

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035447**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.06.17

(51) Int. Cl. **A61K 38/37** (2006.01)
A61K 35/14 (2006.01)

(21) Номер заявки
201390654

(22) Дата подачи заявки
2011.11.04

(54) ВЫДЕЛЕННЫЙ РЕКОМБИНАНТНЫЙ ВАРИАНТ ФАКТОРА VIII (FVIII) С ЧАСТИЧНО УДАЛЕННЫМ В-ДОМЕНОМ

(31) 61/410,437

(32) 2010.11.05

(33) US

(43) 2014.01.30

(86) PCT/US2011/059297

(87) WO 2012/061689 2012.05.10

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БАКСАЛТА ИНКОРПОРЕЙТИД
(US); БАКСАЛТА ГМБХ (СН)**

(72) Изобретатель:
**Лай Чи Конг, Стэффорд Родди Кевин
(US)**

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

(56) Donath, et al. Kinetics of Factor VIII Light-Chain Cleavage by Thrombin and Factor Xa. A Regulatory Role of the Factor VIII Heavy-Chain Region Lys713-Arg740. Eur. J. Biochem 1996, 240:365-372; Abstract, pg 336, col 1; pg 369, col 2
US-A1-20090270329

GenBank Direct Submission NP_999332 titled "coagulation factor VIII precursor [Sus scrofa]", (12 March 2010) [Retrieved from the Internet 09 May 2012: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/475234227?sat=14&satkey=2429836>>]
US-A1-20090271163

Ngo, et al. Crystal Structure of Human Factor VIII: Implications for the Formation of the Factor IXa-Factor VIIIa Complex. Structure 2008, 16(4): 597-606,
US-A1-20100120664

PIPE. Functional roles of the factor VIII B domain. Haemophilia 2009, 15(6):1187-1196

Thim, et al. Purification and characterization of a new recombinant factor VIII (N8). Haemophilia. Epub 11 November 2009, 16(2): 349-359
US-A1-20040147436
US-A1-20100081615

van den Brink, et al. Molecular analysis of human anti-factor VIII antibodies by V gene phage display identifies a new epitope in the acidic region following the A2 domain. Blood 2000, 96(2): 540-545

Nogami, et al. Exosite-interactive regions in the A1 and A2 domains of factor VIII facilitate thrombin-catalyzed cleavage of heavy chain. J Biol Chem. 2005, 280(18): 18476-87

Newell, et al. Acidic residues C-terminal to the A2 domain facilitate thrombin-catalyzed activation of factor VIII. Biochemistry. 2008, 47(33): 8786-95

(57) Изобретение относится к области терапии гемофилии. Заявлен выделенный рекомбинантный вариант фактора VIII (FVIII) с частично удаленным В-доменом, характеризующийся повышенной активностью коагуляции по сравнению с известными продуктами FVIII, и способ его получения. Также заявлена фармацевтическая композиция, содержащая указанный вариант FVIII, и способ ее получения; полинуклеотид, кодирующий указанный вариант FVIII; вектор экспрессии, содержащий указанный полинуклеотид; клетка млекопитающего, содержащая указанный вектор экспрессии. Заявлены способы лечения гемофилии А и приобретенной гемофилии, а также соответствующее применение заявленного варианта FVIII.

B1

035447

035447 B1

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к области факторов свертывания крови и лечения гемофилии. Оно относится к новой разновидности антигемофилического фактора VIII (FVIII), обозначенного здесь как rFVIIIv3, обладающего повышенной специфической активностью по сравнению с известными продуктами, содержащими фактор VIII.

Уровень техники

Процесс свертывания крови начинается с началом адгезии тромбоцитов к краю разреза поврежденного кровеносного сосуда в месте повреждения. Затем в каскаде ферментативно регулируемых реакций растворимые молекулы фибриногена преобразуются под действием фермента тромбина в нерастворимые нити фибрина, удерживающие тромбоциты вместе в составе тромба. На каждом этапе каскада вариант прекурсора конвертируется в протеазу, которая расщепляет следующий вариант прекурсора в каскаде. На большинстве этапов требуется взаимодействие с кофакторами.

Фактор VIII (также называемый антигемофилическим фактором VIII или FVIII) циркулирует в крови в виде неактивного прекурсора, связываясь сильной и нековалентной связью с фактором фон Виллебранда. Фактор VIII протеолитически активируется тромбином или фактором Ха, который диссоциирует его от фактора фон Виллебранда и активирует его прокоагулянтную функцию в каскаде свертывания. Вариант фактора VIIIa в своей активной форме является кофактором, увеличивающим каталитическую активность фактора IXa в отношении активации фактора X на несколько порядков.

Клонирование человеческого FVIII показало, что вариант содержит 2332 аминокислоты, организованные в ряде областей с последовательностью A1-A2-B-A3-C1-C2 (Vehar et al., 1984, Nature 312, 337-342; Toole et al., 1984, Nature 312, 342-347 и Wood et al., 1984, Nature 312, 330-337). Большинство FVIII представляют собой гетеродимеры в плазме, содержащие легкую цепь и различные производные тяжелой цепи. Наличие гетеродимерной структуры связано с протеолитическим расщеплением прекурсора в позиции аргинина¹⁶⁴⁸, что приводит к наличию тяжелой и легкой цепей, содержащих A₁-A₂-B и A₃-C₁-C₂ соответственно. Неоднородность в тяжелой цепи объясняется за счет ограниченного протеолиза в его карбокситерминальном B-домене.

Для того, чтобы функционировать в качестве кофактора, служащего для активации фактора X, FVIII требуется ограниченный протеолиз фактора Ха или тромбина. Эта активация включает расщепление в позиции аргинина в позиции 372 и 740 тяжелой цепи, и в позиции 1689 легкой цепи. Было установлено, что по сравнению с неактивным прекурсором, в активном FVIII кофакторе отсутствует фрагмент легкой цепи 1649-1689 и весь B-домен (Mertens et al., 1993).

Люди с дефицитом фактора VIII или носители антител против фактора VIII, не получавшие терапию препаратами фактора VIII страдают неконтролируемыми внутренними кровотечениями, что может привести к ряду тяжелых симптомов - от воспалительных реакций в суставах до ранней смерти. Тяжелых больных гемофилией, число которых в США составляет около 10000, можно лечить с помощью инфузии человеческого фактора VIII, который при его введении с достаточной частотой и концентрацией будет восстанавливать нормальную способность крови к свертыванию. Классическое определение фактора VIII, по сути, звучит, как определение вещества в нормальной плазме крови, которое исправляет дефекты свертывания плазмы крови, имеющиеся у лиц с гемофилией A.

Ряд полученных из плазмы препаратов человеческого фактора VIII с различной степенью чистоты имеется в продаже и предназначен для лечения гемофилии A. В их состав входит частично очищенный фактор VIII, полученный из объединенной крови большого числа доноров, обработанной нагреванием и противовирусными средствами, но содержащий значительный уровень антигенов различных вариантов. Очищенный моноклональными антителами фактор VIII имеет более низкие уровни антигенных примесей и вирусной контаминации. Также доступен рекомбинантный человеческий фактор VIII.

Выработка антител ("ингибиторов" или "ингибирующих антител"), которые ингибируют активность фактора VIII, является серьезным осложнением в лечении пациентов с гемофилией.

Аллоантитела вырабатываются у приблизительно 20% пациентов с гемофилией A в ответ на терапевтические инфузии фактора VIII. У ранее не леченных пациентов с гемофилией A, в организме которых вырабатываются ингибиторы, этот процесс обычно развивается в течение одного года лечения. Кроме того, выработка антител (аутоантител), инактивирующих фактор VIII, иногда развивается у лиц с ранее нормальным уровнем фактора VIII. Если титр ингибитора является достаточно низким, лечение пациентов может продолжаться с помощью увеличения дозы фактора VIII. Однако зачастую титр ингибитора настолько высок, что он не может быть скомпенсирован дозой фактора VIII. Альтернативной стратегией является обход необходимости введения фактора VIII при нормальном гемостазе, с использованием препаратов концентрата активированного протромбинового комплекса (например, KONYNE (Cutter Laboratories), FEIBA (Baxter Healthcare), PROPLEX (Baxter Healthcare)) или рекомбинантного человеческого фактора VIIa. Кроме того, поскольку свиной фактор VIII, как правило, имеет значительно меньшую реактивность с ингибиторами по сравнению с человеческим фактором VIII, используется препарат частично очищенного свиного фактора VIII (HYATE: C (IPSEN Pharma)). Многие пациенты, у которых развилась выработка ингибиторных антител к фактору VIII человека, успешно лечились свиным фактором VIII и перенесли такое лечение в течение длительного периода времени.

Тем не менее, проблемы общественного здравоохранения, связанные с риском наличия вирусов или других передаваемых через кровь инфекций ограничивают практическое использование свиного фактора VIII, полученного с помощью очистки из крови свиньи. В связи с этим был разработан вариант рекомбинантного свиного фактора VIII, обозначенный "OBI-1" и описанный, например, в WO 01/68109. OBI-1 представляет собой свиной фактор VIII с частично удаленным В-доменом. Данная молекула в настоящее время находится в стадии клинической разработки.

Известные варианты фактора VIII с удаленным В-доменом сохраняют прокоагулянтную и кофакторную активность фактора VIII. В дополнение к этому Mertens et al. (British Journal of Haematology 1993, 85, 133-142) описывает варианты рекомбинантного человеческого фактора VIII с отсутствующим В-доменом и последовательностью тяжелой цепи, охватывающей область от поз. лизина 713 до поз. аргинина 740.

Многие больные гемофилией требуют ежедневного пополнения фактора VIII для профилактики кровотечений, и в результате развития деформирующей гемофильной артропатии. В связи с этим существует потребность в более эффективно действующей молекуле фактора VIII.

Сущность изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному варианту фактора VIII (FVIII) с частично удаленным В-доменом и лишенному аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотным остаткам от 716 до 742 свиного FVIII на фиг. 2 или аминокислотным остаткам от 714 до 740 последовательности SEQ ID NO: 7, причем вариант FVIII имеет последовательность SEQ ID NO: 1 и характеризуется повышенной активностью коагуляции по сравнению с известными продуктами FVIII.

