

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038618**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.09.23

(21) Номер заявки
201691109

(22) Дата подачи заявки
2010.12.06

(51) Int. Cl. *A61K 38/37* (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)

(54) ХИМЕРНЫЕ И ГИБРИДНЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ ФАКТОРА VIII-FC И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 61/267,070; 61/285,054; 61/301,592;
61/363,065; 61/373,113; 61/410,929;
61/419,676

(32) 2009.12.06; 2009.12.09; 2010.02.04;
2010.07.09; 2010.08.12; 2010.11.07;
2010.12.03

(33) US

(43) 2017.01.30

(62) 201290443; 2010.12.06

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

(72) Изобретатель:
**Дьюмонт Дженнифер А., Лоу Сьюзен,
Битонти Алан Дж., Пирс Гленн, Люк
Элвин, Цзян Хайянь, Маккинни
Байрон, Оттмер Мэтт, Зоммер Юрг,
Ньюджент Карен, Ли Лиан, Питерс
Роберт (US)**

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

(56) DUMONT Jennifer A. et al. Factor VIII-
Fc Fusion Protein Shows Extended Half-Life and
Hemostatic Activity in Hemophilia A Dogs. Blood, 20
November 2009, Vol. 114, Issue 22, abstract 545
EA-B1-12566
BY-C1-8372

(57) Изобретение направлено на создание способов введения фактора VIII; способов введения химерных и гибридных полипептидов, содержащих фактор VIII; химерных и гибридных полипептидов, содержащих фактор VIII; полинуклеотидов, кодирующих такие химерные и гибридные полипептиды; клеток, содержащих такие полинуклеотиды; и способов получения таких химерных и гибридных полипептидов с применением таких клеток.

B1**038618****038618****B1**

Область техники

Настоящее изобретение относится в основном к области терапии гемостатических нарушений.

Уровень техники

Гемофилия А является сцепленным с X-хромосомой геморрагическим нарушением, вызванным мутациями и/или делециями в гене фактора VIII (FVIII), которые приводят к недостаточной активности FVIII (Peyvandi et al., 2006). Данное заболевание характеризуется спонтанным кровоизлиянием и избыточным кровотечением после травмы. С течением времени повторяющееся кровоизлияние в мышцы и суставы, которое часто начинается в раннем детстве, приводит к гемофилической артропатии и необратимому повреждению суставов. Это повреждение прогрессирует и может привести к существенному ограничению подвижности суставов, мышечной атрофии и хронической боли (Rodriguez-Merchan, E.C., Semin. Thromb. Hemost. 29:87-96 (2003), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки).

Домен A2 необходим для прокоагуляционной активности молекулы фактора VIII. Исследования показывают, что фактор VIII свиньи обладает в 6 раз более высокой прокоагуляционной активностью, чем фактор VIII человека (Lollar, P., and E. T Parker, J. Biol. Chem. 266:12481-12486 (1991)), и что различие уровней коагуляционной активности фактора VIII человека и свиньи, по-видимому, обусловлено различием аминокислотной последовательности между одним или несколькими остатками в составе доменов A2 человека и свиньи (Lollar, P., et al., J. Biol. Chem. 267:23652-23657 (1992)), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки.

Лечение гемофилии А заключается в заместительной терапии, нацеленной на восстановление активности FVIII до 1-5% от нормальных уровней с целью предотвращения спонтанного кровотечения (Mannucci, P.M., et al., N. Engl. J. Med. 344:1773-1779 (2001), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки). Имеются продукты, представляющие собой получаемый из плазмы или рекомбинантный FVIII, которые доступны для лечения эпизодов кровотечения в случае необходимости или для предотвращения возникновения эпизодов кровотечения с помощью профилактического лечения. Исходя из периода полувыведения этих продуктов, режимы лечения требуют частого внутривенного введения. Такое частое введение болезненно и доставляет неудобства.

Снижение смертности, предотвращение повреждения суставов и улучшение качества жизни являются важными достижениями, которые стали возможны благодаря разработке способов получения FVIII из плазмы и рекомбинантного FVIII. Более длительная защита от кровотечения была бы еще одним ключевым этапом улучшения лечения пациентов с гемофилией А. Однако до настоящего времени не разработаны продукты, которые позволили бы обеспечить более длительную защиту. Следовательно, остается потребность в улучшении способов лечения гемофилии, вызванной дефицитом фактора VIII, которые будут лучше переносимы и более эффективны, чем имеющиеся сейчас способы терапии.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение направлено на создание способов введения фактора VIII; способов введения химерных полипептидов, содержащих фактор VIII, и гибридов таких химерных полипептидов; химерных полипептидов, содержащих фактор VIII, и гибридов таких химерных полипептидов; полинуклеотидов, кодирующих такие химерные и гибридные полипептиды; клеток, содержащих такие полинуклеотиды; и способов получения таких химерных и гибридных полипептидов с применением таких клеток.

Настоящее изобретение направлено на создание способа введения фактора VIII субъекту, которому это необходимо, включающего введение субъекту терапевтической дозы химерного полипептида фактора VIII, например, химерного полипептида Фактора VIII-Fc, с интервалом между введениями доз, по меньшей мере, примерно в полтора раза более длинным, чем интервал между введениями доз, необходимый для эквивалентного количества указанного фактора VIII без части молекулы, не принадлежащей фактору VIII (полипептида, состоящего из части, соответствующей указанному фактору VIII), например, без части, соответствующей Fc.

Интервал между введениями доз может быть, по меньшей мере, примерно в полтора - шесть раз длиннее, в полтора - пять раз длиннее, в полтора - четыре раза длиннее, в полтора - три раза длиннее или в полтора - два раза длиннее, чем интервал между введениями доз, необходимый для эквивалентного количества указанного фактора VIII без части молекулы, не принадлежащей фактору VIII (полипептида, состоящего из части, соответствующей указанному фактору VIII), например, без части, соответствующей Fc. Интервал между введениями доз может быть, по меньшей мере, примерно в полтора, два, два с половиной, три, три с половиной, четыре, четыре с половиной, пять, пять с половиной или шесть раз длиннее, чем интервал между введениями доз, необходимый для эквивалентного количества указанного фактора VIII без части молекулы, не принадлежащей фактору VIII (полипептида, состоящего из части, соответствующей указанному фактору VIII), например, без части, соответствующей Fc. Интервал между введениями доз может составлять каждые пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать или четырнадцать дней или более.

Интервал между введениями доз может составлять, по меньшей мере, примерно от полутора до 5, полтора, 2, 3, 4 или 5 дней или более.

Настоящее изобретение также направлено на создание способа введения фактора VIII субъекту, которому это необходимо, включающего введение субъекту терапевтической дозы химерного полипептида фактора VIII, например, химерного полипептида фактора VIII-Fc, с достижением значения площади под кривой зависимости концентрации в плазме от времени (AUC), по меньшей мере, примерно в один с четвертью раза более высокого, чем AUC, полученный при применении эквивалентного количества указанного фактора VIII без части молекулы, не принадлежащей фактору VIII (полипептида, состоящего из части, соответствующей указанному Фактору VIII), например, без части, соответствующей Fc.

Настоящее изобретение также направлено на создание способа введения фактора VIII субъекту, которому это необходимо, включающего введение субъекту терапевтической дозы полипептида, включающего фактор VIII и Fc, с интервалом между введениями доз, составляющим примерно каждые пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать или четырнадцать дней или более.

Способы по изобретению могут применяться на практике к субъекту, которому это необходимо, в ходе профилактического лечения или лечения по необходимости.

Лечение по необходимости включает лечение при эпизоде кровотечения, гемартрозе, кровоизлиянии в мышцу, кровоизлиянии в ротовую полость, кровотечении, кровотечении в мышцах, кровотечении в ротовую полость, травме, травме головы, кровотечении в желудочно-кишечном тракте, внутричерепном кровотечении, внутрибрюшном кровотечении, внутригрудном кровотечении, переломе кости, кровоизлиянии в центральной нервной системе, кровотечении в заглоточной области, кровотечении в забрюшинной области или кровотечении во влагалище подвздошно-поясничной мышцы. Субъекту может быть необходима хирургическая профилактика, периоперационное лечение или лечение повреждений, возникших при проведении хирургического вмешательства. Такие хирургические операции включают, например, малое хирургическое вмешательство, обширное оперативное вмешательство, удаление зуба, удаление миндалин, грыжесечение паховой грыжи, синовэктомию, полную замену коленного сустава, краниотомию, остеосинтез, хирургическое вмешательство при травме, внутричерепное хирургическое вмешательство, внутрибрюшное хирургическое вмешательство, внутригрудное хирургическое вмешательство или хирургическую замену сустава.

В случае лечения по необходимости интервал между введениями доз указанного химерного полипептида составляет примерно один раз каждые 24-36, 24-48, 24-72, 24, 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, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 или 72 ч или более длинный интервал.

Терапевтические дозы, которые могут применяться в способах по изобретению, составляют от примерно 10 до примерно 100 МЕ/кг, в частности, примерно 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90 или 90-100 МЕ/кг, и более конкретно, примерно 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 МЕ/кг.

Терапевтические дозы, которые могут применяться в способах по изобретению, составляют от примерно 10 до примерно 150 МЕ/кг, в частности, примерно 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150 МЕ/кг, и более конкретно, примерно 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 или 150 МЕ/кг.

Субъект в способах по изобретению может являться человеком или млекопитающим, отличным от человека. Млекопитающие, отличные от человека, включают, например, мышей, собак, приматов, обезьян, кошек, лошадей, коров, свиней и других домашних животных и мелких животных. Определение интервала между введениями доз и AUC может быть проведено для одного субъекта или в популяции субъектов.

Фактор VIII (или соответствующая фактору VIII часть химерного полипептида) может являться фактором VIII человека или фактором VIII организма, отличного от человека, например, фактором VIII свиньи, мыши или собаки. Фактор VIII (или соответствующая фактору VIII часть химерного полипептида) может иметь полную или частичную делецию домена B.

Фактор VIII (или соответствующая фактору VIII часть химерного полипептида) может быть по меньшей мере на 90 или 95% идентичен аминокислотной последовательности фактора VIII, приведенной в табл. 2, без сигнальной последовательности (аминокислоты с 1 по 1438 в составе SEQ ID NO: 2; аминокислоты с 1 по 2332 в составе SEQ ID NO: 6; аминокислоты с 1 по 740 в составе SEQ ID NO: 8; аминокислоты с 1 по 745 в составе SEQ ID NO: 10; или аминокислоты с 1 по 684 в составе SEQ ID NO: 12). Фактор VIII (или соответствующая фактору VIII часть химерного полипептида) может быть идентичен аминокислотной последовательности фактора VIII, приведенной в табл. 2, без сигнальной последовательности (аминокислоты с 1 по 1438 в составе SEQ ID NO: 2; аминокислоты с 1 по 2332 в составе SEQ ID NO: 6; аминокислоты с 1 по 740 в составе SEQ ID NO: 8; аминокислоты с 1 по 745 в составе SEQ ID NO: 10; или аминокислоты с 1 по 684 в составе SEQ ID NO: 12).

