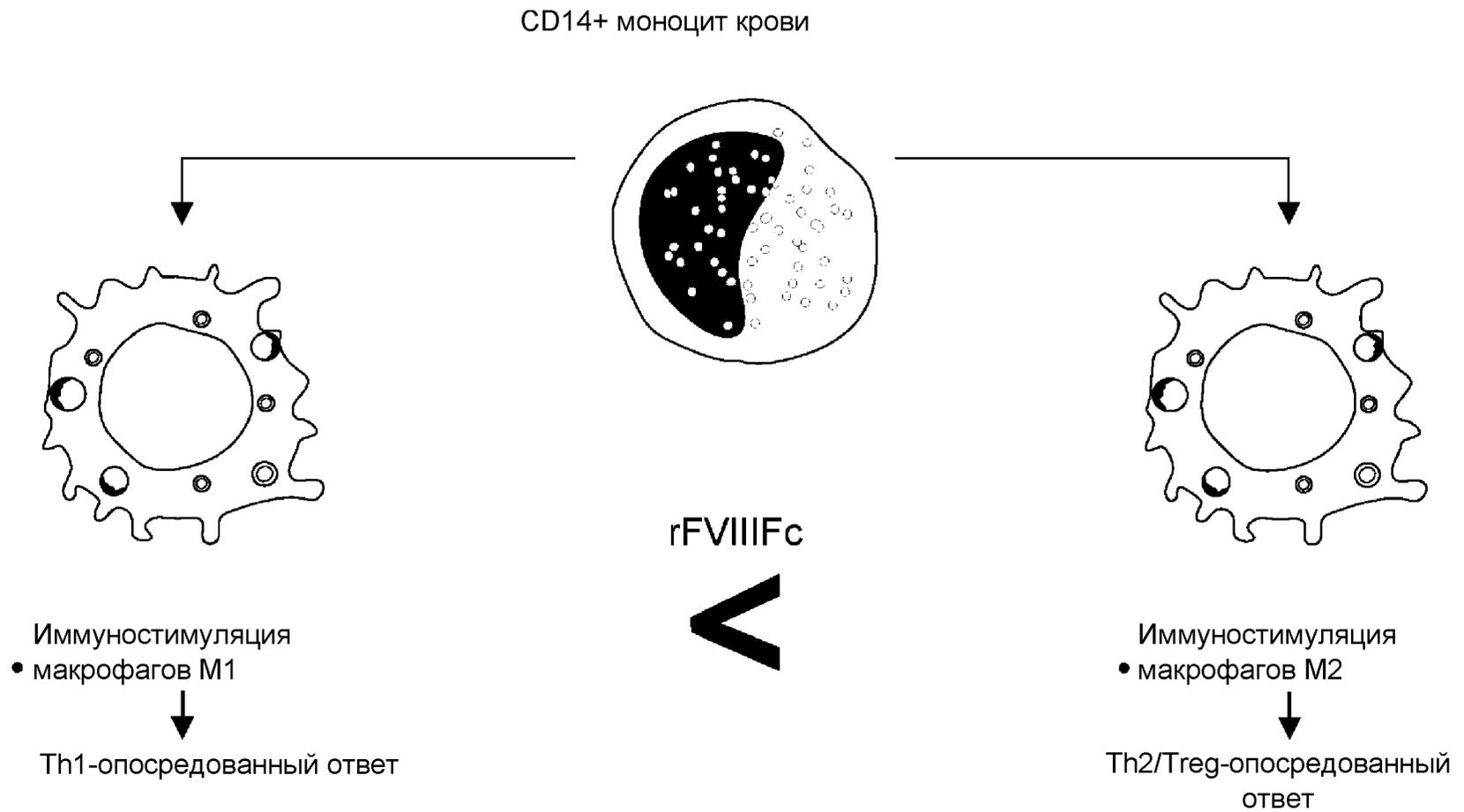
ФИГ. 6А



ФИГ. 6В