Второй аспект настоящего изобретения относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид, как определено в первом аспекте.

В третьем аспекте изобретение относится к вектору экспрессии, содержащему полинуклеотид, как определено во втором аспекте.

Четвертый аспект настоящего изобретения относится к клетке млекопитающего, содержащей вектор экспрессии, как определено в третьем аспекте.

В пятом аспекте настоящее изобретение относится к способу получения FVIII, как определено в первом аспекте, включающему следующие стадии:

- а) Культивирование клеток млекопитающих в соответствии с четвертым аспектом и
- б) Выделение из клетки млекопитающего варианта FVIII.

Шестой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей вариант FVIII, как определено в первом аспекте.

В седьмом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения пациента, страдающего гемофилией, включающему введение терапевтически эффективного количества варианта FVIII в соответствии с первым аспектом настоящего изобретения пациенту, тем самым производя лечение гемофилии у указанного пациента.

В восьмом аспекте настоящее изобретение относится к применению варианта FVIII в соответствии с первым аспектом для лечения гемофилии.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показано количество белка в мкг на дозу, необходимого для 5 известных продуктов FVIII (пустые столбцы) и нового gpFVIIIv3 (заштрихованный столбец). BDD = В-домен удален; FL = полная длина; фиг. 2 а-е являются продолжением той же последовательности.

На фиг. 2 а-е показано выравнивание последовательностей между последовательностями факторов VIII человека (*homo sapiens*), свиньи (*sus scrofa*), мыши (*mus musculus*) и собаки (*canis familiaris*). Это выравнивание последовательностей взято из HADB (также известного, как HAMSTeRS) 2010, веб-страницы Базы данных мутаций при гемофилии А, и сайта ресурсов для работы с фактором VIII (hadb.org.uk). Нумерация соответствует человеческой последовательности и не идентична нумерации последовательностей аминокислот в списке последовательностей. Полужирным шрифтом с двойным подчеркиванием выделены последовательности, отсутствующие в вариантах осуществления изобретения получения рекомбинантного FVIIIv3. Подчеркнутая последовательность представляет собой последовательность В-домена. Последовательность, выделенная серым цветом, является частью В-домена, которая может быть сохранена в последовательности изобретения FIIIv3 с частично удаленным В-доменом, а также

на фиг. 3 показан типичный пример профиля SEC из калибровочных стандартов и калибровочной кривой линейной регрессии, как описано в примере 5.

Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO: 1 показывает последовательность свиного FVIIIv3 с частично удаленным В-доменом;
 SEQ ID NO: 2 показывает последовательность человеческого FVIIIv3 с удаленным В-доменом;
 SEQ ID NO: 3 показывает последовательность собачьего FVIIIv3 с удаленным В-доменом;
 SEQ ID NO: 4 показывает последовательность В-домена свиного FVIII, которая может присутствовать в молекуле изобретения FVIII с частично удаленным В-доменом по изобретению (так называемый

"линкер В-домена");

SEQ ID NO: 5 показывает линкерную последовательность из В-домена человеческого FVIII, которая может присутствовать в молекуле FVIII с частично удаленным В-доменом по изобретению;

SEQ ID NO: 6 показывает линкерную последовательность из В-домена собачьего FVIII, которая может присутствовать в молекуле FVIII с частично удаленным В-доменом по изобретению;

SEQ ID NO: 7 показывает аминокислотную последовательность полноразмерного свиного FVIII;

SEQ ID NO: 8 показывает аминокислотную последовательность полноразмерного человеческого FVIII;

SEQ ID NO: 9 показывает аминокислотную последовательность полноразмерного собачьего FVIII;

SEQ ID NO: 10 показывает 27-пептидную последовательность, соответствующую аминокислотам от 716 до 742 свиного фактора VIII, как показано на фиг. 2, или аминокислотам от 714 до 740 из SEQ ID NO: 7;

SEQ ID NO: 11 показывает 27-пептидную последовательность, соответствующую аминокислотам от 714 до 740 человеческого фактора VIII, как показано на фиг. 2, или аминокислотам от 714 до 740 из SEQ ID NO: 8 и

SEQ ID NO: 12 показывает 27-пептидную последовательность, которая соответствует аминокислотам от 714 до 740 собачьего фактора VIII, как показано на фиг. 2, или аминокислотам от 708 до 734 из SEQ ID NO: 9.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к выделенному рекомбинантному варианту фактора VIII (FVIII) с частично удаленным В-доменом и лишенному аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотным остаткам от 716 до 742 свиного FVIII на фиг. 2 или аминокислотным остаткам от 714 до 740 последовательности SEQ ID NO: 7, причем вариант FVIII имеет последовательность SEQ ID NO: 1 и характеризуется повышенной активностью коагуляции по сравнению с известными продуктами FVIII.

Такие варианты обладают повышенной специфической активностью по сравнению с аналогичными вариантами, содержащими интактную 27-аминокислотную последовательность.

Предпочтительно, специфическая активность возрастает более чем на 25, или 30, или 35, или 40, или 45, или 50, или 55, или 60%.

Термин "специфическая активность", используемый здесь, относится к активности, корректирующей дефект коагуляции, возникающий при дефиците человеческого фактора VIII в плазме. Специфическая активность измеряется в единицах свертывающей активности на миллиграмм общего варианта фактора VIII в стандартном анализе, в которой сравнивается время коагуляции плазмы при дефиците человеческого фактора VIII со временем коагуляции нормальной человеческой плазмы. Подходящим стандартным анализом для измерения эффективности продуктов FVIII, одобренным FDA для концентратов FVIII высокой чистоты, считается одноэтапный анализ свертывания (OSCA; см. Пример 5; Langdell RD, Wagner RH, Brinkhous KM., Effect of antihemophilic factor on one-stage clotting tests: a presumptive test for hemophilia and a simple one-stage antihemophilic assay procedure, J Lab Clin Med, 1953; 41:637-47; Brand JT, Measurement of factor VIII: a potential risk factor for vascular disease, Arch Pathol Lab Med, 1993; 117:48-51; Preston FE, Kitchen S, Quality control and factor VIII assays, Haemophilia, 1998; 4:651-3; National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS USA). Определение прокоагулянтной активности факторов свертывания; Утвержденное руководство, NCCLS Document H-48-A 1997; 17:1-36.). Количество белка FVIII, присутствующего в образце, может быть измерено, например, методом SEC ВЭЖХ (эксклюзионной жидкостной хроматографии).

Одной единицей активности фактора VIII считается его активность, присутствующая в одном миллилитре нормальной человеческой плазмы. При проведении анализа считается, что чем короче время образования сгустка, тем больше активность исследуемого фактора VIII. Активность свиного фактора свертывания VIII используется при анализе человеческого фактора VIII.

В соответствии с настоящим изобретением термины "белок" и "полипептид" используются взаимозаменяемо.

Понятие "лишенный аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотам от 716 до 742, как показано на фиг. 2", означает, что аминокислоты 716 и 742, а также аминокислоты, находящиеся между этими позициями, удалены, т.е. они не входят в вариант FVIII, предлагаемый в изобретении. Этот участок аминокислот, таким образом, состоит из 27 аминокислот, которых лишены варианты FVIII, предлагаемые в изобретении.

Варианты фактора VIII изобретения, приведенные здесь, глобально именуется как "FVIII вариант(ы)" или "FVIIIv3" или "rFVIIIv3". Они могут быть свиные, человеческие, собачьи, мышинные или любого другого происхождения, подходящие для лечения человека или животного. Фиг. 2 показывает выравнивание последовательностей FVIII человеческого, свиного, мышинного и собачьего происхождения.

Последовательности, удаленные в вариантах FVIII изобретения выделены полужирным шрифтом и подчеркнуты двойной линией. Этот участок аминокислоты может быть идентифицирован для вариантов FVIII других видов специалистом в данной области путем выравнивания последовательностей FVIII для других видов, например, свинной или человеческой последовательности и с аминокислотами, которые

соответствуют аминокислотам от 716 до 742 в соответствии с фиг. 2 настоящей патентной заявки.

Варианты осуществления изобретения относятся к вариантам FVIII свиного, человеческого или собачьего происхождения.

Для определения процента идентичности двух полипептидов/белков аминокислотные последовательности выравниваются с целью оптимального сравнения (например, в первую аминокислотную последовательность могут быть введены пробелы для оптимального выравнивания со второй аминокислотной последовательностью). Затем подвергаются сравнению аминокислотные остатки в соответствующих положениях аминокислот. Если позицию в первой последовательности занимают такие же аминокислотные остатки, как и находящиеся на соответствующей позиции во второй последовательности, то молекулы в данной позиции являются идентичными. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией числа идентичных положений, общих для этих последовательностей (т.е. % идентичности = числу идентичных позиций/общее число позиций (например, (перекрывающихся позиций)×100).

Определение процента идентичности между двумя последовательностями может быть реализовано с использованием математического алгоритма. Предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения двух последовательностей, является алгоритм Karlin и Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, модифицированный Karlin и Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST, Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. Поиск нуклеотидов BLAST может выполняться с помощью программы NBLAST, счет = 100, длина слова = 12 для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновых кислот изобретения. Поиск вариантов BLAST может выполняться с помощью программы XBLAST, счет = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных вариантам молекул изобретения. Для выравнивания с помощью вставки пробелов, которое используется для целей сравнения, может быть использована программа Gapped BLAST, как описано в статье Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Кроме того, для выполнения повторного поиска, который обнаруживает более дальние взаимоотношения между молекулами, может быть использована программа PSI-Blast. При использовании средств BLAST, Gapped BLAST и PSI-Blast, используются параметры, заданные по умолчанию для соответствующих программ (например, для XBLAST и NBLAST). Другим предпочтительным неограничивающим примером математического алгоритма, используемого для сравнения последовательностей, является алгоритм Myers и Miller (1988) CABIOS 4:11-17. Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая является частью GCG - пакета программ по выравниванию последовательностей. При использовании программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей может быть использована таблица весов остатков PAM120, значения "штрафа за удлинение пробела" (gap length penalty) = 12, и "штрафа на делецию" (gap penalty) = 4. Еще одним полезным алгоритмом выявления областей локального сходства последовательностей и выравнивания является алгоритм FASTA, описанный Pearson и Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448. При использовании алгоритма FASTA для сравнения нуклеотидных или аминокислотных последовательностей может, например, быть использована таблица весов остатков PAM120 со значением k-кортежа (k-tuple) = 2.