Фактор VIII (или соответствующая фактору VIII часть химерного полипептида) может быть по меньшей мере на 90 или 95% идентичен аминокислотной последовательности фактора VIII, приведенной в табл. 2, с сигнальной последовательностью (аминокислоты с -19 по 1438 в составе SEQ ID NO: 2; аминокислоты с -19 по 2332 в составе SEQ ID NO: 6; аминокислоты с -19 по 740 в составе SEQ ID NO: 8; аминокислоты с -19 по 745 в составе SEQ ID NO: 10; или аминокислоты с -20 по 684 в составе SEQ ID

NO: 12). Фактор VIII (или соответствующая фактору VIII часть химерного полипептида) может быть идентичен аминокислотной последовательности фактора VIII, приведенной в табл. 2 с сигнальной последовательностью (аминокислоты с -19 по 1438 в составе SEQ ID NO: 2; аминокислоты с -19 по 2332 в составе SEQ ID NO: 6; аминокислоты с -19 по 740 в составе SEQ ID NO: 8; аминокислоты с -19 по 745 в составе SEQ ID NO: 10; или аминокислоты с -20 по 684 в составе SEQ ID NO: 12).

Fc-часть (или соответствующая Fc часть химерного полипептида) может быть по меньшей мере на 90 или 95% идентична аминокислотной последовательности Fc, приведенной в табл. 2 (аминокислоты с 1439 по 1665 в составе SEQ ID NO: 2; аминокислоты с 2333 по 2559 в составе SEQ ID NO: 6; аминокислоты с 741 по 967 в составе SEQ ID NO: 8; аминокислоты с 746 по 972 в составе SEQ ID NO: 10; аминокислоты с 685 по 924 в составе SEQ ID NO: 12). Fc-часть (или соответствующая Fc часть химерного полипептида) может быть идентична аминокислотной последовательности Fc, приведенной в табл. 2 (аминокислоты с 1439 по 1665 в составе SEQ ID NO: 2; аминокислоты с 2333 по 2559 в составе SEQ ID NO: 6; аминокислоты с 741 по 967 в составе SEQ ID NO: 8; аминокислоты с 746 по 972 в составе SEQ ID NO: 10; аминокислоты с 685 по 924 в составе SEQ ID NO: 12).

Химерный полипептид может включать последовательность, которая по меньшей мере на 90 или 95% идентична аминокислотной последовательности фактора VIII и Fc, приведенной в табл. 2A (i) без сигнальной последовательности (аминокислоты с 1 по 1665 в составе SEQ ID NO: 2) или по меньшей мере на 90% или 95% идентична аминокислотной последовательности фактора VIII и Fc, приведенной в табл. 2A (i) с сигнальной последовательностью (аминокислоты с -19 по 1665 в составе SEQ ID NO: 2). Химерный полипептид может включать последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности Фактора VIII и Fc, приведенной в табл. 2A (i), без сигнальной последовательности (аминокислоты с 1 по 1665 в составе SEQ ID NO: 2) или идентична аминокислотной последовательности Фактора VIII и Fc, приведенной в табл. 2A (i), с сигнальной последовательностью (аминокислоты с -19 по 1665 в составе SEQ ID NO: 2).

Химерный полипептид может находиться в форме гибрида, включающего второй полипептид в ассоциации с указанным химерным полипептидом, при этом указанный второй полипептид включает или в существенной степени состоит из Fc.

Второй полипептид может включать или в существенной степени состоять из последовательности, которая по меньшей мере на 90 или 95% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в табл. 2A (ii), без сигнальной последовательности (аминокислоты с 1 по 227 в составе SEQ ID NO: 4) или по меньшей мере на 90 или 95% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в табл. 2A (ii), с сигнальной последовательностью (аминокислоты с -20 по 227 в составе SEQ ID NO: 4). Второй полипептид может включать или в существенной степени состоять из последовательности, которая идентична аминокислотной последовательности, приведенной в табл. 2A (ii), без сигнальной последовательности (аминокислоты с 1 по 227 в составе SEQ ID NO: 4) или идентична аминокислотной последовательности, приведенной в табл. 2A (ii), с сигнальной последовательностью (аминокислоты с -20 по 227 в составе SEQ ID NO: 4).

Химерный полипептид или гибрид может быть введен как часть фармацевтической композиции, включающей по меньшей мере одно вспомогательное вещество.

Изобретение также направлено на создание самих описанных выше химерных и гибридных полипептидов, полинуклеотидов, их кодирующих, культивируемых эмбриональных клеток человека, содержащих эти полинуклеотиды, и способов получения таких химерных и гибридных полипептидов, а также полипептидов, получаемых с помощью таких способов.

Краткое описание/фигур

Фиг. 1. Схематическое изображение мономера rFVIII_{FC}.

Фиг. 2. WBCT (время свертывания цельной крови) при введении rFVIII_{FC}, по сравнению с РеФакто® (ReFacto®), мышам с гемофилией А после внутривенной дозы 50 МЕ/кг (n = 6 мышей на группу).

Фиг. 3. Хромогенная активность в плазме, полученной от мышей с гемофилией А, после разовой IV внутривенной дозы 50 МЕ/кг rFVIII_{FC}, РеФакто® и Адвейт® (Advate®).

Фиг. 4. WBCT при введении rFVIII_{FC} и РеФакто® собакам с гемофилией А (А) rFVIII_{FC}. (В) РеФакто® и затем rFVIII_{FC} в перекрестном исследовании.

Фиг. 5. Фармакокинетика при внутривенном введении rFVIII_{FC} и РеФакто® собакам с гемофилией А (измеренная методом ELISA).

Фиг. 6. Активность rFVIII и РеФакто® после введения разовой внутривенной дозы собакам с гемофилией А (измеренная с применением хромогенного анализа активности, специфичной для FVIII).

Фиг. 7. Групповое среднее значение концентрации в плазме rFVIII_{FC} и Ксинта (Xyntha) с течением времени после введения разовой внутривенной дозы (125 МЕ/кг) яванским макакам (n = 6, среднее ± Ст. откл.) Концентрации в плазме определяли с помощью ELISA.

Фиг. 8. Кривые зависимости индивидуальных значений концентрации в плазме от времени для rFVIII_{FC} и Ксинта после введения разовой внутривенной дозы (125 МЕ/кг) яванским макакам (n = 6,

среднее $\pm$ Ст. откл.) Концентрации в плазме определяли с помощью ELISA. (A) rFVIII-Fc согласно данным ELISA. (B) Ксинта согласно данным ELISA.

Фиг. 9. Групповое среднее значение хромогенной активности в плазме после введения разовой внутривенной дозы (125 МЕ/кг) rFVIII-Fc и Ксинта яванским макакам ($n = 6$, среднее $\pm$ Ст. откл.) Активность FVIII измеряли с применением хромогенного анализа активности, специфичной для FVIII.

Фиг. 10. Кривые зависимости индивидуальных значений хромогенной активности в плазме от времени после введения разовой внутривенной дозы (125 МЕ/кг) rFVIII-Fc и Ксинта яванским макакам ($n = 6$, среднее $\pm$ Ст. откл.) Активность FVIII измеряли с применением хромогенного анализа активности, специфичной для FVIII. (A) Хромогенная активность rFVIII-Fc. (B) Хромогенная активность Ксинта.

Фиг. 11. Определение биохимических параметров rFVIII-Fc: активация Фактора X как функция концентрации Фактора X.

Фиг. 12. Определение биохимических параметров rFVIII-Fc: активация Фактора X как функция концентрации Фактора IXa.

Фиг. 13. Зависимость наблюдаемого группового среднего значения активности FVIII ($\pm$ станд. ошибка) (одноэтапный анализ, 25 МЕ/кг (A) или 65 МЕ/кг (B)); и хромогенный анализ, 25 МЕ/кг (C) или 65 МЕ/кг (D)) от времени.

Фиг. 14. Зависимость наблюдаемого группового среднего значения активности FVIII ($\pm$ станд. ошибка) (одноэтапный анализ (A) или хромогенный анализ (B)) от времени.

Детальное описание изобретения

Настоящее изобретение направлено на создание способа лечения гемофилии А с помощью Фактора VIII с применением более длинного интервала между введениями доз и/или большего значения AUC, чем это возможно в случае известных в настоящее время продуктов, являющихся Фактором VIII. Настоящее изобретение также направлено на создание химерных полипептидов Фактора VIII, химерных полинуклеотидов фактора VIII и способов получения.

Лечение гемофилии А заключается в заместительной терапии, нацеленной на восстановление активности FVIII до 1-5 % от нормальных уровней с целью предотвращения спонтанного кровотечения (Mannucci, P.M., et al., N. Engl. J. Med. 344:1773-9 (2001), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки). Имеются продукты, представляющие собой получаемый из плазмы или рекомбинантный FVIII, которые доступны для лечения эпизодов кровотечения в случае необходимости или для предотвращения возникновения эпизодов кровотечения с помощью профилактического лечения. Исходя из периода полувыведения этих продуктов (10-12 ч) (White G.C., et al., Thromb. Haemost. 77:660-7 (1997); Morfini, M., Haemophilia 9 (suppl 1):94-99; discussion 100 (2003)), режимы лечения требуют частого внутривенного введения, обычно от двух до трех раз в неделю для профилактических целей и от одного до трех раз в день в случае лечения по необходимости (Manco-Johnson, M.J., et al., N. Engl. J. Med. 357:535-544 (2007)), содержание каждой из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки. Такое частое введение болезненно и доставляет неудобства.

Настоящее изобретение направлено на создание способа введения Фактора VIII субъекту, которому это необходимо, включающего введение субъекту терапевтической дозы химерного полипептида Фактора VIII, например, химерного полипептида Фактора VIII-Fc или гибрида такого полипептида, с интервалом между введениями доз, по меньшей мере, примерно в полтора раза более длинным, чем интервал между введениями доз, необходимый для эквивалентного количества указанного Фактора VIII без части молекулы, не принадлежащей Фактору VIII (полипептида, состоящего из части, соответствующей указанному Фактору VIII), например, без части, соответствующей Fc.

Интервал между введениями доз может быть, по меньшей мере, примерно в полтора - шесть раз длиннее, в полтора - пять раз длиннее, в полтора - четыре раза длиннее, в полтора - три раза длиннее или в полтора - два раза длиннее, чем интервал между введениями доз, необходимый для эквивалентного количества указанного Фактора VIII без части молекулы, не принадлежащей Фактору VIII (полипептида, состоящего из части, соответствующей указанному Фактору VIII), например, без части, соответствующей Fc. Интервал между введениями доз может быть, по меньшей мере, примерно в полтора, два, два с половиной, три, три с половиной, четыре, четыре с половиной, пять, пять с половиной или шесть раз длиннее, чем интервал между введениями доз, необходимый для эквивалентного количества указанного Фактора VIII без части молекулы, не принадлежащей Фактору VIII (полипептида, состоящего из части, соответствующей указанному Фактору VIII), например, без части, соответствующей Fc. Интервал между введениями доз может составлять примерно каждые пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать или четырнадцать дней или с более.

Интервал между введениями доз может составлять, по меньшей мере, примерно от полутора до 5, полтора, 2, 3, 4 или 5 дней или более.

Настоящее изобретение также направлено на создание способа введения фактора VIII субъекту, которому это необходимо, включающего введение субъекту терапевтической дозы химерного полипептида фактора VIII, например, химерного полипептида фактора VIII-Fc, или гибрида такого полипептида, с достижением значения площади под кривой зависимости концентрации в плазме от времени (AUC), по

меньшей мере, примерно в один с четвертью раза более высокого, чем AUC, полученный при применении эквивалентного количества указанного фактора VIII без части молекулы, не принадлежащей фактору VIII (полипептида, состоящего из части, соответствующей указанному фактору VIII), например, без части, соответствующей Fc.

Настоящее изобретение также направлено на создание способа введения фактора VIII субъекту, которому это необходимо, включающего введение субъекту терапевтической дозы полипептида, содержащего фактор VIII и Fc, или гибрида такого полипептида, с интервалом между введениями доз, составляющим примерно каждые пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать или четырнадцать дней или более.