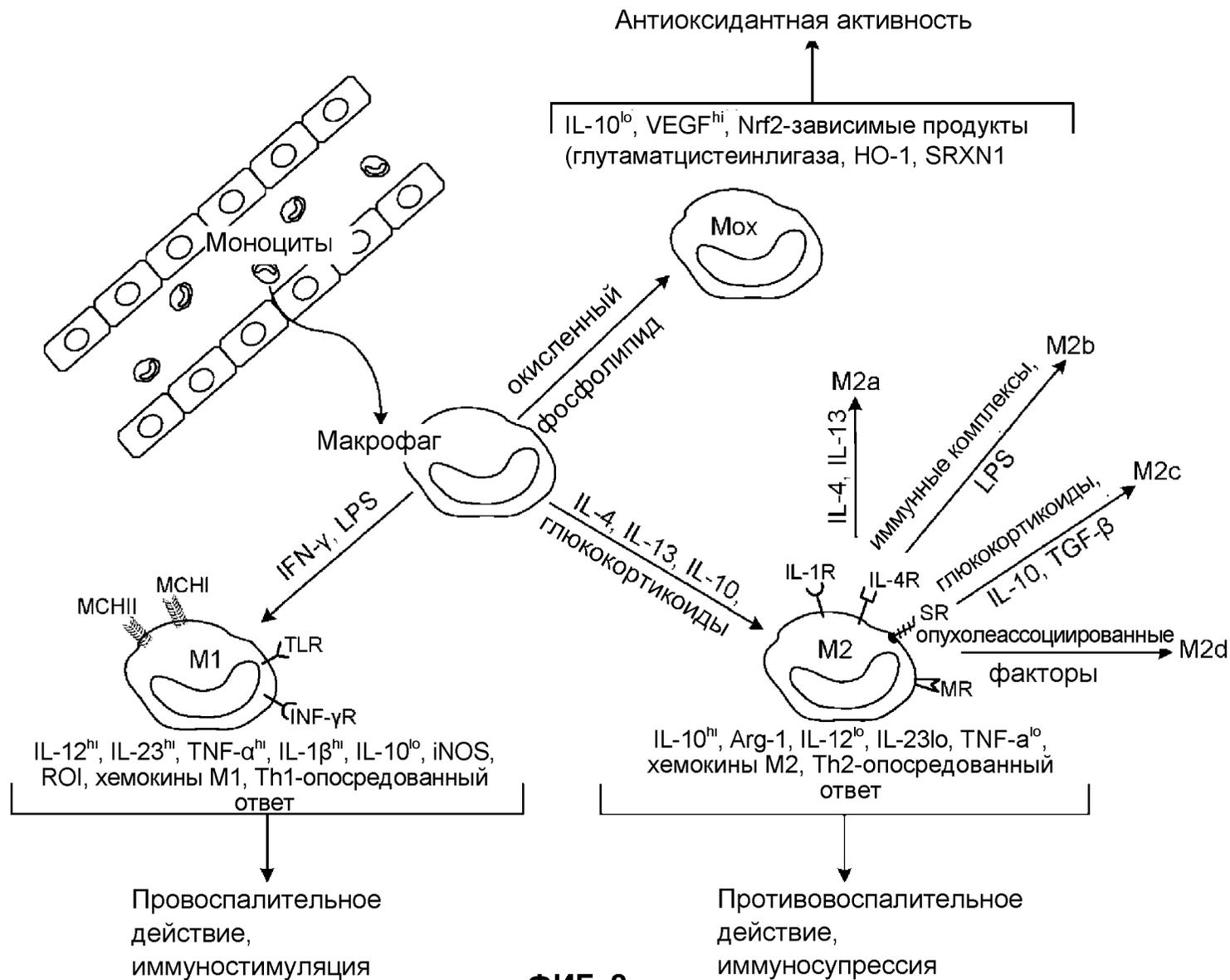


ФИГ. 6С



14/15

ФИГ. 7



ФИГ. 8