Процент идентичности между двумя последовательностями может быть определен с использованием методик, аналогичных описанным выше, с или без учета пробелов. При расчете процента идентичности считаются только точные совпадения.

В вариантах осуществления изобретения остаточная часть В-домена выбрана из последовательности, состоящей из SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 или SEQ ID NO: 6.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, кодирующему полипептид/белок, как описано выше. Полинуклеотид может быть молекулой РНК или ДНК, нуклеотидная последовательность которых воплощает закодированную информацию для клетки-хозяина аминокислотной последовательности варианта изобретения, в соответствии с известными соотношениями генетического кода.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к вектору экспрессии, содержащему полинуклеотид, как описано выше.

"Вектор экспрессии" представляет собой элемент ДНК, часто кольцевой структуры, обладающий способностью автономно реплицироваться в требуемой клетке-хозяине, или интегрироваться в геном клетки-хозяина, а также обладающий определенными известными функциями, обеспечивающими экспрессию кодирующей ДНК, встроенными в векторную последовательность в нужном месте и в правильной ориентации. Такие функции могут включать в себя, но не ограничиваются ими, одну или несколько промоторных последовательностей для прямого инициирования транскрипции кодирующей ДНК, и другие элементы ДНК, такие как энхансеры, сайты полиаденилирования и т.п., все они хорошо известны специалистам в данной области. Термин "вектор экспрессии" используется для обозначения как вектора, содержащего ДНК кодирующую последовательность, подлежащую экспрессии и вставленную в своей последовательности, так и вектора, имеющего необходимые контролирующие экспрессию элементы, расположенные таким образом по отношению к сайту вставки, что он может служить для экспрессии

любой кодирующей ДНК, вставленной в сайт - все это хорошо известно специалистам в данной области. Так, например, вектор, не имеющий промотора, может стать вектором экспрессии путем вставки промотора в комбинации с кодирующей ДНК. Вектор экспрессии, используемый здесь, также может быть вирусным вектором.

Экспрессию рекомбинантного FVIII в вариантах изобретения предпочтительно осуществлять в культуре клеток млекопитающих.

Таким образом, в дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к клетке млекопитающего, содержащей вектор экспрессии, как описано выше. Например, клетки СНО (яичника китайского хомяка) и клетки ВНК (клетки почки детенышей хомяка) являются клетками млекопитающих, подходящими для роли клеток-хозяев в контексте настоящего изобретения.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения способ получения варианта FVIII настоящего изобретения включает следующие стадии:

- а) культивирование клеток млекопитающих, как описано выше, а также
- б) выделение из клетки млекопитающего варианта FVIII.

В одном варианте осуществления способ дополнительно включает стадию

в) составления варианта фактора VIII вместе с соответствующими вспомогательными веществами для фармацевтической композиции.

Вспомогательными веществами для назначения человеку или животному являются, например, фармацевтические стабилизирующие соединения, консерванты, средства доставки и/или носители. Один подходящий состав для продуктов фактора VIII описан, например, в WO 03/080108, включенном в данное описание в виде ссылки.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей вариант FVIII изобретения.

Еще один аспект настоящего изобретения относится к способу лечения пациента, страдающего дефицитом фактора VIII, который включает введение терапевтически эффективного количества FVIII, описанного в изобретении, пациенту, тем самым производя лечение дефицита фактора VIII у указанного пациента.

Термин "терапевтически эффективное количество", как он использован здесь, означает уровень FVIII в плазме пациента, имеющего дефицит FVIII, полученный в фармацевтической композиции варианта FVIII, то есть, достаточный для проявления измеримого улучшения или защитного эффекта у пациента (например, для остановки кровотечения). К пациентам с дефицитом FVIII, как правило, относятся больные с врожденной гемофилией А, но также и пациенты с диагнозом "приобретенная гемофилия" - состоянием, в котором у больных без врожденной гемофилии спонтанно развивается выработка ингибирующих антител к FVIII, что приводит к тяжелому дефициту FVIII.

Изобретение также относится к применению варианта FVIII в лечении дефицита фактора VIII.

Лечение может производиться в форме одного внутривенного введения композиции или периодического, или непрерывного введения в течение продолжительного периода времени, по мере необходимости. Предпочтительным путем введения варианта FVIII является внутривенный путь.

Понятие "дефицит фактора VIII", как оно используется здесь, включает дефицит свертывающей активности, вызванный производством дефектного фактора VIII, неадекватным производством фактора VIII или его отсутствием, либо существующий за счет частичного или полного ингибирования фактора VIII ингибиторами. Гемофилия А является типом дефицита фактора VIII вследствие дефекта гена, локализованного в X-хромосоме, и отсутствием или недостатком варианта фактора VIII, которого он кодирует.

FVIII варианты изобретения используются для лечения неконтролируемых кровотечений вследствие недостаточности фактора VIII (например, внутрисуставных, внутричерепных или желудочно-кишечных кровотечений) у больных гемофилией.

В варианте осуществления изобретения дефицит фактора VIII является гемофилией А.

В другом варианте осуществления изобретения дефицит фактора VIII является приобретенной гемофилией.

В одном варианте осуществления изобретения терапия дефицита фактора VIII осуществляется у пациентов с выработкой человеческих антител к FVIII.

Как упоминалось выше, варианты FVIII, предложенные в изобретении, обладают повышенной специфической активностью. Таким образом, вариант FVIII в соответствии с настоящим изобретением можно назначать для лечения дефицита фактора VIII в сниженных количествах. Количество варианта FVIII в данном изобретении может быть уменьшено по меньшей мере на 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60% по сравнению с количеством, используемым для терапии, продукта FVIII, не содержащего до 27 делеций аминокислот.

Терапия сниженным количеством варианта FVIII имеет ожидаемое преимущество, состоящее в снижении иммуногенности, то есть предполагается, что вероятность производства ингибиторных антител, развивающаяся при пополнении FVIII в организме пациента, значительно уменьшается.

В одном варианте осуществления изобретения вариант фактора VIII, предлагаемый в данном изобретении, вводят в количестве не более 200 или 150 мкг/дозу, или 145, или 140, или 136, или 130 мкг/дозу.

Имея полное описание настоящего изобретения, специалистам в данной области будет понятно, что то же самое может быть выполнено в широком диапазоне эквивалентных параметров, концентраций и условий без отхода от сущности и объема настоящего изобретения и без излишнего экспериментирования.

Хотя настоящее изобретение было описано в связи с конкретными вариантами его осуществления, тем не менее понятно, что возможны дополнительные его модификации. Данная заявка охватывает любые варианты применения или адаптации настоящего изобретения, принципы настоящего изобретения в общем. Сюда относятся определенные отклонения, находящиеся в пределах известной и основанной на опыте практики в данной области, к которой относится изобретение, и могут быть применены к признакам, изложенным выше, как следует из сферы применения прилагаемой формулы изобретения.

Все ссылки, приведенные в данном описании, включая журнальные статьи или рефераты, опубликованные или неопубликованные заявки на патенты США или иностранные патенты, выданные патенты США или иностранные патенты, или любые другие ссылки, полностью включены в данное описание в виде ссылок, включая все данные, таблицы, фигуры и текст, и представленные в виде цитированных ссылок. Кроме того, полное содержание цитированных ссылок, приведенных в данном описании, также полностью включено в виде ссылки.

Ссылки на известные этапы способа, традиционные этапы способа, известные или традиционные способы не являются признанием того, что любой аспект, описание или вариант осуществления настоящего изобретения раскрыты, изучены или предложены в данной области техники.

Приведенное выше описание конкретных вариантов осуществления настолько полно раскрывает общий характер изобретения, что другие исследователи могут, применяя знания в данной области (включая содержание ссылок, цитируемых здесь), легко модифицировать и/или адаптировать его для различного применения в конкретных вариантах осуществления, без излишнего экспериментирования, не отходя от общей концепции настоящего изобретения. Таким образом, такое описание вариантов адаптации и модификации предназначено для того, чтобы они находились внутри диапазона эквивалентных вариантов осуществления, на основе принципов обучения и руководства, представленных в настоящем документе. Следует понимать, что фразеология или терминология, используемые здесь, предназначены для описания, а не для установления границ, так что терминологию или фразеологию настоящего описания специалисту в данной области следует понимать в свете идей и рекомендаций, приведенных в данном описании, сочетая их со знаниями, доступными любому специалисту в данной области.

Примеры

Пример 1. Экспрессия рекомбинантного свиного FVIII с частично удаленным В-доменом (ОВI-1) и выделение трех вариантов белка (gpVIIIv1, v2 и v3)

Экспрессию ОВI-1 в клетках ВНК проводили по существу, как описано в патенте US 6458563. В полученном материале были обнаружены три варианта фактора (gpVIIIv1, v2 и v3). Варианты были выделены и очищены до >95% чистоты с помощью ионообменной хроматографии. Для очистки с помощью АКТА Explorer system (АКТА Explorer 10, GE Healthcare Lifesciences # 17-5167-01), использовалась MonoQ HR10/10, полупрепаративная анионообменная колонка (сейчас Mono Q 10/100 GL, GE Healthcare Lifesciences # 17-5167-01). Элюирование осуществлялось по градиенту с помощью двух следующих буферов:

Буфер А: 10 мМ Трис, рН 7,0, 0,01% полисорбата 80

Буфер В: Буфер А и 1М хлорида натрия.

Характеристики способа очистки представлены в табл. 1

Таблица 1. Способ очистки варианта рFVIII

Способ АКТА:	Лоор MQ1010	
Поток:	4 мл/мин	
Равновесие колонки	8 CV	
Нагрузочный поток	4 мл/мин	
Объем образца	40-1000 мл	
Промывка колонки	10 CV	
Градиент	Объем колонки (CV)	% В
	7	45
	4	50
	4	50
	6	52
	4	52
	2	55
	7	60
	1	65
	5	65
	1	70
	5	70
	1	100
	7	100
	1	10
	4	10
Всего	59 CV	
Температура колонки:	Не контролировалась	

Пример 2. Вариант 3 (рFVIIIv3), обладающий значительно более высокой специфической активностью, по сравнению с вариантами 1 и 2.