Способы по изобретению могут применяться на практике к субъекту, которому это необходимо, в ходе профилактического лечения или лечения по необходимости.

"Введение" при использовании в этом документе означает доставку фармацевтически приемлемого полипептида фактора VIII по изобретению в организм субъекта фармацевтически приемлемым путем. Предпочтительными путями введения являются внутривенные, например, внутривенная инъекция и внутривенная инфузия. Дополнительные пути введения включают, например, подкожное, внутримышечное, пероральное, назальное и легочное введение. Химерные полипептиды и гибридные белки могут быть введены как часть фармацевтической композиции, содержащей, по меньшей мере, одно вспомогательное вещество.

"Площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени (AUC)" при использовании в этом документе соответствует термину, употребляемому в области фармакологии, и зависит от скорости и степени абсорбции фактора VIII после введения. AUC определяют в течение заданного периода времени, например, 12, 18, 24, 36, 48 или 72 ч, или до бесконечности, применяя экстраполяцию на основе углового коэффициента кривой. Если в этом документе не указано иное, AUC определена до бесконечности. Определение AUC можно проводить для одного субъекта или в популяции субъектов, для которых вычисляют среднее значение.

"В-домен" фактора VIII при использовании в этом документе соответствует В-домену, известному специалистам в данной области, который определяют по присущей ему идентичности аминокислотной последовательности и сайтам протеолитического расщепления тромбином, например, по остаткам Ser741-Arg1648 в составе полноразмерного фактора VIII человека. Другие домены фактора VIII человека определяют по следующим аминокислотным остаткам: A1, остатки Ala1-Arg372; A2, остатки Ser373-Arg740; A3, остатки Ser1690-Ile2032; C1, остатки Arg2033-Asn2172; C2, остатки Ser2173-Tyr2332. Последовательность A3-C1-C2 включает остатки Ser1690-Tyr2332. Остальная часть последовательности, остатки Glu1649-Arg1689, обычно обозначают как активационный пептид легкой цепи фактора VIII. Расположение и границы всех доменов, включая В-домен, в факторе VIII свиньи, мыши и собаки также известны специалистам в данной области. Предпочтительно, В-домен фактора VIII делетирован ("фактор VIII с делетированным В-доменом" или "BDD FVIII"). Примером BDD FVIII является РЕФАКТО (рекомбинантный BDD FVIII), который имеет ту же последовательность, что и соответствующая фактору FVIII часть последовательности в табл. 2A(i) (аминокислоты с -19 по 1438 или с 1 по 1438 в составе SEQ ID NO: 2).

"Фактор VIII с делетированным В-доменом" может содержать полные или частичные делеции, раскрытые в патентах США №№ 6316226, 6346513, 7041635, 5789203, 6060447, 5595886, 6228620, 5972885, 6048720, 5543502, 5610278, 5171844, 5112950, 4868112 и 6458563, содержание каждого из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки. В некоторых вариантах воплощения последовательность фактора VIII с делетированным В-доменом по настоящему изобретению включает любую одну делецию из раскрытых, начиная со столбца 4, строки 4 по столбец 5, строку 28 и в примерах 1-5 в патенте США № 6316226 (также в патенте США № 6346513). В некоторых вариантах воплощения фактор VIII с делетированным В-доменом по настоящему изобретению содержит делецию, раскрытую в столбце 2, строках 26-51 и примерах 5-8 в патенте США № 5789203 (также в патентах США №№ 6060447, 5595886 и 6228620). В некоторых вариантах воплощения фактор VIII с делетированным В-доменом содержит делецию, описанную начиная со столбца 1, строка 25 по столбец 2, строка 40 в патенте США № 5972885; в столбце 6, строках 1-22 и примере 1 в патенте США № 6048720; в столбце 2, строки 17-46 в патенте США № 5543502; начиная со столбца 4, строка 22 по столбец 5, строка 36 в патенте США № 5171844; в столбце 2, строки 55-68, на фиг. 2 и в примере 1 в патенте США № 5112950; начиная со столбца 2, строка 2 по столбец 19, строка 21 и в табл. 2 в патенте США № 4868112; начиная со столбца 2, строка 1 по столбец 3, строка 19, начиная со столбца 3, строка 40 по столбец 4, строка 67, начиная со столбца 7, строка 43 по столбец 8, строка 26 и начиная со столбца 11, строка 5 по столбец 13, строка 39 в патенте США № 7041635; или в столбце 4, строки 25-53 в патенте США № 6458563. В некоторых вариантах воплощения фактор VIII с делетированным В-доменом имеет делецию большей части В-домена, но все-таки содержит аминокислотные последовательности В-домена, которые существенны для протеолитического процессинга *in vivo* первичного продукта трансляции с образованием двух полипептидных цепей, как описано в WO 91/09122, содержание которой целиком включено сюда в качестве ссылки. В некоторых вариантах воплощения фактор VIII с делетированным В-доменом сконструирован с делецией аминокислот

747-1638, т.е., с фактически полной делецией В-домена. Hoeben R.C., et al, J. Biol. Chem. 265 (13): 7318-7323 (1990), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки. Фактор VIII с делетированным В-доменом также может содержать делецию аминокислот 771-1666 или аминокислот 868-1562 факторов VIII. Meulien P., et al. Protein Eng. 2(4): 301-6 (1988), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки. Дополнительные делеции В-домена, которые являются частью изобретения, включают, например: делецию аминокислот с 982 по 1562 или с 760 по 1639 (Toole et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1986) 83, 5939-5942)), с 797 по 1562 (Eaton, et al. Biochemistry (1986) 25:8343-8347)), с 741 по 1646 (Kaufman (опубликованная заявка РСТ № WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver, et al., DNA (1987) 6:553-564)), с 741 по 1648 (Pasek (заявка РСТ № 88/00831)), с 816 по 1598 или с 741 по 1689 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988) № 82:16-25, EP 295597)), содержание каждой из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки. Каждая из вышеупомянутых делеций может быть внесена в любую последовательность фактора VIII.

"Химерный полипептид" при использовании в этом документе означает полипептид, который содержит в своем составе, по меньшей мере, два полипептида (или подпоследовательности, или пептида) из разных источников. Химерные полипептиды могут включать, например, два, три, четыре, пять, шесть, семь или более полипептидов из разных источников, таких как разные гены, разные кДНК или разные животные или другие биологические виды. Химерные полипептиды могут включать, например, один или несколько линкеров, соединяющих различные подпоследовательности. Таким образом, подпоследовательности могут быть соединены непосредственно, или они могут соединяться опосредованно, через линкеры, или обоими способами в пределах единого химерного полипептида. Химерные полипептиды могут включать, например, дополнительные пептиды, такие как сигнальные последовательности и такие последовательности, как 6His и FLAG, которые помогают осуществлять очистку и детекцию белка. Кроме того, химерные полипептиды могут иметь дополнительные аминокислоты или пептид на N- и/или С-концах.

В некоторых вариантах воплощения химерный полипептид включает соответствующую фактору VIII часть и отличную от фактора VIII часть. Примеры отличных от фактора VIII частей включают, например, Fc, XTEN и альбумин. Примеры химерных полипептидов по изобретению включают, например, химерные полипептиды фактора VIII-Fc, химерные полипептиды фактора VIII-XTEN и химерные полипептиды фактора VIII-альбумин.

Примеры химерных полипептидов фактор VIII-Fc включают, например, SEQ ID Nos: 2, 6, 8, 10 и 12 (табл. 2), с сигнальной последовательностью или без нее, и химерный полипептид Fc с SEQ ID NO: 4 (табл. 2).

Химерный полипептид может включать последовательность, которая, по меньшей мере, на 90% или 95% идентична аминокислотной последовательности фактора VIII и Fc, приведенной в табл. 2A (i) без сигнальной последовательности (аминокислоты с 1 по 1665 в составе SEQ ID NO: 2) или, по меньшей мере, на 90% или 95% идентична аминокислотной последовательности фактора VIII и Fc, приведенной в табл. 2A (i) с сигнальной последовательностью (аминокислоты с -19 по 1665 в составе SEQ ID NO: 2). Химерный полипептид может включать последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности фактора VIII и Fc, приведенной в табл. 2A (i) без сигнальной последовательности (аминокислоты с 1 по 1665 в составе SEQ ID NO: 2) или идентична аминокислотной последовательности фактора VIII и Fc, приведенной в табл. 2A (i) с сигнальной последовательностью (аминокислоты с -19 по 1665 в составе SEQ ID NO: 2).

Как обсуждалось выше, примеры химерных полипептидов включают фактор VIII, сшитый с одним или несколькими полипептидами XTEN. Schellenburger et al., Nat. Biotech. 27:1186-90 (2009), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки. Фактор VIII может быть сшит либо с N-концом полипептида XTEN, либо с С-концом полипептида XTEN, при условии, что соответствующий фактору VIII компонент химерного белка фактора VIII-XTEN может подвергаться процессингу протеазой с образованием полипептида, содержащего процессированный фактор VIII. Для того чтобы такой процессинг был возможен, сайт для расщепления протеазой может располагаться между соответствующей XTEN частью и соответствующей фактору VIII частью. Полипептиды XTEN включают, например, полипептиды, описанные в WO 2009/023270, WO 2010/091122, WO 2007/103515, US 2010/0189682 и US 2009/0092582, содержание каждой из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки.

Как обсуждалось выше, примеры химерных полипептидов также включают фактор VIII, сшитый с одним или несколькими полипептидами альбумина. Предпочтительно, альбумин является альбумином человека. Фактор VIII может быть сшит либо с N-концом альбумина, либо с С-концом альбумина, при условии, что соответствующий фактору VIII компонент химерного белка фактора VIII-альбумин может подвергаться процессингу с участием ферментативно активной конвертазы пробелка с образованием полипептида, содержащего процессированный фактор VIII. Примеры альбумина, например, его фрагменты, которые могут применяться в настоящем изобретении, известны специалистам, см., например, патент США № 7 592 010; патент США № 6 686 179; и Schulte, Thrombosis Res. 124 Suppl. 2:S6-S8 (2009), содержание каждого из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки.

В некоторых вариантах воплощения химерный полипептид, включающий соответствующую факто-

ру VIII часть, имеет увеличенный период полувыведения ($t_{1/2}$), по сравнению с полипептидом, состоящим из той же соответствующей фактору VIII части без отличной от фактора VIII части. Химерный полипептид фактора VIII с увеличенным $t_{1/2}$ может называться в этом документе фактором VIII длительного действия. Химерные полипептиды фактора VIII длительного действия включают, например, фактор VIII, сшитый с Fc (в том числе, например, химерные полипептиды фактора VIII в форме гибрида, такого как димерный гибрид из мономеров FVIII_{Fc}; см. пример 1, фиг. 1, и табл. 2А; и патенты США №№ 7404956 и 7348004), фактор VIII, сшитый с XTEN, и фактор VIII, сшитый с альбумином.

"Культура", "культивировать" и "культивирование" при использовании в этом документе означает, что клетки инкубируют в условиях *in vitro*, которые позволяют клеткам расти и делиться, или клетки поддерживают в живом состоянии. "Культивируемые клетки" при использовании в этом документе означает клетки, которые пролиферируют *in vitro*.

"Фактор VIII" при использовании в этом документе означает полипептид функционального фактора VIII в его нормальной роли при свертывании крови, если не указано иначе. Таким образом, термин фактор VIII включает варианты полипептиды, которые являются функционально активными. Предпочтительными белками фактора VIII являются белки фактора VIII человека, свиньи, собаки и мыши. Как описано в разделе "Предпосылки создания изобретения", известны последовательности полноразмерных полипептидов и полинуклеотидов, а также множество функциональных фрагментов, мутантных и модифицированных вариантов. Примеры последовательностей фактора VIII человека показаны как подпоследовательности в SEQ ID Nos: 2, 6, 8, 10 и 12 (табл. 2). Полипептиды фактора VIII включают, например, полноразмерный фактор VIII, полноразмерный фактор VIII без Met на N-конце, зрелый фактор VIII (без сигнальной последовательности), зрелый фактор VIII с дополнительным Met на N-конце и/или фактор VIII с полной или частичной делецией В-домена. Предпочтительные варианты фактора VIII содержат делеции В-домена, либо частичные, либо полные делеции.

Известно большое количество функциональных вариантов фактора VIII, как обсуждается выше и далее. Кроме того, сотни нефункциональных мутаций в факторе VIII идентифицированы у пациентов с гемофилией, и было установлено, что воздействие этих мутаций на функционирование фактора VIII в большей степени зависит от их местоположения в пространственной структуре фактора VIII, чем от природы замены (Cutler et al., Hum. Mutat. 19:274-8 (2002)), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки. Кроме того, сравнение фактора VIII человека и других видов выявило консервативные остатки, которые, по-видимому, необходимы для функционирования (Cameron et al., Thromb. Haemost. 79:317-22 (1998); патент США 6 251 632), содержание которых целиком включено сюда в качестве ссылки.

Ген фактора VIII человека был изолирован и экспрессирован в клетках млекопитающих (Toole, J. J., et al, Nature 312:342-347 (1984); Gitschier, J., et al., Nature 312:326-330 (1984); Wood, W. I, et al., Nature 312:330-337 (1984); Vehar, G. A., et al, Nature 312:337-342 (1984); WO 87/04187; WO 88/08035; WO 88/03558; патент США № 4757006), содержание каждого из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки, и аминокислотная последовательность была выведена из последовательности кДНК. Caron et al. в патенте США № 4 965 199, содержание которого целиком включено сюда в качестве ссылки, раскрывают способ получения с применением рекомбинантных ДНК фактора VIII в клетках-хозяевах, полученных от млекопитающих, и очистки фактора VIII человека. Сообщалось об экспрессии фактора VIII человека в клетках СНО (яичника китайского хомячка) и ВНКС (клетках почки новорожденного хомяка). Были проведены модификации фактора VIII человека с делецией части или всего В-домена (патенты США №№ 4994371 и 4868112, содержание каждого из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки), и осуществлена замена В-домена фактора VIII человека на В-домен фактора V человека (патент США № 5004803, содержание которого целиком включено сюда в качестве ссылки). Последовательность кДНК, кодирующая фактор VIII человека, и предсказанная аминокислотная последовательность представлены в SEQ ID Nos: 1 и 2, соответственно, в публикации заявки на патент США № 2005/0100990, содержание которой целиком включено сюда в качестве ссылки.

В патенте США № 5859204, принадлежащем Lollar, J. S., содержание которого целиком включено сюда в качестве ссылки, сообщается о функциональных мутантных формах фактора VIII, обладающих сниженной антигенностью и уменьшенной иммунореактивностью. В патенте США № 6376463, принадлежащем Lollar, J. S., содержание которого целиком включено сюда в качестве ссылки, также сообщается о мутантных формах фактора VIII, обладающих уменьшенной иммунореактивностью. В публикации заявки на патент США № 2005/0100990, принадлежащей Saenko et al., содержание которой целиком включено сюда в качестве ссылки, сообщается о функциональных мутациях в А2-доме фактора VIII.

Ряд функциональных молекул фактора VIII, в том числе с делециями В-домена, раскрыт в следующих патентах США: 6316226 и 6346513, оба переданы компании Baxter; 7 041 635, переданном компании In2Gen; 5789203, 6060447, 5595886 и 6228620, переданных компании Chiron; 5972885 и 6048720, переданных компании Biovitrum; 5543502 и 5610278, переданных компании Novo Nordisk; 5171844, переданном компании Immuno Ag; 5112950, переданном компании Transgene S.A.; 4868112, переданном компании Genetics Institute, содержание каждого из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки.

Опубликована последовательность фактора VIII свиньи (Toole, J. J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5939-5942 (1986), содержание которой целиком включено сюда в качестве ссылки), и сообщалось о полноразмерной последовательности кДНК свиньи, полученной в результате ПЦР-амплификации последовательностей фактора VIII из библиотеки кДНК селезенки свиньи (Healey, J. F., et al., Blood 88:4209-4214 (1996), содержание которой целиком включено сюда в качестве ссылки). Гибридные факторы VIII человека/свиньи, содержащие замены всех доменов, всех субъединиц и специфичных аминокислотных последовательностей, были описаны в патенте США № 5364771, принадлежащем Lollar и Runge, и в заявке WO 93/20093, содержание которых целиком включено сюда в качестве ссылки. Позже сообщалось о нуклеотидных и соответствующих аминокислотных последовательностях доменов A1 и A2 фактора VIII свиньи и о химерном факторе VIII, в котором соответствующие домены молекулы человека были заменены на домены A1 и/или A2 свиньи (заявка WO 94/11503, содержание которой целиком включено сюда в качестве ссылки). В патенте США № 5859204, принадлежащем Lollar, J. S., также раскрываются последовательности кДНК и выведенные из них аминокислотные последовательности молекулы свиньи. Патент № 6458563, содержание которого целиком включено сюда в качестве ссылки, переданный компании Etopo, раскрывает фактор VIII свиньи с делектированным В-доменом.

Фактор VIII (или соответствующая фактору VIII часть химерного полипептида) может быть по меньшей мере на 90 или 95% идентичен аминокислотной последовательности фактора VIII, приведенной в табл. 2 без сигнальной последовательности (аминокислоты с 1 по 1438 в составе SEQ ID NO: 2; аминокислоты с 1 по 2332 в составе SEQ ID NO: 6; аминокислоты с 1 по 740 в составе SEQ ID NO: 8; аминокислоты с 1 по 745 в составе SEQ ID NO: 10; или аминокислоты с 1 по 684 в составе SEQ ID NO: 12). Фактор VIII (или соответствующая фактору VIII часть химерного полипептида) может быть идентичен аминокислотной последовательности фактора VIII, приведенной в табл. 2 без сигнальной последовательности (аминокислоты с 1 по 1438 в составе SEQ ID NO: 2; аминокислоты с 1 по 2332 в составе SEQ ID NO: 6; аминокислоты с 1 по 740 в составе SEQ ID NO: 8; аминокислоты с 1 по 745 в составе SEQ ID NO: 10; или аминокислоты с 1 по 684 в составе SEQ ID NO: 12).

Фактор VIII (или соответствующая фактору VIII часть химерного полипептида) может быть по меньшей мере на 90 или 95 % идентичен аминокислотной последовательности фактора VIII, приведенной в табл. 2 с сигнальной последовательностью (аминокислоты с -19 по 1438 в составе SEQ ID NO: 2; аминокислоты с -19 по 2332 в составе SEQ ID NO: 6; аминокислоты с -19 по 740 в составе SEQ ID NO: 8; аминокислоты с -19 по 745 в составе SEQ ID NO: 10; или аминокислоты с -20 по 684 в составе SEQ ID NO: 12). Фактор VIII (или соответствующая фактору VIII часть химерного полипептида) может быть идентичен аминокислотной последовательности фактора VIII, приведенной в табл. 2 с сигнальной последовательностью (аминокислоты с -19 по 1438 в составе SEQ ID NO: 2; аминокислоты с -19 по 2332 в составе SEQ ID NO: 6; аминокислоты с -19 по 740 в составе SEQ ID NO: 8; аминокислоты с -19 по 745 в составе SEQ ID NO: 10; или аминокислоты с -20 по 684 в составе SEQ ID NO: 12).

"Эквивалентное количество" при использовании в этом документе означает такое же количество активности фактора VIII, выраженной в международных единицах, которое не зависит от молекулярной массы рассматриваемого полипептида. Одна международная единица (МЕ) активности фактора VIII примерно соответствует количеству фактора VIII в одном миллилитре нормальной плазмы человека. Имеется несколько способов анализа для измерения активности фактора VIII, в том числе описанный в Европейской Фармакопее анализ с хромогенным субстратом и одноэтапный анализ свертывания.

"Fc" при использовании в этом документе означает функциональных неонатальных партнеров связывания с рецептором для Fc (FcRn), если не указано иначе. Партнер связывания с FcRn - это любая молекула, которая способна специфично связываться с рецептором FcRn с последующим активным транспортом при помощи рецептора FcRn партнера связывания с FcRn. Таким образом, термин Fc включает любые варианты Fc из состава IgG, если они являются функциональными. Область Fc-части молекулы IgG, которая связывается с рецептором FcRn, была описана на основании данных рентгеноструктурной кристаллографии (Burmeister et al., 1994, Nature 372:379, содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки). Основная область контакта Fc с FcRn расположена рядом с областью соединения доменов CH2 и CH3. Все контакты Fc-FcRn происходят в пределах единичной тяжелой цепи иммуноглобулина. Партнеры связывания с FcRn включают, например, полноразмерный IgG, фрагмент Fc из молекулы IgG и другие фрагменты молекулы IgG, которые содержат полноразмерную область связывания с FcRn. Основные сайты контактов включают аминокислотные остатки 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 и 314 домена CH2 и аминокислотные остатки 385-387, 428 и 433-436 домена CH3. Все ссылки на нумерацию аминокислот в составе иммуноглобулинов или фрагментов иммуноглобулинов, или областей, основаны на публикации Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Public Health, Bethesda; MD, содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки. (Рецептор FcRn был выделен из клеток нескольких видов млекопитающих, включая человека. Известны последовательности FcRn человека, FcRn крысы и FcRn мыши (Story et al. 1994, J. Exp. Med. 180: 2377), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки). Fc может включать домены CH2 и CH3 иммуноглобулина с шарнирной областью иммуноглобулина или без нее. Примеры вариантов Fc представлены в WO 2004/101740 и WO 2006/074199, содержание которых

специально целиком включено сюда в качестве ссылки.

Fc (или соответствующая Fc часть химерного полипептида) может содержать одну или несколько мутаций и комбинации мутаций.

Fc (или соответствующая Fc часть химерного полипептида) может содержать мутации, придающие свойство удлинения периода полувыведения, такие как M252Y, S254T, T256E и их комбинации, как описано в работе Oganessian et al., *Mol. Immunol.* 46:1750 (2009), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки; H433K, N434F и их комбинации, как описано в работе Vaccaro et al., *Nat. Biotechnol.* 23:1283 (2005), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки; мутации, описанные на стр. 1-2, в параграфе [0012] и в примерах 9 и 10 заявки US 2009/0264627 A1, содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки; и мутации, описанные на стр. 2, в параграфах с [0014] по [0021] заявки US 20090163699 A1, содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки.