Специфическую активность каждого варианта оценивали путем деления эффективности, оцениваемой с помощью одноэтапного анализа коагуляции (OSCA) на концентрацию белка, измеренную с помощью SEC ВЭЖХ. Исследования с использованием способов OSCA и SEC ВЭЖХ проводились, как описано в разделе "Материалы и способы", пример 5.

Результаты

Результаты исследования специфической активности приведены в табл. 2.

Таблица 2. Специфическая активность (OSCA способ) очищенных вариантов 1, 2 и 3, полученных из двух разных партий рFVIII

Образец по данным SEC	OSCA, ед./мл	ОСО*, %	Специфическая активность, ед./мл	ОСО*, %
V1 - партия 1	1060	1,5	11956	1,7
V2 - партия 1	715	2,7	17267	3,3
V3 - партия 1	216	1,2	25926	2,8
ОВI-1	513	1	18150	1,3
V1 - партия 2	980	1,2	12532	1,5
V2 - партия 2	613	0,6	16089	1,3
V3 - партия 2	280	2,9	19718	4,1
ОВI-1	565	4,0	14427	4,4

*Относительное стандартное отклонение

При проведении анализа OSCA отчетливо и последовательно наблюдалась значительно более высокая специфическая активность варианта 3. Поскольку способ OSCA является предиктивным и представляет процесс коагуляции в организме человека, можно ожидать, что вариант 3 является продуктом, имеющим значительную терапевтическую ценность. Ожидается, что увеличение активности в 1,5-2,0 раза позволяет уменьшить количество FVIII, вводимого пациентам, что может косвенно уменьшить степень возникновения побочных иммунологических эффектов.

Пример 3. Определение последовательности рFVIIIv3

Последовательность очищенного v3 определяется по пептидной карте с последующей ЖХ-МС

(жидкостной хроматографией масс-спектрометрией) и ЖХ-МС/МС (жидкостной хроматографией масс-спектрометрией/масс-спектрометрией) на спектрометре Q-TOF Ultima Mass Spectrometer, работающем под управлением MassLynx 4.0 (Waters Corporation, Milford, MA).

Приблизительно 250 мкг варианта 3 концентрировали с использованием концентратора Amicon, Centricon YM-10 с фильтром 10000 MWCO (Millipore Corporation, Billerica, MA) до объема <100 мкл. Образцы смешивали с 450 мкл 6М гуанидин HCl/0,002 М ЭДТА (этилендиаминтетрауксусной кислоты)/0,02 М Трис-буфера pH8 и переносили в 2,0 мл полипропиленовые пробирки. К каждому образцу добавляли 1М DTT (дителиотреитола) до достижения конечной концентрации 10 мМ и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После восстановления в каждую пробирку добавляли 2М иодацетамида до достижения конечной концентрации 20 мМ и инкубировали в течение еще одного часа при комнатной температуре. Восстановленные и алкилированные образцы переносили в диализные кассеты и подвергали диализу в течение 1 ч с 1 л 50 мМ бикарбоната аммония в диализном буфере, содержащем 1,0 М мочевины, pH 8. Затем образцы подвергали диализу с 1 л диализного буфера в течение ночи при комнатной температуре и постоянном перемешивании. После диализа конечные объемы каждого образца составляли примерно по 0,5 мл. Образцы были разделены на две аликвоты по 125 мкг.

После диализа образец белка содержится в матрице, являющейся оптимальной для протеолитического расщепления трипсином. Трипсин добавляли к каждому образцу в виде соотношения фермента к субстрату 1:20 (в:в) и инкубировали в течение 8 ч при 37°C. Все образцы были перенесены во флаконы для ВЭЖХ и анализировались с помощью ВЭЖХ-МС.

Восстановленный и алкилированный белок вводили в колонку Vydac C18 с обращенной фазой (Grace, Deerfield, IL). До введения образца был проанализирован контрольный образец (подвижная фаза А; деионизированная вода, содержащая 0,2% (о/о) муравьиной кислоты) с целью уравнивания колонки и демонстрации отсутствия перекрывающихся хроматографических пиков.

Данные масс-спектрометрии были получены на масс-спектрометрах Q-TOF API-US или Q-TOF Ultima (Waters Corporation, Milford, MA) с использованием ионизации электрораспылением (ESI) в режиме положительных ионов. Перед анализом проб масс-спектрометр был откалиброван на ионах 5-го порядка фрагмента пептида Glu-фибриногена, охватывающих диапазон от 175 до 1285 м/з. Для калибровки технических условий передачи, RMS (среднеквадратичное) ошибки для массы пептидных фрагментов должно составлять менее 5 частей на миллион. Для сбора и анализа данных были использованы программные пакеты Masslynx 4.0TM SP2 и SP4 (Waters Corporation, Milford, MA).

Данные МС и МС/МС были получены с использованием одножидкостной хроматографии (ЖХ). Полный обзор масс-спектрограмм (МС) был получен при 200-1950 м/з.

Последовательность гpFVIII была определена, как соответствующая SEQ ID NO: 1. Эта последовательность содержит делецию 27 аминокислот по сравнению с последовательностью OBI-1.

Пример 4. гpFVIIIv3 имеет более высокую специфическую активность по сравнению с другими известными продуктами FVIII

Специфическая активность гpFVIIIv3 сравнивалась с тремя имеющимися в продаже продуктами FVIII, а именно Xynthia® (рекомбинантный человеческий FVIII с удаленным В-доменом производства Wyeth Pharmaceuticals (Philadelphia, PA)), Kogenate FS® (полноразмерный человеческий FVIII производства Bayer Healthcare (Tarrytown, Нью-Йорк)) и Advate® (полноразмерный человеческий FVIII производства Baxter (Westlake Village, CA)), а также с OBI-1 (рекомбинантный свиной FVIII с частично удаленным В-доменом), в настоящее время находящийся в клинической разработке, и собачьим фактором VIII с частично удаленным В-доменом (Denise E. Sabatino et.al., Recombinant canine B-domain-deleted FVIII exhibits high specific activity and is safe in the canine hemophilia A model, Blood, 12 November 2009, vol. 114, No. 20, pp. 4562-4565).

Специфическую активность OBI-1 и гpFVIIIv3 определяли с помощью способов, описанных в примере 5.

Результаты приведены в табл. 3 и на фиг. 1. Благодаря повышенной специфической активности гpVIIIv3, пациенту можно вводить его меньшие количества на дозу. Предполагается, что такое снижение дозы приведет к уменьшению иммуногенности, т.е. приведет к более низкой вероятности того, что у пациентов начнется выработка ингибирующих антител.

Таблица 3. Специфическая активность продуктов FVIII по сравнению с rpVIIIv3

	Специфическая активность, МЕ/мг белка	Кол-во белка, мкг/дозу ^
Xynthia	7500	400
Kogenate FS	4000	750
Advate	4000	750
OBI-1	11000	273
rpVIIIv3	22000	136
Собачий BDD* FVIII	34000	88

^Кол-во белка = xxxx мкг/дозу. Цифры, приведенные в колонке для rpVIIIv3 означают, что на 1 дозу требуется его количество 136 мкг. Одной дозой считается количество препарата, необходимое для того, чтобы повысить уровень содержания фактора VIII в крови от 0 до 100%, т.е. чем выше специфическая активность (XXX единиц/мг), тем меньшее количество (в пересчете на мкг) требуется. Обратите внимание, что 1 мг = 1000 мкг. Учитывая, что типичная доза для пациента составляет 3000 единиц, количество белка, необходимого фактически = $3000/22000 = 0,136$ мг = 136 мкг.

*BDD расшифровывается как удаленный В-домен, FL обозначает полную длину

В заключение, эти результаты показывают, что rpVIIIv3 имеет значительно более высокую специфическую активность для заместительной терапии FVIII, по сравнению с тестируемыми продуктами, которые в настоящее время находятся в продаже или в процессе клинической разработки.

В частности, весьма удивительно то, что делеция 27 аминокислот в rpVIIIv3, но не в OBI-1 приводит к 50%-ному увеличению специфической активности (по данным анализа OSCA).

Пример 5. Материалы и способы

Одноэтапный коагуляционный анализ - способ OSCA

1) Развести эталонный стандарт в буфере для анализа (10% плазмы с дефицитом фактора VIII + Owen's Veronal Buffer, на литр, 28 ммоль натрия барбитала и 125 ммоль NaCl, pH 7,35) до целевой эффективности 1,0 единиц/мл.

2) Развести проверочные стандарты, растворы для контроля активности и образцы в буфере для анализа до целевой эффективности.

3) Загрузить калибровочный стандарт (эталон) и реагенты в соответствующие лунки внутри прибора Sysmex (Sysmex CA-1500, Coagulation Analyzer, Dade Behring # B4260-1500 (Siemens Corporation, Deerfield, IL)).

4) Загрузить проверочный стандарт, растворы для контроля и образцы в наружные стойки прибора Sysmex.

5) Анализ последовательности происходит автоматически внутри прибора следующим образом:

а) 5 мкл образца разводится в 45 мкл буфера для анализа внутри реакционной пробирки;

б) в реакционную пробирку добавляется 50 мкл плазмы с дефицитом фактора VIII;

в) 50 мкл Dade Actin FS (очищенные соевые фосфатиды в $1,0 \times 10^{-4}$ М активатора - эллаговой кислоты, Dade Behring, Liederbach, Германия) - реагент для измерения активированного частичного тромбопластинового времени - добавляется в реакционную пробирку и инкубируется в течение 60 с;

г) в реакционную пробирку добавляется и инкубируется в течение 240 с 50 мкл хлорида кальция (0,025 М, Dade Behring, Liederbach, Германия);

д) время свертывания измеряется до максимального времени 300 с.

6) Время свертывания затем коррелируется со стандартной калибровочной кривой, созданной с помощью эталонного образца.