Fc (или соответствующая Fc часть химерного полипептида) может также содержать, например, следующие мутации: Область Fc из молекулы IgG может быть модифицирована с применением хорошо известных методик, таких как сайт-направленный мутагенез и т.п., с получением модифицированных IgG, или фрагментов Fc, или их частей, которые будут связываться с FcRn. Такие модификации включают, например, модификации, отдаленные от сайтов контакта с FcRn, а также модификации в пределах сайтов контакта, которые предотвращают или даже усиливают связывание с FcRn. Например, следующие одиночные аминокислотные остатки в составе Fc из IgG1 человека (Fcγ1) могут быть заменены без существенной потери аффинности связывания

Fc с FcRn: 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, A330S, P331A, P331S, 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 пример P238A представляет собой замену характерного для дикого типа пролина на аланин в положении 238. В дополнение к аланину, другие аминокислоты могут служить заменой аминокислотам дикого типа в указанных выше положениях. Мутации в Fc могут быть внесены по одной, с образованием более чем сотни партнеров связывания с FcRn, отличных от нативного Fc. Дополнительно, комбинации двух, трех или более из этих индивидуальных мутаций могут вноситься одновременно, с образованием еще сотен партнеров связывания с FcRn. Некоторые из этих мутаций могут придавать партнеру связывания с FcRn новые функциональные свойства. Например, в одном варианте воплощения внесена мутация N297A, в результате которой удаляется высококонсервативный сайт N-гликозилирования. В результате этой мутации снижается иммуногенность, и тем самым увеличивается период полувыведения из циркуляции партнера связывания с FcRn, и партнеру связывания с FcRn придается неспособность связываться с FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB и FcγRIIIA, не изменяя при этом аффинность к FcRn (Routledge et al. 1995, *Transplantation* 60:847, содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки; Friend et al. 1999, *Transplantation* 68:1632, содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки; Shields et al. 1995, *J. Biol. Chem.* 276:6591, содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки). Дополнительно, по меньшей мере, три гамма-рецептора Fc человека, по-видимому, узнают сайт связывания на IgG в пределах нижней шарнирной области, обычно аминокислоты 234-237. Следовательно, еще один пример новых функциональных свойств и, потенциально, сниженной иммуногенности может быть получен при мутациях в этой области, например, при замене аминокислот 233-236 молекулы IgG1 человека "ELLG" на соответствующую последовательность из молекулы IgG2 "PVA" (с делецией одной аминокислоты). Показано, что FcγRI, FcγRII и FcγRIII, которые опосредуют различные эффекторные функции, не будут связываться с IgG1 при внесении таких мутаций (Ward and Ghetie 1995, *Therapeutic Immunology* 2:77, содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки; и Armour et al., 1999, *Eur. J. Immunol.* 29:2613, содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки). В качестве дополнительного примера новых функциональных свойств, появляющихся в результате мутаций, описанных выше, служит то, что в некоторых случаях аффинность к FcRn может быть повышена относительно аффинности молекулы дикого типа. Эта повышенная аффинность может отражать повышенную скорость ассоциации, пониженную скорость диссоциации или одновременно повышенную скорость ассоциации и пониженную скорость диссоциации.

Мутации, которые, как полагают, влияют на увеличение аффинности к FcRn, включают, например T256A, T307A, E380A и N434A (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591, содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки).

Fc (или соответствующая Fc часть химерного полипептида) может быть по меньшей мере на 90 или 95% идентична аминокислотной последовательности Fc, приведенной в табл. 2 (аминокислоты с 1439 по 1665 в составе SEQ ID NO: 2; аминокислоты с 2333 по 2559 в составе SEQ ID NO: 6; аминокислоты с 741 по 967 в составе SEQ ID NO: 8; аминокислоты с 746 по 972 в составе SEQ ID NO: 10; аминокислоты с 685 по 924 в составе SEQ ID NO: 12). Fc (или соответствующая Fc часть химерного полипептида) может быть идентична аминокислотной последовательности Fc, приведенной в табл. 2 (аминокислоты с 1439 по 1665 в составе SEQ ID NO: 2; аминокислоты с 2333 по 2559 в составе SEQ ID NO: 6; аминокислоты с 741 по 967 в составе SEQ ID NO: 8; аминокислоты с 746 по 972 в составе SEQ ID NO: 10; аминокислоты с 685 по 924 в составе SEQ ID NO: 12).

"Гибридные" полипептиды и белки при использовании в этом документе означают комбинацию химерного полипептида со вторым полипептидом. Химерный полипептид и второй полипептид в гибриде могут быть связаны друг с другом посредством белок-белковых взаимодействий, таких как электростатические или гидрофобные взаимодействия. Химерный полипептид и второй полипептид в гибриде могут быть связаны друг с другом посредством дисульфидной или другой ковалентной связи (или связей). Гибриды описаны в WO 2004/101740 и WO 2006/074199, содержание каждой из которых целиком включено сюда в качестве ссылок. См. также патенты США №№ 7404956 и 7348004, содержание каждого из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки. Этот второй полипептид может являться второй копией того же самого химерного полипептида или может представлять собой неидентичный химерный полипептид. См., например, фиг. 1, пример 1 и табл. 2. В предпочтительных вариантах воплощения второй полипептид является полипептидом, включающим Fc. В предпочтительных вариантах воплощения химерный полипептид является химерным полипептидом фактора FVIII-Fc и второй полипептид в существенной степени состоит из Fc, например, гибридный полипептид из примера 1, который является рекомбинантным химерным белком rFVIII-Fc, состоящим из единичной молекулы рекомбинантного FVIII человека с делегированным В-доменом (BDD-rFVIII), сшитой с димерным Fc-доменом из молекулы IgG1 человека, без вставочной линкерной последовательности. Этот гибридный полипептид называется в этом документе химерным белком FVIII-Fc и мономерного Fc, мономерным гибридом FVIIIFc, гибридом мономерного FVIII-Fc и FVIII-Fc-мономер-димером. См. пример 1, фиг. 1 и табл. 2A. В примерах приведены результаты доклинических и клинических испытаний этого гибридного полипептида.

Второй полипептид в гибриде может содержать или в существенной степени состоять из последовательности, которая по меньшей мере на 90 или 95% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в табл. 2A (ii) без сигнальной последовательности (аминокислоты с 1 по 227 в составе SEQ ID NO: 4) или по меньшей мере на 90 или 95% идентична аминокислотной последовательности, приведенной в табл. 2A (ii) с сигнальной последовательностью (аминокислоты с -20 по 227 в составе SEQ ID NO: 4). Второй полипептид может содержать или в существенной степени состоять из последовательности, которая идентична аминокислотной последовательности, приведенной в табл. 2A (ii) без сигнальной последовательности (аминокислоты с 1 по 227 в составе SEQ ID NO: 4) или идентична аминокислотной последовательности, приведенной в табл. 2A (ii) с сигнальной последовательностью (аминокислоты с -20 по 227 в составе SEQ ID NO: 4).

На фиг. 1 схематически изображена структура химерного полипептида фактора VIII с делегированным В-доменом и Fc, а также его ассоциация со вторым полипептидом, который представляет собой полипептид Fc. Для получения этого гибрида получили кодирующую последовательность рекомбинантного FVIII человека с делегированным В-доменом с помощью обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) на матрице полиА-содержащей РНК печени человека (Clontech), используя праймеры, специфичные для FVIII. Последовательность FVIII содержит нативную сигнальную последовательность для FVIII. Делеция В-домена захватывает область с серина 743 (S743; 2287 п.н.) по глутамин 1638 (Q1638; 4969 п.н.), суммарная длина делеции 2682 п.н. Далее получили кодирующую последовательность рекомбинантного Fc человека с помощью ОТ-ПЦР, используя библиотеку к ДНК лейкоцитов человека (Clontech) и специфичные для Fc праймеры. Праймеры были сконструированы таким образом, чтобы последовательность FVIII с делегированным В-доменом была сшита непосредственно с N-концом последовательности Fc, без вставочного линкера. ДНК-последовательность FVIII-Fc клонировали в челночный экспрессионный вектор для клеток млекопитающих pBUDCE4.1 (Invitrogen) под контролем промотора CMV. Вторую идентичную последовательность Fc, содержащую сигнальную последовательность из Igk мыши, получили с помощью ОТ-ПЦР и клонировали ниже по течению от второго промотора, EF1 α , в экспрессионном векторе pBUDCE4.1.

Экспрессионный вектор для rFVIII-Fc трансфецировали в клетки эмбриональной почки человека 293 (HEK293H; Invitrogen), применяя реагент для трансфекции Липофектамин 2000 (Invitrogen). Клеточные линии со стабильными клонами были получены с помощью селекции зеоцином (Invitrogen). Одну клеточную линию клонов, 3C4-22, применяли для получения FVIII-Fc с целью определения его характери-

стик *in vivo*. Рекombинантный FVIII_{FC} получали и подвергали очистке (McCue et al., 2009) в компании Biogen Idec (Кембридж, Массачусетс, США). Ожидалось, что описанная выше стратегия трансфекции обеспечит выход трех продуктов, т.е., мономерных гибридов rFVIII_{FC}, димерных гибридов rFVIII_{FC} и димерных Fc. Однако в кондиционированной среде, полученной от этих клеток, практически не детектировался димерный гибрид rFVIII_{FC}. Кондиционированная среда в основном содержала Fc и мономерный гибрид rFVIII_{FC}. Возможно, размер димерного гибрида rFVIII_{FC} слишком велик, и это препятствует эффективной секреции из клетки. Этот результат был благоприятным, так как он позволил упростить процесс очистки мономера, по сравнению с ситуацией, когда присутствовали бы все три белка. Материал, который применяли в данных исследованиях, обладал специфичной активностью примерно 9000 МЕ/мг.

"Интервал между введениями доз" при использовании в этом документе означает количество времени, проходящего между введением множественных доз субъекту. Сравнение интервалов между введениями доз можно проводить для одного субъекта или в популяции субъектов, для которых затем можно вычислить среднее значение.

Интервал между введениями доз при введении химерного полипептида фактора VIII, например, химерного полипептида фактор VIII-Fc (полипептида, включающего фактор VIII, или гибрида) по изобретению, может быть, по меньшей мере, примерно в полтора раза более длинным, чем интервал между введениями доз, необходимый для эквивалентного количества указанного фактора VIII без части молекулы, не принадлежащей фактору VIII, например, без части, соответствующей Fc (полипептида, состоящего из указанного фактора VIII). Интервал между введениями доз может быть, по меньшей мере, примерно в полтора - шесть раз длиннее, в полтора - пять раз длиннее, в полтора - четыре раза длиннее, в полтора - три раза длиннее или в полтора - два раза длиннее, чем интервал между введениями доз, необходимый для эквивалентного количества указанного фактора VIII без части молекулы, не принадлежащей фактору VIII, например, без части, соответствующей Fc (полипептида, состоящего из указанного фактора VIII). Интервал между введениями доз может быть, по меньшей мере, примерно в полтора, два, два с половиной, три, три с половиной, четыре, четыре с половиной, пять, пять с половиной или шесть раз длиннее, чем интервал между введениями доз, необходимый для эквивалентного количества указанного фактора VIII без части молекулы, не принадлежащей фактору VIII, например, без части, соответствующей Fc (полипептида, состоящего из указанного фактора VIII). Интервал между введениями доз может составлять примерно каждые пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать или четырнадцать дней или с более. Интервал между введениями доз может составлять, по меньшей мере, примерно от полутора до 5, полтора, 2, 3, 4 или 5 дней или более. В случае лечения по необходимости интервал между введениями доз указанного химерного полипептида или гибрида составляет примерно один раз каждые 24-36, 24-48, 24-72, 24, 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, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 или 72 ч или через более длинный интервал.

Предпочтительно, 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, 63, 64 или 65 МЕ/кг) и интервал между введениями доз составляет один раз каждые 3-5, 3-6, 3-7, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или более дней, или три раза в неделю, или не чаще, чем три раза в неделю. Предпочтительно, эффективная доза составляет 65 МЕ/кг, и интервал между введениями доз составляет один раз в неделю, или один раз каждые 6-7 дней.

"Фактор VIII длительного действия" - это фактор VIII, имеющий увеличенный период полувыведения (также обозначаемый в этом документе как $t_{1/2}$, $t_{1/2}$ -бета, выделение полужизни и HL), по сравнению с референсным фактором VIII. IV Увеличение периода полувыведения фактора VIII длительного действия может происходить благодаря сшивке с одним или несколькими отличными от фактора VIII полипептидами, такими как, например, Fc, XTEN и альбумин. Увеличение периода полувыведения может происходить благодаря одной или нескольким модификациям, таким как, например, пегилирование. Примеры полипептидов фактора VIII длительного действия включают, например, химерные полипептиды фактора VIII, включающие Fc, химерные полипептиды фактора VIII, содержащие XTEN и химерные полипептиды фактора VIII, содержащие альбумин. Дополнительным примером полипептидов фактора VIII длительного действия служит, например, пегилированный фактор VIII.

"Референсный" полипептид в случае химерного полипептида фактора VIII длительного действия - это полипептид, в существенной степени состоящий из соответствующей фактору VIII части химерного полипептида, например, та же самая соответствующая фактору VIII часть без части, соответствующей Fc, без части, соответствующей XTEN или без части, соответствующей альбумину. Схожим образом, референсный полипептид в случае модифицированного фактора VIII - это тот же самый фактор VIII без модификации, например, фактора VIII без пегилирования.

В некоторых вариантах воплощения фактор VIII длительного действия обладает одним или несколькими из следующих свойств при введении его субъекту:

среднее время удержания (MRT) (активность) у указанного субъекта составляет примерно 14-41,3 ч;

клиренс (CL) (активность) у указанного субъекта составляет примерно 1,22-5,19 мл/ч/кг или менее;

$t_{1/2}$ -бета (активность) у указанного субъекта составляет примерно 11-26,4 ч;
удельная степень извлечения (значение К) (активность; наблюдаемая) у указанного субъекта составляет примерно 1,38-2,88 МЕ/дл на МЕ/кг;

V_{ss} (активность) у указанного субъекта составляет примерно 37,7-79,4 мл/кг; и

показатель AUC/дозу у указанного субъекта составляет примерно 19,2-81,7 МЕ·ч/дл на МЕ/кг.

В некоторых вариантах воплощения фактор VIII длительного действия обладает одним или несколькими из следующих свойств при введении его популяции пациентов:

средняя удельная степень извлечения (значение К) (активность; наблюдаемая) более 1,38 МЕ/дл на МЕ/кг;

средняя удельная степень извлечения (значение К) (активность; наблюдаемая) составляет, по меньшей мере, примерно 1,5, по меньшей мере, примерно 1,85 или, по меньшей мере, примерно 2,46 МЕ/дл на МЕ/кг;

среднее значение клиренса (CL) (активность) у указанной популяции пациентов составляет примерно $2,33 \pm 1,08$ мл/ч/кг или менее;

среднее значение клиренса (CL) (активность) у указанной популяции пациентов составляет примерно 1,8-2,69 мл/ч/кг;

среднее значение клиренса (CL) (активность) у указанной популяции пациентов составляет примерно 65% от клиренса полипептида, содержащего указанный фактор VIII без модификации;

среднее время удержания (MRT) (активность) у указанной популяции пациентов составляет, по меньшей мере, примерно $26,3 \pm 8,33$ ч;

среднее значение MRT (активность) у указанной популяции пациентов составляет примерно 25,9-26,5 ч;

среднее значение MRT (активность) у указанной популяции пациентов примерно в 1,5 раза больше, чем среднее значение MRT для полипептида, включающего указанный фактор VIII без модификации;

среднее значение $t_{1/2}$ -бета (активность) у указанной популяции пациентов составляет примерно $18,3 \pm 5,79$ ч;

среднее значение $t_{1/2}$ -бета (активность) у указанной популяции пациентов составляет примерно 18-18,4 ч;

среднее значение $t_{1/2}$ -бета (активность) у указанной популяции пациентов примерно в 1,5 раза больше, чем среднее значение $t_{1/2}$ -бета для полипептида, включающего указанный фактор VIII без модификации;

средняя удельная степень извлечения (значение К) (активность; наблюдаемая) у указанной популяции пациентов составляет примерно $2,01 \pm 0,44$ МЕ/дл на МЕ/кг;

средняя удельная степень извлечения (значение К) (активность; наблюдаемая) у указанной популяции пациентов составляет примерно 1,85-2,46 МЕ/дл на МЕ/кг;

средняя удельная степень извлечения (значение К) (активность; наблюдаемая) у указанной популяции пациентов составляет примерно 90 % от средней удельной степени извлечения полипептида, включающего указанный фактор VIII без модификации;

среднее значение V_{ss} (активность) у указанной популяции пациентов составляет примерно $55,1 \pm 12,3$ мл/кг;

среднее значение V_{ss} (активность) у указанной популяции пациентов составляет примерно 45,3-56,1 мл/кг;

среднее значение AUC/дозу (активность) у указанной популяции пациентов составляет примерно $49,9 \pm 18,2$ МЕ·ч/дл на МЕ/кг;

среднее значение AUC/дозу (активность) у указанной популяции пациентов составляет примерно 44,8-57,6 МЕ·ч/дл на МЕ/кг.

"Лечение по необходимости" при использовании в этом документе означает лечение, которое проводится в течение короткого периода времени и в ответ на существующее состояние, такое как эпизод кровотечения, или при осознанной необходимости, например, при плановой хирургической операции. Состояния, которые могут требовать проведения лечения по необходимости, включают, например, эпизод кровотечения, гемартроз, кровоизлияние в мышцу, кровоизлияние в ротовой полости, кровотечение, кровотечение в мышцах, кровотечение в ротовой полости, травму, trauma capitis (травму головы), кровотечение в желудочно-кишечном тракте, внутричерепное кровотечение, внутрибрюшное кровотечение, внутригрудное кровотечение, перелом кости, кровоизлияние в центральной нервной системе, кровотечение в заглоточной области, кровотечение в забрюшинной области или кровотечение во влагалище подвздошно-поясничной мышцы. Субъекту может быть необходима хирургическая профилактика, периоперационное лечение или лечение повреждений, возникших при проведении хирургического вмешательства. Такие хирургические операции включают, например, малое хирургическое вмешательство, обширное оперативное вмешательство, удаление зуба, удаление миндалин, грыжесечение паховой грыжи, синовэктомия, полную замену коленного сустава, краниотомию, остеосинтез, хирургическое вмешательство при травме, внутричерепное хирургическое вмешательство, внутрибрюшное хирургическое вмешательство,

внутригрудное хирургическое вмешательство или хирургическую замену сустава.

Предпочтительно лечение по необходимости устраняет более чем 80% (более чем 80%, более чем 81%, более чем 82%, более чем 83%, более чем 84%, более чем 85%, более чем 86%, более чем 87%, более чем 88%, более чем 89%, более чем 90%, более чем 91%, более чем 92%, более чем 93%, более чем 94%, более чем 95%, более чем 96%, более чем 97%, более чем 98%, более чем 99% или 100%) или 80-100%, 80-90%, 85-90%, 90-100%, 90-95% или 95-100% кровотечений (например, спонтанных кровотечений) с помощью разовой дозы. Предпочтительно более чем 80% (более чем 81%, более чем 82%, более чем 83%, более чем 84%, более чем 85%, более чем 86%, более чем 87%, более чем 88%, более чем 89%, более чем 90%, более чем 91%, более чем 92%, более чем 93%, более чем 94%, более чем 95%, более чем 96%, более чем 97%, более чем 98% или 100%) или 80-100%, 80-90%, 85-90%, 90-100%, 90-95% или 95-100% эпизодов кровотечений имеют, согласно оценке врачей, оценку отлично или хорошо после лечения по необходимости. Предпочтительно более чем 5%, (более чем 6%, более чем 7%, более чем 8%, более чем 9%, более чем 10%, более чем 11%, более чем 12%, более чем 13%, более чем 14%, более чем 15%, более чем 16%, более чем 17%, более чем 18%, более чем 19%, более чем 20%), или 5-20%, 5-15%, 5-10%, 10-20% или 10-15% эпизодов кровотечений оцениваются врачами как благоприятные после лечения по необходимости.

"Полипептид", "пептид" и "белок" используются как взаимозаменяемые и означают полимерное соединение, состоящее из ковалентно связанных аминокислотных остатков.

"Полинуклеотид" и "нуклеиновая кислота" используются как взаимозаменяемые и означают полимерное соединение, состоящее из ковалентно связанных нуклеотидных остатков. Полинуклеотиды могут представлять собой ДНК, кДНК, РНК, одноцепочечные или двуцепочечные, векторы, плазмиды, фаги или вирусы. Полинуклеотиды включают, например, таковые, перечисленные в табл. 1, которые кодируют полинуклеотиды из табл. 2 (см. табл. 1). Полинуклеотиды также включают, например, фрагменты полинуклеотидов из табл. 1, например, фрагменты, которые кодируют фрагменты полипептидов из табл. 2, такие как фактор VIII, Fc, сигнальную последовательность, bHis и другие фрагменты полипептидов из табл. 2.

"Профилактическое лечение" при использовании в этом документе означает введение субъекту полипептида фактора VIII в виде множественных доз в течение определенного периода времени для повышения уровня активности фактора VIII в плазме субъекта. Предпочтительно, повышенный уровень является достаточным для снижения частоты спонтанных кровотечений или для предотвращения кровотечений, например, в случае непредвиденной травмы. Предпочтительно, во время профилактического лечения уровень белков в плазме субъекта не падает ниже исходного уровня для данного субъекта, или ниже уровня фактора VIII, который характерен для тяжелых случаев гемофилии (<1 МЕ/дл [1%]).

Предпочтительно, профилактический режим "подогнан" для конкретного пациента, предпочтительно, путем определения данных фармакокинетики для каждого пациента и введения фактора VIII по избранию с интервалом между введениями доз, который обеспечивает поддержание минимального уровня активности FVIII, равного 1-3%. Корректировки могут быть внесены, если субъект испытывает неприемлемые эпизоды кровотечения, определяемые как ≥ 2 спонтанных эпизодов кровотечений в течение непрерывного периода длительностью два месяца. В этом случае корректировка будет нацелена на получение минимальных уровней, равных 3-5%. Предпочтительно, профилактическое лечение приводит к предотвращению и контролю над кровотечением, длительному контролю над кровотечением, длительной защите от кровотечения и/или длительной пользе. Профилактика, например длительная защита, может быть продемонстрирована по повышению AUC в последней точке измерения (AUC-посл.) и снижению клиренса, приводящим к повышению терминального $t_{1/2}$, по сравнению с FVIII кратковременного действия. Предпочтительно, профилактику демонстрируют по улучшенным показателям C_{max} , улучшенным показателям T_{max} и/или более высокому значению среднего времени удержания, по сравнению с FVIII кратковременного действия. Предпочтительно, профилактика приводит к отсутствию эпизодов спонтанных кровотечений в течение примерно 24, 36, 48, 72 или 96 ч (например, 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, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 96, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 или 96 ч, предпочтительно в течение 72 ч) после инъекции (например, последней инъекции). Предпочтительно, профилактика приводит к более чем 30% (например, более чем 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, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 96, 87, 88, 89 или 90%, предпочтительно более чем 50%) среднему снижению среднегодового количества эпизодов кровотечения при режиме дозирования один раз в неделю (например, с дозой 65 МЕ/кг).

"Субъект" при использовании в этом документе означает человека или млекопитающего, отличного от человека. Млекопитающие, отличные от человека, включают, например, мышей, собак, приматов, обезьян, кошек, лошадей, коров, свиней и других домашних животных и мелких животных.