Способ эксклюзионной (SEC) ВЭЖХ

Системы ВЭЖХ Agilent 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) или Waters Bioalliance HPLC system (Waters Corporation, Milford, MA) обычно используются для эксклюзионного способа при определении концентрации белка. Используется типичная эксклюзионная колонка Superdex 200 производства GE (Superdex 200 10,300 GL, 10×300 мм, Cat # 17-5175-01 (GE Healthcare Lifesciences, Piscataway, NJ)). Общий протокол проведения анализа заключается в следующем:

1. Подготовка типичной подвижной фазы, которая содержит 400 мМ NaCl, 20 мМ Трис, pH 7,4 и 0,01% полисорбата 80.

2. Подвижная фаза пропусклась через систему ВЭЖХ и колонку до тех пор, пока не наблюдалось уравнивание.

3. Стандарты для установки соответствия системы пропускались через систему с типичным време-

нем 30 мин для каждого образца.

4. Образцы загружались в автосэмплер при температуре контрольной камеры 4°C.

5. Калибровочный стандарт известных концентраций, содержащий различное количество стандартных образцов, обычно от 1, 3, 5, 10 и 25 мкг белка, был загружен в колонку в объеме 10-50 мкл.

6. Образцы неизвестной концентрации загружались в колонки в типичных объемах 30-50 мкл.

7. Система ВЭЖХ была запрограммирована на запуск исследования образцов в автоматическом режиме, в соответствии с созданной последовательностью.

8. Площади пиков калибровочных стандартов и неизвестных образцов были определены на основе детекции флуоресценции при возбуждении и эмиссии на 280 и 340 нм соответственно.

9. С помощью линейной регрессии калибровочных стандартов была создана и определена с данной калибровочной кривой концентрация неизвестного образца.

Типичный пример профиля SEC калибровочных стандартов и линейной регрессии калибровочной кривой показан на фиг. 3.

Пример 6. Связывание с фактором фон Виллебранда

Фактор фон Виллебранда (ФВ) представляет собой многофункциональный гликопротеин, который циркулирует в плазме в форме многомерного комплекса с фактором VIII (комплекс FVIII/ФВ). Комплекс FVIII/ФВ служит для защиты связанного фактора VIII от раннего протеолиза в процессе его циркуляции *in vivo*.

Эксклюзионная хроматография (SEC) используется для характеристики связывания в комплексах FVIII/ФВ. Колонка Superose 6 (Superose 6 10/300GL, GE Healthcare # 17-5172-01, скорость потока = 0,5 мл/мин) была выбрана через ее известную биосовместимость и верхний предел исключения, равный 40 млн Дальтон (Формулировка буфера подвижной фазы: 2 mM CaCl₂, 10 mM Трис, pH 7,0, 300 mM NaCl, 0,01% PSB-80, 11 mM сахарозы, 10 mM тринатрийцитрата). Различие в молекулярной массе между фактором Виллебранда (димер @ ~ 500 кД, Fitzgerald Cat# 30C-CP4003U, Lot # A09121050, Мономер Мол. Вес = ~ 260 кД, конц. = 77 мкг/мл) и грFVIII (~ 160 кД) является достаточным для разделения двух видов.

Стехиометрию связывания определяли путем титрования постоянного количества фактора Виллебранда с увеличением количества грFVIII. Профиль комплексообразования между грFVIII и фактором Виллебранда определяли по хроматограмме SEC и интеграции соответствующих пиков. Растворимая форма полученных смесей в супернатанте использовалась для определения конечной точки комплексообразования при титровании с возрастающими количествами грFVIII. Большого размера стабильные комплексы, образованные между грFVIII и ФВ, переходили от нормального времени удерживания до предела исключения колонки. Когда было достигнуто насыщение, увеличение количества несвязанных грFVIII наблюдалось на хроматограмме SEC. Этот способ используется, чтобы отличить сходства и различия в свойствах вариантов.

Пример 7. Кинетика расщепления с помощью тромбина SDS-PAGE

Молекулы рекомбинантного свиного фактора VIII (грFVIII) являются гетеродимерами с массой примерно 160 кД, состоящими из легкой молекулярной цепи с весом 78,5 кД (A3-C1-C2, 765-1448) и тяжелой цепи с молекулярным весом в диапазоне от 86,7 кД (A1-A2). Тяжелая цепь грFVIII неоднородна и состоит из трех основных вариантов, которые образуются при ее секреции клеткой, и может быть расщеплена мембраносвязанными протеазами семейства субтилизины, называемыми PACE (Paired Basic Amino Acid Cleavage Enzyme - фермент расщепления парных основных аминокислот).

Подобно человеческому фактору VIII, грFVIII превращается в активную форму путем ограниченного протеолиза из тромбина. Тромбиновая активация грFVIII является специфической для сайта расщепления тяжелой цепи в позиции Arg(372)-Ser(373). Регион расщепления для легкой цепи в позиции Arg(805)-Ser(806) высвобождает небольшую фракцию из 40 аминокислотных пептидов в диапазоне от 765-804 (~4.4кД). Сочетание этих начальных расщеплений с помощью тромбина образует активированный рекомбинантный свиной фактор VIII в виде гетеротримера, состоящего из субъединиц, обозначенных как A1 (~ 50 кД), A2 (~ 40 кД) и A3-C1-C2 (~ 70 кД). Расщепленные A1 и A3-C1-C2 субъединицы грFVIII сохраняют двухвалентную ион металла-зависимую связь, в то время как субъединицы A2 слабо связаны с A1-A3-C1-C2 димером в основном за счет электростатических взаимодействий. В SDS-PAGE эти субъединицы отображаются как три отдельные полосы. Эффективность конверсии грFVIII (2 пептидные единицы) в три пептидные единицы характеризует тромбиновую активацию продукта. Этот способ отличается сходством и различается между отдельными вариантами.

Два других ортогональных способа могут быть (и были) использованы для сопоставления кинетики расщепления тромбином FVIII. Может использоваться денатурирующая ВЭЖХ с обращенной фазой; ожидаемые профили пиков напоминают SDS-PAGE. Также может использоваться метод анионообменной хроматографии, при котором сохраняется нативная форма пептидов.

ВЭЖХ с обращенной фазой

Оборудование

1. Оборудование для проведения ВЭЖХ серии 1100: Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA; Model No. 61312A, Serial No. DE10907753.

2. Колонка Poroshell 5 мкт 2,1×75 мм: Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA; Part No. 660750-909, Serial No. USW001988.

Реактивы

1. Буфер А: 0,1% водный раствор TFA (JT В Baker, Phillisburg, NJ; Cat No. 94700-00, Lot No. J23J00).
2. Буфер В: 0,1% раствор TFA в ацетонитриле (JT Baker, Phillisburg, NJ; Cat No. 9017-03, Lot No. J38807).

Процедура:

1. Колонка уравнивалась в течение 60 мин с использованием 99% А и 1% В при 1 мл/мин.
2. Объем вводимого образца составлял 50 мкл, 25 мкл эталонного стандарта использовали в качестве контроля.
3. Пример способа, используемого для тестирования образцов, показан в табл. 4.

Таблица 4

Введение	Время (мин)	Поток (мл/мин)	% А	% В
1	0,00	2	99	1
2	2,00	2	99	1
3	3,00	2	64	36
4	3,50	2	64	36
5	4,00	2	61	39
6	5,00	2	61	39
7	5,10	2	58	42
8	6,50	2	58	42
9	6,51	2	56	44
10	7,20	2	56	44
11	7,21	2	40	60
12	8,50	2	40	60
13	8,51	2	10	90
14	9,00	2	10	90
15	9,10	2	99	1
16	10,00	2	99	1

Анионообменная хроматография

Оборудование

1. Оборудование для проведения ВЭЖХ AllianceBio HPLC, Waters Corporation, Милфорд, Массачусетс, США; Модель № 2796; Serial No. M08BA1199M

2. Колонка Protein Pak Hi Res Q 5 мкм 4,6×100 мм: Waters Corporation, Milford, MA, USA; Part No. 186004931, Serial No. 502N112561VE04.

Реактивы

Буфер А:

- 10 мМ Трис-основание (1,211 г/л)
- 2 мМ хлорид кальция (0,588 г/л)
- 0,01% полисорбат 80 (1 мл 10%-PS-80/л)
- Очищенная вода - до 1 л, pH 7,0

Буфер В:

- 10 мМ Трис-основание (1,211 г/л)
- 2 мМ хлорид кальция (0,588 г/л)
- 0,01% полисорбат 80 (1 мл 10%-PS-80/ л)
- 1М хлорида натрия (58,44 г/л)
- Очищенная вода - до 1 л, pH 7,0

Процедура

1. Колонка уравнивалась в течение 60 мин с использованием 70% А и 30% В при 0,5 мл/мин.
2. Объем вводимого образца составлял 50 мкл, 10 мкл эталонного стандарта использовали в качестве контроля.
3. Пример способа, используемого для тестирования образцов, показан в табл. 5.

Таблица 5

Введение	Время (мин)	Поток (мл/мин)	% А	% В
1	0,01	0,5	70	30
2	0,50	0,5	70	30
3	3,50	0,5	60	40
4	5,00	0,5	60	40
5	10,00	0,5	30	70
6	10,10	0,5	1	99
7	12,00	0,5	1	99
8	12,10	0,5	70	30
9	17,00	0,5	70	30

Специалисту в данной области будет известно и понятно, что эти и другие способы используются, чтобы составить представление о рекомбинантных белках Фактора VIII, как описано здесь.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный рекомбинантный вариант фактора VIII (FVIII) с частично удаленным В-доменом и лишенный аминокислотной последовательности, соответствующей аминокислотным остаткам от 716 до 742 свиного FVIII на фиг. 2 или аминокислотным остаткам от 714 до 740 последовательности SEQ ID NO: 7, причем указанный вариант FVIII имеет последовательность SEQ ID NO: 1 и характеризуется повышенной активностью коагуляции по сравнению с известными продуктами FVIII.

2. Полинуклеотид, кодирующий вариант FVIII по п.1.

3. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п.2.

4. Клетка млекопитающего, содержащая вектор экспрессии по п.3.

5. Способ получения варианта FVIII по п.1, включающий следующие стадии:

а) культивирование клеток млекопитающих по п.4 и

б) выделение из клетки млекопитающего варианта FVIII.

6. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей вариант FVIII, включающий смешивание варианта FVIII, полученного способом по п.5, с соответствующими эксципиентами.