"Терапевтическая доза" при использовании в этом документе означает дозу, которая позволяет достигнуть терапевтической цели, как описано в этом документе. Вычисление необходимой дозировки фактора VIII основано на эмпирическом наблюдении того, что в среднем 1 МЕ фактора VIII на килограмм

массы тела повышает активность фактора VIII в плазме примерно на 2 МЕ/дл. Необходимую дозировку определяют с помощью следующей формулы:

Необходимое количество единиц = масса тела (кг) × требуемое повышение уровня фактора VIII (МЕ/дл или % от нормального) × 0,5 (МЕ/кг на МЕ/дл).

Терапевтические дозы, которые могут применяться в способах по изобретению, составляют от примерно 10-100 МЕ/кг, в частности, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90 или 90-100 МЕ/кг, и более конкретно, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 МЕ/кг.

Дополнительные терапевтические дозы, которые могут применяться в способах по изобретению, составляют от примерно 10 до примерно 150 МЕ/кг, в частности, примерно 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150 МЕ/кг, и более конкретно, примерно 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 или 150 МЕ/кг.

"Вариант" при использовании в этом документе означает полинуклеотид или полипептид, отличающийся от исходного полинуклеотида или полипептида, но сохраняющий его существенные свойства, например, коагуляционную активность фактора VIII или активность Fc (активность связывания с FcRn). В общем случае варианты в целом близко похожи и, по многим областям, идентичны исходному полинуклеотиду или полипептиду. Варианты включают, например, фрагменты полипептида и полинуклеотида, версии исходных полипептидов с делециями, вставками и модификациями.

Вариантные полинуклеотиды могут включать или, в соответствии с другим вариантом, состоять из нуклеотидной последовательности, которая, по меньшей мере, на 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична, например, кодирующей нуклеотидной последовательности в SEQ ID Nos: 1, 3, 5, 7, 9 или 11 (соответствующая фактору VIII часть, соответствующая Fc часть, по отдельности или вместе) или комплементарной ей нити, кодирующей нуклеотидной последовательности известного мутантного и рекомбинантного фактора VIII или Fc, такого как раскрытые в публикациях и патентах, цитируемых в этом документе, или комплементарной ей нити, нуклеотидной последовательности, кодирующей полипептид SEQ ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10 или 12 (соответствующая фактору VIII часть, соответствующая Fc часть, по отдельности или вместе), и/или фрагментам полинуклеотидов из любой из этих молекул нуклеиновой кислоты (например, фрагментам, описанным в этом документе). Полинуклеотиды, которые гибридизуются с этими молекулами нуклеиновой кислоты при жестких условиях гибридизации или мягких условиях гибридизации, также включены в качестве вариантов, так же как полипептиды, кодируемые этими полинуклеотидами, если они являются функционально активными.

Вариантные полипептиды могут включать или, в соответствии с другим вариантом, состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% идентична, например, полипептидной последовательности, представленной в SEQ ID Nos: 2, 4, 6, 8, 10 или 12 (соответствующая фактору VIII часть, соответствующая Fc часть, по отдельности или вместе) и/или фрагментам полипептидов из любого из этих полипептидов (например, фрагментам, описанным в этом документе).

Под нуклеиновой кислотой, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере, например, на 95%, "идентичную" референсной нуклеотидной последовательности, подразумевается, что нуклеотидная последовательность нуклеиновой кислоты идентична референсной последовательности, за исключением того, что нуклеотидная последовательность может содержать до пяти точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов референсной нуклеотидной последовательности. Иначе говоря, для получения нуклеиновой кислоты, имеющей нуклеотидную последовательность, по меньшей мере, на 95% идентичную референсной нуклеотидной последовательности, до 5% нуклеотидов в референсной последовательности могут быть делетированы или заменены другими нуклеотидами, или ряд нуклеотидов, в количестве до 5% от суммарного количества нуклеотидов в референсной последовательности, могут быть вставлены в референсную последовательность. Используемая в качестве запроса последовательность может являться, например, полной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 1 или 3, OPC (открытой рамкой считывания) или любым фрагментом, заданным, как описано в этом документе.

В частности, является ли конкретная молекула нуклеиновой кислоты или полипептид по меньшей мере на 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной нуклеотидной последовательности или полипептиду по настоящему изобретению, может быть определено стандартными способами с помощью известных компьютерных программ. Предпочтительным способом определения наибольшего соответствия между использованной в качестве запроса последовательностью (референсной или исходной последовательностью) и рассматриваемой последовательностью, также называемым глобальным выравниванием последовательностей, может служить способ определения с помощью компьютерной программы FASTDB, основанной на алгоритме Брутлага с соавт. Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. (1990) 6:237-245), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки). При выравнивании последовательностей обе последовательности - используемая в качестве запроса и рассматриваемая - являются последовательностями ДНК. Последовательность РНК может сравниваться с помощью замены всех остатков U на остатки T. Результат указанного глобального выравнивания последовательностей представлен в виде процента идентичности. Предпочтительные параметры, применяемый при выравнивании в FASTDB

последовательностей ДНК с целью вычисления процента идентичности, составляют: матрица=unitary (единичная), k-кортеж=4, штраф за несовпадение=1, штраф за соединение=30, длина группы рандомизации=0, пороговое значение оценки=1, штраф за внесение пропуска=5, штраф за размер пропуска 0,05, размер окна=500 или равен длине рассматриваемой нуклеотидной последовательности, в зависимости от того, что короче.

Если рассматриваемая последовательность короче, чем используемая для запроса последовательность из-за 5'- или 3'-делеций, а не из-за внутренних делеций, необходимо вручную внести корректировку в результаты. Это связано с тем, что программа FASTDB не учитывает укорочение по 5'- и 3'-концам рассматриваемой последовательности при расчете процента идентичности. В случае рассматриваемых последовательностей, укороченных по 5'- или 3'-концам, по сравнению с используемой для запроса последовательностью, процент идентичности корректируют, вычисляя количество оснований в используемой для запроса последовательности, которые находятся в положении с 5'- и 3'-конца относительно рассматриваемой последовательности, которые не участвуют в выравнивании, и выражая это количество как процент от суммарного количества оснований в используемой для запроса последовательности. Участвует ли нуклеотид в выравнивании, определяется по результатам выравнивания последовательностей в FASTDB. Этот процентный показатель затем вычитают из процента идентичности, вычисленного вышеупомянутой программой FASTDB с применением указанных параметров, с получением окончательной оценки процента идентичности. Для целей настоящего изобретения применяется именно эта скорректированная оценка. Для целей корректировки оценки процентной идентичности в ручном режиме подсчитывают только те основания, расположенные, согласно результатам выравнивания в FASTDB, вне границ 5'- и 3'-концов рассматриваемой последовательности, которые не участвуют в выравнивании с используемой для запроса последовательностью.

Например, производят выравнивание рассматриваемой последовательности длиной 90 оснований с используемой для запроса последовательностью длиной 100 оснований с целью определения идентичности. Делеций имеются на 5'-конце рассматриваемой последовательности и, следовательно, выравнивание в FASTDB не покажет выравнивание первых 10 оснований на 5'-конце. 10 не имеющих пары оснований представляют собой 10% последовательности (количество оснований на 5'- и 3'-концах, которые не имеют пары, деленное на суммарное количество оснований в используемой для запроса последовательности), таким образом, 10% вычитают из оценки процента идентичности, вычисленной программой FASTDB. Если оставшиеся 90 оснований будут полностью соответствовать друг другу, окончательная оценка процента идентичности составит 90%. В еще одном примере рассматриваемую последовательность длиной 90 оснований сравнивают с используемой для запроса последовательностью длиной 100 оснований. В этом случае делеции являются внутренними делециями, таким образом, что на 5'- или 3'-концах рассматриваемой последовательности нет оснований, которые не участвуют в выравнивании с используемой для запроса последовательностью. В данном случае процент идентичности, вычисленный программой FASTDB, не корректируют вручную. Повторим еще раз, что при корректировке вручную учитывают только те основания на 5'- и 3'-концах рассматриваемой последовательности, которые не участвуют в выравнивании с используемой для запроса последовательностью. Проводить другие корректировки в ручном режиме для целей настоящего изобретения не требуется.

Под полипептидом, имеющим аминокислотную последовательность, по меньшей мере, например, на 95% "идентичную" используемой для запроса аминокислотной последовательности по настоящему изобретению, подразумевается, что аминокислотная последовательность рассматриваемого полипептида идентична используемой для запроса последовательности, за исключением того, что последовательность рассматриваемого полипептида может содержать изменения до пяти аминокислот на каждые 100 аминокислот используемой для запроса аминокислотной последовательности. Иначе говоря, для получения полипептида, имеющего аминокислотную последовательность по меньшей мере на 95% идентичную используемой для запроса аминокислотной последовательности, вплоть до 5% аминокислотных остатков в рассматриваемой последовательности могут быть вставлены, делетированы (вставки или делеции) или заменены на другую аминокислоту. Эти изменения референсной последовательности могут производиться в аминоконцевом или карбоксиконцевом положениях референсной аминокислотной последовательности или в любых положениях между этими концевыми положениями, либо распределенных среди остатков референсной последовательности поодиночке, либо находящихся в виде одной или нескольких непрерывных групп в пределах референсной последовательности.

В частности, является ли конкретный полипептид по меньшей мере на 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичным, например, аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 2 (соответствующая фактору VIII часть, соответствующая Fc часть, по отдельности или вместе) или 4, или известной последовательности полипептидов фактора VIII или Fc, может быть определено стандартными способами с помощью известных компьютерных программ.

Предпочтительным способом определения наибольшего соответствия между использованной в качестве запроса последовательностью (референсной или исходной последовательностью) и рассматриваемой последовательностью, также называемым глобальным выравниванием последовательностей, может служить способ определения с помощью компьютерной программы FASTDB, основанной на алгоритме

Брутлага с соавт. (Brutlag et al., *Comp. App. Biosci.* 6:237-245 (1990), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки). При выравнивании последовательностей -используемой в качестве запроса и рассматриваемой - они либо обе являются нуклеотидными последовательностями, либо обе являются аминокислотными последовательностями. Результат указанного глобального выравнивания последовательностей представлен в виде процента идентичности. Предпочтительные параметры, применяемые для выравнивания аминокислотных последовательностей в программе FASTDB, следующие: матрица=РАМ 0, k-кортеж=2, штраф за несовпадение=1, штраф за соединение=20, длина группы рандомизации=0, пороговое значение оценки=1, размер окна=длине последовательности, штраф за внесение пропуска=5, штраф за размер пропуска 0,05, размер окна=500 или равен длине рассматриваемой аминокислотной последовательности, в зависимости от того, что короче.

Если рассматриваемая последовательность короче, чем используемая для запроса последовательность из-за N- или С-концевых делеций, а не из-за внутренних делеций, необходимо вручную внести корректировку в результаты. Это связано с тем, что программа FASTDB не учитывает укорочение N- и С-концов рассматриваемой последовательности при расчете общего процента идентичности. В случае рассматриваемых последовательностей, укороченных по N- или С-концам, по сравнению с используемой для запроса последовательностью, процент идентичности корректируют, вычисляя количество остатков в используемой для запроса последовательности, которые находятся в положении с N- и С-конца относительно рассматриваемой последовательности, которые не участвуют в выравнивании с соответствующей рассматриваемой последовательностью, и выражая это количество как процент от суммарного количества оснований в используемой для запроса последовательности. Участвует ли остаток в выравнивании, определяется по результатам выравнивания последовательностей в FASTDB. Этот процентный показатель затем вычитают из процента идентичности, вычисленного вышеупомянутой программой FASTDB с применением указанных параметров, с получением окончательной оценки процента идентичности. Для целей настоящего изобретения применяется именно эта оценка процента идентичности. Для целей корректировки оценки процентной идентичности в ручном режиме учитывают только те остатки, расположенные вне границ N- и С-концов рассматриваемой последовательности, которые не участвуют в выравнивании с используемой для запроса последовательностью. То есть, учитывают только остатки в используемой для запроса последовательности, которые находятся вне пределов, ограниченных самыми крайними остатками на N- и С-концах рассматриваемой последовательности.