7. Фармацевтическая композиция для лечения гемофилии А, содержащая вариант FVIII по п.1.

8. Способ лечения пациента, страдающего гемофилией, включающий введение терапевтически эффективного количества варианта FVIII по п.1.

9. Способ по п.8, в котором указанная гемофилия является гемофилией А.

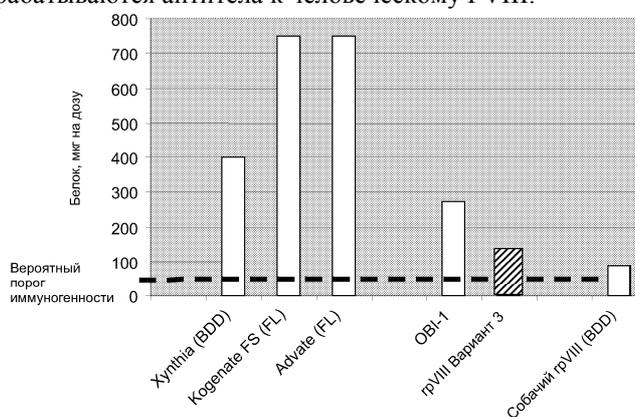
10. Способ по п.8, в котором указанная гемофилия является приобретенной гемофилией, при которой у пациентов вырабатываются антитела к человеческому FVIII.

11. Способ по любому из пп.8-10, в котором вариант FVIII вводят в количестве не более 200, или 150, или 140 мкг/дозу.

12. Применение варианта FVIII по п.1 в лечении гемофилии.

13. Применение по п.12, в котором указанная гемофилия является гемофилией А.

14. Применение по п.12, в котором указанная гемофилия является приобретенной гемофилией, при которой у пациентов вырабатываются антитела к человеческому FVIII.



Фиг. 1

	1		50
HUMFV8II	ATRRYYLGAV	ELSWDYMQSD .LGELPVDAR	FPPRVPKSFP FNTSVVYKKT
PIGFV8II	AIRRYYLGA	ELSWDYRQSE LLRELHVDTR	FPATAFGALP LGPSVLYKKT
MURFV8II	AIRRYYLGA	ELSWNYIQSD LLSVLHTDSR	FLPRMSTSPF FNTSIMYKKT
CANFV8II	ATRKYYLGAV	ELSWDYMQSD LLSALHADTS	FSSRVFGSLP LTTSVTYRKT
	51		100
HUMFV8II	LFVEFTDHLF	NIAKRPPPWM GLLGPTIQAE	VYDVTVVITLK NMASHPVSLH
PIGFV8II	VFVEFTDQLF	SVARPPPPWM GLLGPTIQAE	VYDVTVVITLK NMASHPVSLH
MURFV8II	VFVEYKQQLF	NIAKRPPPWM GLLGPTIWE	VHDTVVITLK NMASHPVSLH
CANFV8II	VFVEFTDDL	NIAKRPPPWM GLLGPTIQAE	VYDVTVVIVLK NMASHPVSLH
	101		150
HUMFV8II	AVGVSYWKAS	EGAAYDDQTS QREKEDDKVF	FGGSHTYVWQ VLKENGPMAS
PIGFV8II	AVGVSFWKSS	EGAAYEDHTS QREKEDDKVL	FGKSQTYVWQ VLKENGPTAS
MURFV8II	AVGVSYWKAS	EGDEXEDQTS QMEKEDDKVF	EGESHTYVWQ VLKENGPMAS
CANFV8II	AVGVSYWKAS	EGAAYEDQTS QKEKEDDNVI	EGESHTYVWQ VLKENGPMAS
	151		200
HUMFV8II	DPCLCLTYSYL	SHVDLVKDLN SGLIGALLVC	REGSLAKEKT QTLHKFILLF
PIGFV8II	DPCLCLTYSYL	SHVDLVKDLN SGLIGALLVC	REGSLTRERT QNLHEFVLLF
MURFV8II	DPCLCLTYSYM	SHVDLVKDLN SGLIGALLVC	KEGSLSKERT QMLYQFVLLF
CANFV8II	DPCLCLTYSYF	SHVDLVKDLN SGLIGALLVC	KEGSLAKERT QTLQEFVLLF
	201		250
HUMFV8II	AVFDEGKSWH	SETKNSLMQD RDAASARAWP	KMHTVNGYVN RSLPGLIGCH
PIGFV8II	AVFDEGKSWH	SARNDSWTRA MDPAPARAQP	AMHTVNGYVN RSLPGLIGCH
MURFV8II	AVFDEGKSWH	SETNDSYTQS MDSASARDWP	KMHTVNGYVN RSLPGLIGCH
CANFV8II	AVFDEGKSWH	SETNASLTQ.AEAQH	ELHTINGYVN RSLPGLTVCH
	251		300
HUMFV8II	RKSVYWHVIG	MGTTPPEVHSI FLEGHTFLVR	NHRQASLEIS PITFLTAQTL
PIGFV8II	RKSVYWHVIG	MGTSPPEVHSI FLEGHTFLVR	HHRQASLEIS PLTFLTAQTF
MURFV8II	RKSVYWHVIG	MGTTPPEIHSI FLEGHTFFVR	NHRQASLEIS PITFLTAQTL
CANFV8II	RKSVYWHVIG	MGTTPPEVHSI FLEGHTFLVR	NHRQASLEIS PITFLTAQTF
	301		350
HUMFV8II	LMDLGQFLLF	CHISSHQHDG MEAYVKVDSC	FEEPQLRMK. NNEEAEDYDD
PIGFV8II	LMDLGQFLLF	CHISSHHHGG MEAHVRVESC	AEEPQLRRK. ADEE.EDYDD
MURFV8II	LIDLQQLLF	CHISSHKHDG MEAYVKVDSC	FEESQWQKKN NNEEMEDYDD
CANFV8II	LMDLGQFLLF	CHIPSHQHDG MEAYVKVDSC	FEEPQLRMK. NNED.KDYDD
	351		400
HUMFV8II	DLTDSEMDVV	RFDDDNSPSP IQIRSVAKKH	EKTWVHYIAA EEEDWDYAPL
PIGFV8II	NLYDSMDVV	RLDGDVSPF IQIRSVAKKH	EKTWVHYISA EEEDWDYAPA
MURFV8II	DLY.SEMDMF	TLDYD.SSPF IQIRSVAKKY	EKTWVHYISA EEEDWDYAPS
CANFV8II	GLYDSMDVV	SFDDSSSPF IQIRSVAKKH	EKTWVHYIAA EEEDWDYAPS
	401		450
HUMFV8II	VLAPDDRSYK	SQYLNGPQR IGRKYKRVF	MAYTDETFKT REAIQESGI
PIGFV8II	VPSPSDRSYK	SLYLSNGPQR IGRKYKRVF	VAYTDETFKT RKAIPYESGI
MURFV8II	VPTSDNGSYK	SQYLSNGPQR IGRKYKRVF	IAYTDETFKT RETIQHESGL
CANFV8II	GTPPNDRSHK	NLYLNGPQR IGRKYKRVF	VAYTDETFKT REAIQYESGI
	451		500
HUMFV8II	LGPLLYGEVG	DTLLIIFKNQ ASRPYNIYPH	GITDVRPLYS RRLPKGVKHL
PIGFV8II	LGPLLYGEVG	DTLLIIFKNK ASRPYNIYPH	GITDVSALHP GRLLKGWKHL
MURFV8II	LGPLLYGEVG	DTLLIIFKNQ ASRPYNIYPH	GITDVSPLHA RRLPRGIKHV
CANFV8II	LGPLLYGEVG	DTLLIIFKNQ ASRPYNIYPH	GINYVTPLHT GRLPKGVKHL
	501		550

Фиг. 2а

HUMFVIII	KDFPILPGEI	FKYKWTVTVE	DGPTKSDPRC	LTRYSSSFVN	MERDLASGLI
PIGFVIII	KDMPILPGET	FKYKWTVTVE	DGPTKSDPRC	LTRYSSSSIN	LEKDLASGLI
MURFVIII	KDLPILPGEI	FKYKWTVTVE	DGPTKSDPRC	LTRYSSSFVN	PERDLASGLI
CANFVIII	KDMPILPGEI	FKYKWTVTVE	DGPTKSDPRC	LTRYSSSFVN	LERDLASGLI
	551				600
HUMFVIII	GPLLICYKES	VDQRGNQIMS	DKRNVLFSV	FDENRSWYLT	ENIQRFLEPN
PIGFVIII	GPLLICYKES	VDQRGNQMMS	DKRNVLFSV	FDENQSWYLA	ENIQRFLEPN
MURFVIII	GPLLICYKES	VDQRGNQMMS	DKRNVLFSI	FDENQSWYIT	ENMQRFLEPNA
CANFVIII	GPLLICYKES	VDQRGNQMMS	DKRNVLFSV	FDENRSWYLT	ENMQRFLEPNA
	601				650
HUMFVIII	AGVQLEDPEF	QASNIMHSIN	GYVFDLQLS	VCLHEVAYWY	ILSIGAQTDF
PIGFVIII	DGLQPQDPEF	QASNIMHSIN	GYVFDLQLS	VCLHEVAYWY	ILSVGAQTDF
MURFVIII	AKTQPQDPEF	QASNIMHSIN	GYVFDLQLS	VCLHEVAYWH	ILSVGAQTDF
CANFVIII	DVVQPHDPEF	QLSNIMHSIN	GYVFDNLQLS	VCLHEVAYWY	ILSVGAQTDF
	651				700
HUMFVIII	LSVFFSGYTF	KHKMVEYEDTL	TLFFFSGETV	FMSMENPGLW	ILGCHNSDFR
PIGFVIII	LSVFFSGYTF	KHKMVEYEDTL	TLFFFSGETV	FMSMENPGLW	VLGCHNSDLR
MURFVIII	LSIFFSGYTF	KHKMVEYEDTL	TLFFFSGETV	FMSMENPGLW	VLGCHNSDFR
CANFVIII	LSVFFSGYTF	KHKMVEYEDTL	TLFFFSGETV	FMSMENPGLW	VLGCHNSDFR
	701				750
HUMFVIII	NRGMTALLKV	SSCDK NTGDY	YEDSYEDISA	YLLSKNNAIE	PR
PIGFVIII	NRGMTALLKV	YSCDR DIGDY	YDNTYEDTIPG	FLLSGKNVIE	PR
MURFVIII	NRGMTALLKV	SSCDK STSDY	YETIYEDTIP	OLVNENNVID	PR
CANFVIII	NRGMTALLKV	SSCN RIDDY	YEDTYEDTIP	PLLNENNVIK	PR
	751				800
HUMFVIII	STK QKQFNA	TTIPENDIEK	TDPWFARHTP	MPKIQNVSSS	DLLMLLQGS.
PIGFVIII	SAS QKQFQT	ITSPEDDVE.	LDPQSGERTQ	ALEELSVPSG	DGSMLLGQN.
MURFVIII	NTR KKKFKD	STIPKNDMEK	IEPQFEETAE	MLKVQSVSVS	DMLMLLGQSH
CANFVIII	STK EKQKKA	TTTPENDIEK	IDLQSGERTQ	LKAQSVSSS	DLLMLLQGN.
	801				850
HUMFVIII	PTPHGLSLSD	LQEAKYETFS	DDPSPGAIDS	NNSLSEMTHE	RPQLHHSGDM
PIGFVIII	PAPHGSSSSD	LQEARNE..A	DDYLPGARER	NTAPSAARL	RPELHHSAR
MURFVIII	PTPHGLFLSD	GQEAIEAIEH	DDHSPNAIDS	NEGFSKVTQL	RPESHHSEKI
CANFVIII	PTPRGLFLSD	LREA..TDRA	DDHSRGAIER	NRGPEVASL	RPELRHSEDR
	851				900
HUMFVIII	VFTPEGLQL	RLNEKLGTTA	ATELKKLDFK	VSSTSNLI.	.STIPSDNLA
PIGFVIII	VLTPEPE.KELKKLDSK	MSSSDLLKT	SPTIPSDTLS
MURFVIII	VFTPQGLQL	RSNKSLETTI	EVKWKGLGLQ	VSSLPSNLMT	.TTILSDNLK
CANFVIII	EFTPEPELQL	RLNENLGTNT	TVELKKLCLK	ISSSDSLMT	SPTIPSDKLA
	901				950
HUMFVIII	AGTDNTSSLG	PFSMPVHYDS	QLDTTLFGKK	SSPLTESGGP	LSSLSENNDS
PIGFVIII	AETERTHSLG	PPHPQVNFNS	QLGAIVLGKN	SSHFIGAGVP	LGSTEED...
MURFVIII	ATFEKTDSSG	FPDMPVHSSS	KLSTTAFGKK	AYSLVGSHPV	LNAGEENSDS
CANFVIII	AATEKTGSLG	PFNMSVHFNS	HLGTIVFGNN	SSHLIQSGVP	LELSEEDNDS
	951				1000
HUMFVIII	KLLESGLMNS	QESSWGKNVS	STESGRLFKG	KRAHGPAALLT	KDNALFKVSI
PIGFVIII	HESSLGENVS	PVESDGIFEK	ERAHGPAASLT	KDDVLFKVNI
MURFVIII	NILDSTLMYS	QESLPRDNIL	SIENDRLRE	KRFHGIALLT	KDNTLFDKDNV
CANFVIII	KLEAPLMNI	QESSLRENVL	SMESNRLFKE	ERIRGPAALI	KDNALFKVNI

Фиг. 2b

	1001		1050
HUMFVIII	<u>SLLKTNKTSN NSATNRKTHI DGPSLLIENS PSVWQNI.LE SDTEFKKVT</u>		
PIGFVIII	<u>SLVKTNKARV YLKTNRKIHI DDAALLTENR ASA.....</u>		
MURFVIII	<u>SLMKTNKTYN HSTTNEKLHT ESPT.SIENS TTDLQDAILK VNSEIQEVTA</u>		
CANFVIII	<u>SSVKTNRAPV NLTNRKTRV AIPTLLIENS TSVWQDIMLE RNTEFEKVT</u>		
	1051		1100
HUMFVIII	<u>LIHDRMLMDK NATALRLNHM SNKTTSSKNM EMVQKKEGP IPPDAQNPDM</u>		
PIGFVIII	<u>.....TFMDK NTTASGLNHV SN.....</u>		
MURFVIII	<u>LIHDGTLGK NSTYLRLNHM LNR'TSTKNK DIFHRKDEDP IPQDEENTIM</u>		
CANFVIII	<u>LIHNETFMDR NTTALGLNHV SNKTTLSKNV EMAHQKEDP VPLRAENPDL</u>		
	1101		1150
HUMFVIII	<u>SFFKMLFLPE SARWIQRTHG KNSLNSGQGP SPKQLVSLGP EKSVEGQNFL</u>		
PIGFVIII	<u>.....WIKGPLG KNPLSSSERGP SFPELLTSSGS GKSVKQSSG</u>		
MURFVIII	<u>PFSKMLFLSE SSNWFKKTNG NNSLNSEQEH SPKQLVYLMF KKYVKNQSF</u>		
CANFVIII	<u>SSSKIPFLPD WI....KTHG KNSLSSEQRP SPKQLTSLGS EKSVDQNFL</u>		
	1151		1200
HUMFVIII	<u>SEKNKVVVGG GEFTKDVGLK EMVFPSSRNL FLTNDNLHE NNTHNQEKKI</u>		
PIGFVIII	<u>QGRIRVAVEE EELSKG...K EMMLPNSLT FLTNSADVQG NDTHSQGKS</u>		
MURFVIII	<u>SEKNKVVEQ DGF'TKNIGLK DMAFPHNMSI FLTTLNVHE NGRHNQEKNI</u>		
CANFVIII	<u>SE.EKVVVGE DEFTKDTLQ E.IF'PNKSI FFANLANVQE NDTYNQEKKS</u>		
	1201		1250
HUMFVIII	<u>QEEIEKKETL IQENVVLPQI HVTGTKNFM KNLFLLSTRQ NVEGSYDGAY</u>		
PIGFVIII	<u>REEMERREKL VQEKVDLPQV YTATGTKNFL RNIFHQSTEP SVEGFDGGSH</u>		
MURFVIII	<u>QEEIE.KEAL IEEKVVLPQV HEATGSKNFL KDILILGTRQ NISLYE..VH</u>		
CANFVIII	<u>PEEIERKEKL TQENVALPQA HTMIGTKNFL KNLFLLSTKQ NVAGLEEQPY</u>		
	1251		1300
HUMFVIII	<u>APVLQDFRSL NDS'TNRKTH TAHSKKG.. EENLEGLGN QTKQIVEKYA</u>		
PIGFVIII	<u>APVQDSRSL NDSAERAETH IAHS'AIR.. EEAPLEAPGN RT.....</u>		
MURFVIII	<u>VPVLQNITSI NNS'TNTVQIH MEHF'KRRKD KETNSEGLVN K'TREMVKNY.</u>		
CANFVIII	<u>TPILQDTRSL NDS'PHSEGIH MANFSKIR.. EENLEGLGN QTNQMVERFP</u>		
	1301		1350
HUMFVIII	<u>CTTRISPNTS QONFV'TORSK RALKQFRLPL EETELEKRII VDDTSTQWSK</u>		
PIGFVIII	<u>.....GPG PRSAVPRVK QSLKQIRLPL EEIKPERGVV LNATSTRWS.</u>		
MURFVIII	<u>.....PS QKNIT'TORSK RALGQFRL..STQWLK</u>		
CANFVIII	<u>STTRMSSNAS QH.VITQRGK RSLKQPRLSQ GEIKFERKVI ANDTSTQWSK</u>		
	1351		1400
HUMFVIII	<u>NMKHLTPSTL TQIDYNEKEK GAITQSPLSD CLTRSHSIQ ANRSPLPIAK</u>		
PIGFVIII	<u>.....</u>		
MURFVIII	<u>TINCSTQCII KQIDHSKEMK KFITKSSLSQ SSVIK.STTQ TNSSDSSHIVK</u>		
CANFVIII	<u>NMNYLAQGTL TQIEYNEKEK RAITQSPLSD CSMRNHVITQ MNDSALPVAK</u>		
	1401		1450
HUMFVIII	<u>VSSFPSIRPI YLTRVLFQDN SSHLPAAS..YRKKDSGV QESSHFLOGA</u>		
PIGFVIII	<u>.....ESSPILQGA</u>		
MURFVIII	<u>TSAFP...PI DLKRSPFQNK FSHVQASSYI YDFKTKSSRI QESNNFLKET</u>		
CANFVIII	<u>ESASPSVRHT DLTKIPSQHN SSHLPASACN YTFRERTSGV QEGSHFLOEA</u>		
	1451		1500
HUMFVIII	<u>KNNLSLAIL TLEMTGDQRE VGSLGTSATN SVTYKKVENT VLPKPDLPKT</u>		
PIGFVIII	<u>KRNNLSL'PFL TLEMAGGQGK ISALGKSAAG PLASGKLEKA VLSSAGLSEA</u>		
MURFVIII	<u>KINNFSLAIL PWNMFIDQGK FTSPGKSNTN SVTYKKRENI IFLKPTLPEE</u>		
CANFVIII	<u>KRNNLSLAFV TLGITEGQGK FSSLGKSATN QPMYKKLENT VLLQPLSET</u>		
	1501		1550

Фиг. 2с

HUMFVIII	SGKVLELLPKV HIYQKDLFPT ETSNGSPGHL DLVEGSLLOQ TEGAIKWNEA	
PIGFVIII	SGKAEFLPKV RVHREDLLPQ KTSNVSCAAG DLGQEIFLQK TRGPNVNLNKV	
MURFVIII	SGKIELLPQV SIQEEELPPT ETSNGSPGHL NLMKEVFLQK IQGPTKWNKA	
CANFVIII	SDKVELLSQV HVDQEDSFPT KTSNDSPGHL DLMGKIFLQK TQGPVKMNKT	
	1551	1600
HUMFVIII	NRPGKVPFLR VATESSAKTP SKLLDPLAWD NHYGTQIPKE EWKSQEKSPF	
PIGFVIII	NRPG.....RTP SKLLGPPM.....PK EWESLEKSPK	
MURFVIII	KRHGES..IK GKTESSKNTR SKLLNHHAWD YHYAAQIPKD MWKSKEKSPF	
CANFVIII	NSPGKVPFLK WATESSEKIP SKLLGVLAWD NHYDTQIPSE EWKSQKKSQT	
	1601	1650
HUMFVIII	KTAFKKKDTI .LSLNACESN HAIAAINEGO NKPEIEVTWA KQGRTERLC	
PIGFVIII	STALRTKDI SLPLDRHESN HSIAAKNEGO AETQREAAWT KGGPGRLC	
MURFVIII	IISIKQEDTI .LSLRPHGNS HSIGA.NEKO NWPQRETTWV KOGQTQRTC	
CANFVIII	NTAFKRKDTI .LPLGPCENN DSTAAINEGO DKPQREAMWA KOGEPGRLC	
	1651	1700
HUMFVIII	QNEFVLRHHO REITRTTLOS DQEEIDYDDT ISVEMKKEDF DIYDEDENQS	
PIGFVIII	QNEFVLRHHO FDISLPTFQP EEDKMDYDDI FSTETKGEDE FDIYGEDENQD	
MURFVIII	QNEFVLRHHO RELS..AFQS EQEATDYDDA ITIETI.EDF DIYSEDIKQG	
CANFVIII	QNEFVSKHHO REITVTTLQP EEDKFEYDDT FSIEMKREDF DIYGDYENQG	
	1701	1750
HUMFVIII	PRSFQKTRH YFIAAVERLW DYGMSSSPHV LRNRAQSGSV PQFKKVVVQE	
PIGFVIII	PRSFQKTRH YFIAAVEQLW DYGMSESPRA LRNRAQNGEV PRFKKVVVRE	
MURFVIII	PRSFQKTRH YFIAAVERLW DYGMSTS.HV LRNRYQSDNV PQFKKVVVQE	
CANFVIII	LRSFQKTRH YFIAAVERLW DYGMRSRPHI LRNRAQSGDV QQFKKVVVQE	
	1751	1800
HUMFVIII	FTDGSFTQPL YRGELNEHLG LLGPYIRAEV EDNIMVTFRN QASRPYSFYS	
PIGFVIII	FADGSFTQPS YRGELNKHLG LLGPYIRAEV EDNIMVTFKN QASRPYSFYS	
MURFVIII	FTDGSFSQPL YRGELNEHLG LLGPYIRAEV EDNIMVTFKN QASRPYSFYS	
CANFVIII	FTDGSFTQPL YRGELNEHLG LLGPYIRAEV EDNIVVTFKN QASRPYSFYS	
	1801	1850
HUMFVIII	SLISYEEDQR QGAEPKRFV KPNETKIYFW KVQHMAPTK DEFDCWAY	
PIGFVIII	SLISYPDDQE QGAEPRHNFV QPNETRIYFW KVQHMAPTE DEFDCWAY	
MURFVIII	SLISYKEDQ. RGEPRRNFV KPNETKIYFW KVQHMAPTE DEFDCWAY	
CANFVIII	SLISYDEDEG QGAEPKRFV NPNETKIYFW KVQHMAPTK DEFDCWAY	
	1851	1900
HUMFVIII	FSDVDLEKDV HSGLIGPLLV CHTNTLPAH GRQVTVQEFA LFFTIFDETK	
PIGFVIII	FSDVDLEKDV HSGLIGPLLI CRANTLNAAH GRQVTVQEFA LFFTIFDETK	
MURFVIII	FSDVDLERDM HSGLIGPLLI CHANTLPAH GRQVSVQEFA LFFTIFDETK	
CANFVIII	FSDVDLEKDV HSGLIGPLLI CRSNTLPAH GRQVTVQEFA LVFTIFDETK	
	1901	1950
HUMFVIII	SWYFTENMER NCRAPCNIQM EDPTFKENYR FHAINGYIMD TLPGLVMAOD	
PIGFVIII	SWYFTENVER NCRAPCHLQM EDPTLKENYR FHAINGYVMD TLPGLVMAQN	
MURFVIII	SWYFTENVKR NCKTPCNFQM EDPTLKENYR FHAINGYVMD TLPGLVMAQD	
CANFVIII	SWYFTENLER NCRAPCNVQK EDPTLKENFR FHAINGYVKD TLPGLVMAQD	
	1951	2000
HUMFVIII	QRIRWYLLSM GSNENIHSIH FSGHVFTVRK KEEYKMALYN LYPGVFETVE	
PIGFVIII	QRIRWYLLSM GSNENIHSIH FSGHVFSVRK KEEYKMAVYN LYPGVFETVE	
MURFVIII	QRIRWYLLSM GNNENIQSIH FSGHVFTVRK KEEYKMAVYN LYPGVFETLE	
CANFVIII	QKVRWYLLSM GSNENIHSIH FSGHVFTVRK KEEYKMAVYN LYPGVFETVE	
	2001	2050
HUMFVIII	MLPSKAGIWR VECLIGEHLH AGMSTLFLVY SNKQOTPLGM ASGHIRDFQI	

Фиг. 2d

PIGFVIII MLPSKVGIWR IECLIGEHLQ AGMSTFLVY SKECQAPLGM ASGRIRDFQI
 MURFVIII MIPSRAGIWR VECLIGEHLQ AGMSTFLVY SKQCQIPLGM ASGIRDFQI
 CANFVIII MLPSQVGIWR IECLIGEHLQ AGMSTFLVY SKKCQIPLGM ASGHIRDFQI

2051 2100
 HUMFVIII TASGQYGQWA PKLARLHYSG SINAWSTKEP FSWIKVDLLA PMIIHGIKTQ
 PIGFVIII TASGQYGQWA PKLARLHYSG SINAWSTKDP HSWIKVDLLA PMIIHGIMTQ
 MURFVIII TASGHYGQWA PNLARLHYSG SINAWSTKEP FSWIKVDLLA PMIVHGIKTQ
 CANFVIII TASGQYGQWA PKLARLHYSG SINAWSTKDP FSWIKVDLLA PMIIHGIMTQ

2101 2150
 HUMFVIII GARQKFSSLY ISQFIIMYSL DGKKWQTYRG NSTGTLMVFF GNVDSGGIKH
 PIGFVIII GARQKFSSLY ISQFIIMYSL DGRNWQSYRG NSTGTLMVFF GNVDSGGIKH
 MURFVIII GARQKFSSLY ISQFIIMYSL DGKKWLSYQG NSTGTLMVFF GNVDSGGIKH
 CANFVIII GARQKFSSLY VSQFIIMYSL DGNKWHYSRG NSTGTLMVFF GNVDSGGIKH

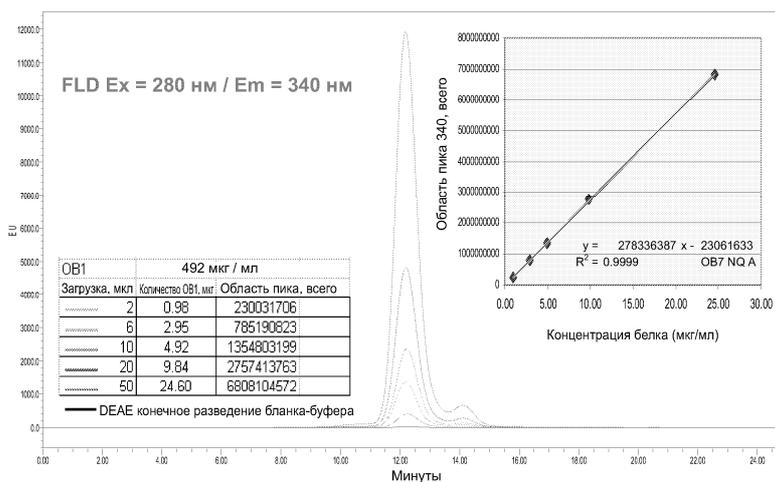
2151 2200
 HUMFVIII NIFNFPPIAR YIRLHPHYS IRSTLRMELM GCDLNCSMP LGMESKAISD
 PIGFVIII NIFNFPPIVAR YIRLHPHYS IRSTLRMELM GCDLNCSMP LGMQNKAISD
 MURFVIII NSFNFPPIAR YIRLHPHYS IRSTLRMELM GCDLNCSIP LGMESKVISD
 CANFVIII NIFNFPPIAQ YIRLHPHYS IRSTLRMELL GCDFNCSMP LGMESKAISD

2201 2250
 HUMFVIII AQITASSYFT NMFATWSPSK ARLHLQGRSN AWRPQVNNPK EWLQVDFQKT
 PIGFVIII SQITASSHLS NIFATWSPSQ ARLHLQGRTN AWRPRVSSAE EWLQVDLQKT
 MURFVIII TQITASSYFT NMFATWSPSQ ARLHLQGRTN AWRPQVNDPK QWLQVDLQKT
 CANFVIII AQITASSYLS SMLATWSPSQ ARLHLQGRTN AWRPQANNPK EWLQVDFRKT

2251 2300
 HUMFVIII MKVTGVTTQG VKSLLTSMYV KEFLISSSQD GHQWTLFFQN GKVKVFQGNQ
 PIGFVIII VKVTGITTTQ VKSLLSSMYV KEPLVSSSQD GRRWTLFLQD GHTKVFQGNQ
 MURFVIII MKVTGITTTQ VKSLFTSMFV KEFLISSSQD GHHWTQILYN GKVKVFQGNQ
 CANFVIII MKVTGITTTQ VKSLLISMYV KEFLISSSQD GHNWTLFLQN GKVKVFQGNR

2301 2345
 HUMFVIII DSSTFPVNSL DPPLLTRYLR IHPQSWHQI ALRMEVLGCE AQDLY
 PIGFVIII DSSTFPVNAL DPPLFTRYLR IHPTSWAQHI ALRLEVLGCE AQDLY
 MURFVIII DSSTFMMNSL DPPLLTRYLR IHPQIWEHQI ALRLEILGCE AQQQY
 CANFVIII DSSTFVRNRL EPPLVARYVR LHPQSWAHHI ALRLEVLGCD TQQPA

Фиг. 2е



Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2