Например, производят выравнивание рассматриваемой последовательности длиной 90 аминокислотных остатков с используемой для запроса последовательностью длиной 100 остатков с целью определения идентичности. Делеция имеется на N-конце рассматриваемой последовательности и, следовательно, выравнивание в FASTDB не показывает выравнивание первых 10 остатков на N-конце. 10 не имеющих пары остатков представляют собой 10% последовательности (количество остатков на N- и С-концах, которые не имеют пары, деленное на суммарное количество остатков в используемой для запроса последовательности), таким образом, 10% вычитают из оценки процента идентичности, вычисленной программой FASTDB. Если оставшиеся 90 остатков будут полностью соответствовать друг другу, окончательная оценка процента идентичности составит 90%. В еще одном примере рассматриваемую последовательность длиной 90 остатков сравнивают с используемой для запроса последовательностью длиной 100 остатков. В этом случае делеции являются внутренними делециями, таким образом, что на N- или С-концах рассматриваемой последовательности нет остатков, которые не участвуют в выравнивании с используемой для запроса последовательностью. В данном случае процент идентичности, вычисленный программой FASTDB, не корректируют вручную. Повторим еще раз, что при корректировке вручную учитывают только те основания на N- и С-концах рассматриваемой последовательности, которые, согласно результатам выравнивания в FASTDB, не участвуют в выравнивании с используемой для запроса последовательностью. Проводить другие корректировки в ручном режиме для целей настоящего изобретения не требуется.

Варианты полинуклеотидов могут содержать изменения в кодирующих областях, некодирующих областях или в обоих этих типах областей. Главным образом предпочтительными являются варианты полинуклеотидов, содержащие изменения, которые приводят к молчащим заменам, вставкам или делециям, но не изменяют свойства или активности кодируемого полипептида. Предпочтительными являются варианты нуклеотидов, представляющих собой результат молчащих замен из-за вырожденности генетического кода. Дополнительно, варианты, в которых 5-10, 1-5 или 1-2 аминокислоты заменены, делегированы или добавлены в любой комбинации, также являются предпочтительными. Варианты полинуклеотидов могут быть получены по различным причинам, например, для оптимизации экспрессии кодонов для конкретного организма-хозяина (замена кодонов в мРНК человека на кодоны, предпочтительно используемые бактерией-хозяином, например, *E. coli*).

Варианты, существующие в природе, называют "аллельными вариантами" и относят к одной из нескольких альтернативных форм гена, занимающего данный локус на хромосоме организма (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). Эти аллельные варианты могут варьировать на уровне как полинуклеотида, так и/или полипептида и включены в настоящее изобретение. В соответствии с другим вариантом, не встречающиеся в природе варианты могут быть получены с применением методик

мутагенеза или путем прямого синтеза.

С применением известных способов белковой инженерии и технологии рекомбинантных ДНК варианты могут быть получены с целью улучшения или изменения характеристик полипептидов. Например, одну или несколько аминокислот можно делетировать с N-конца или C-конца секретируемого белка без существенной потери биологической функции. Авторы работы Ron et al., *J. Biol. Chem.* 268: 2984-2988 (1993), содержание которой целиком включено сюда в качестве ссылки, сообщили о вариантных белках KGF, обладающих активностью связывания со шпилькой даже после делеции 3, 8 или 27 аминоконцевых аминокислотных остатков. Схожим образом, интерферон гамма демонстрировал до 10 раз более высокий уровень активности после делеции 8-10 аминокислотных остатков с карбоксильного конца этого белка. (Dobeli et al., *J. Biotechnology* 7:199-216 (1988), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки).

Дополнительно, достаточно большое количество данных демонстрирует, что варианты часто сохраняют биологическую активность, схожую с таковой у белков природного происхождения. Например, Гэйл с соавторами (Gayle and coworkers, *J. Biol. Chem.* 268:22105-22111 (1993), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки) провели всесторонний мутационный анализ цитокина человека IL-1 α . Они применили методику случайного мутагенеза для получения более 3500 индивидуальных мутантных форм IL-1 α , со средним количеством мутаций, равным 2,5 аминокислотным заменам на вариант при расчете на всю длину молекулы. В каждом пригодном положении аминокислот была проведена проверка множества мутаций. Исследователи обнаружили, что "большую часть молекулы можно было изменить с минимальным воздействием как на связывание, так и на биологическую активность" (см. резюме). Действительно, лишь 23 уникальные аминокислотные последовательности, из более чем 3500 проверенных нуклеотидных последовательностей, давали белок, который существенно отличался по активности от белка дикого типа.

Как указано выше, варианты полипептидов включают, например, модифицированные полипептиды. Модификации включают, например, ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение гемового остатка, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или производного липида, ковалентное присоединение фосфатидилинозитола, поперечная сшивка, циклизация, образование дисульфидной связи, деметилирование, образование ковалентной поперечной сшивки, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование, гамма-карбоксилирование, гликозилирование, образование гликозилфосфатидилинозитольного (GPI) якоря, гидроксилирование, йодирование, метилирование, миристилирование, окисление, пегилирование (Mei et al., *Blood* 116:270-79 (2010), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки), протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, селенирование, сульфатирование, опосредованное транспортной РНК добавление аминокислот в белки, такое, как аргинилирование, и убиквитиление. В некоторых вариантах воплощения фактор VIII модифицирован, например, пегилирован, по любому подходящему положению. В некоторых вариантах воплощения фактор VIII пегилирован по аминокислоте фактора VIII, экспонированной на поверхности, предпочтительно по цистеину, экспонированному на поверхности, который может являться цистеином, внесенным с помощью генно-инженерных методов. Mei et al. (2010). В некоторых вариантах воплощения модифицированный фактор VIII, например, пегилированный фактор VIII, является фактором длительного действия.

"Объем распределения в равновесном состоянии (Vss)" при использовании в этом документе имеет то же значение, что и термин, применяемый в фармакологии, то есть, это кажущееся пространство (объем), в котором распределяется лекарственное средство. Vss = количеству лекарственного средства в теле, поделенному на его концентрацию в плазме в равновесном состоянии.

"Примерно" при использовании в этом документе при указании диапазона относится к обеим границам этого диапазона. Таким образом, "примерно 10-20" означает "от примерно 10 до примерно 20".

После подробного описания настоящего изобретения для более полного его понимания приведены следующие примеры, которые включены в этот документ только с целями иллюстрации и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. Все патенты и публикации, на которые даны ссылки в этом документе, специально включены сюда в качестве ссылок.

Пример 1. Резюме.

Химерный белок рекомбинантного фактора VIII с делетированным В-доменом и Fc (rFVIII_{FC}) создали для увеличения периода полувыведения FVIII. rFVIII_{FC} исследовали в моделях сильной гемофилии А у мышей и собак и сравнили с rFVIII (РеФакто®). Время свертывания цельной крови (WBCT) у мышей с гемофилией А было скорректировано с увеличением примерно в два-три раза, и период полувыведения из плазмы был примерно в два раза больше в случае применения rFVIII_{FC}, по сравнению с РеФакто®. У собак с гемофилией А внутривенная доза rFVIII_{FC} (125 МЕ/кг) скорректировала WBCT до нормального уровня. Показатель WBCT сохранялся на уровне менее 20 мин, что соответствует соотношению FVIII:C >1%, в течение примерно 96 ч, по сравнению с 48 ч в случае, если собакам вводили РеФакто®. Период полувыведения rFVIII_{FC} из плазмы у собак, при измерении с применением ELISA или хромогенного ана-

лиза активности, составил $15,7 \pm 1,7$ ч и $15,4 \pm 0,3$ ч, соответственно. Скорректированный посредством Ре-Факто® показатель WBCT примерно в два раза длиннее, чем rFVIII_{Fc}, и период полувыведения из плазмы составил 7,0 ч. Таким образом, слияние FVIII с Fc позволило получить молекулу с увеличенным периодом полувыведения и способностью обеспечивать более длительную защиту от кровотечений.

Введение.

Снижение смертности, предотвращение повреждения суставов и улучшение качества жизни являются важными достижениями, которые стали возможны благодаря разработке способов получения FVIII из плазмы и рекомбинантного FVIII. Более длительная защита от кровотечения была бы еще одним ключевым этапом улучшения лечения пациентов с гемофилией А. Авторы изобретения создали химерный белок рекомбинантного фактора FVIII и Fc (rFVIII_{Fc}) и его гибрид с целью увеличения периода полувыведения у FVIII.

rFVIII_{Fc} является гетеродимерным гибридным белком, состоящим из FVIII с делетированным В-доменом, рекомбинантно сшитого Fc-доменом иммуноглобулина человека G1 (IgG1) (фиг. 1, SEQ ID NO: 2; табл. 2А) (этот белок также называется в этом документе химерным белком FVIII_{Fc} и мономерного Fc, мономерным гибридом FVIII_{Fc}, гибридом мономерного FVIII_{Fc} и FVIII_{Fc}-мономер-димером). Домен Fc придает способность связываться с неонатальным рецептором Fc (FcRn), что обеспечивает защиту IgG от деградации и придает IgG свойство обладания периодом полувыведения, равным трем неделям, который наблюдается у человека (Ghetie V, and Ward ES., *Annu. Rev. Immunol.* 2000;18:739-766; Roopenian DC. and Akilesh S., *Nature Rev. Immunol.* 2007;7:715-725, содержание каждой из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки).

Домен Fc из состава IgG1 сшивали с факторами роста, цитокинами, ферментами и лиганд-связывающими областями рецепторов (Ashkanazi A, et al., *Int. Rev. Immunol.* 1993;10:219-27; Chamow SM, and Ashkanazi A, *Trends Biotechnol.* 1996;14:52-60; Fisher et al., *N. Engl. J. Med.* 1996;334(26): 1697-702, содержание каждой из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки). Некоторые из этих полученных белков стали важными терапевтическими молекулами (например, этанерцепт, алефацепт, абатацепт). В этих химерных белках две эффекторные молекулы соединены с двумя молекулами Fc. В данном примере rFVIII_{Fc} был сконструирован как мономерный химерный белок с Fc (одна копия полипептида, состоящего из последовательности, приведенной в табл. 2А (i) (SEQ ID NO: 2) с сигнальной последовательностью или без нее, и одна копия полипептида, состоящего из последовательности, приведенной в табл. 2А (ii) (SEQ ID NO: 4) с сигнальной последовательностью или без нее), т.е., только с одной копией эффекторной молекулы (см. фиг. 1), и в исследованиях, представленных в этом документе, проводится сравнение фармакодинамики и фармакокинетики этого нового белка с rFVIII на моделях гемофилии А у мышей и собак. Сигнальная последовательность отщепляется во время секреции. Эту белковую конструкцию называют в этом документе химерным белком FVIII_{Fc} и мономерного Fc, мономерным гибридом FVIII_{Fc}, гибридом мономерного FVIII_{Fc} и FVIII_{Fc}-мономер-димером. Структуру и получение этого белка см. в примере 1, на фиг. 1, в табл. 2А; и в патентах США №№ 7 404 956 и 7 348 004, содержание каждого из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки.

Методы и материалы.

Препараты FVIII.

Рекомбинантный FVIII_{Fc}.

Кодирующую последовательность рекомбинантного FVIII человека с делетированным В-доменом получили с помощью обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) на матрице полиА-содержащей РНК печени человека (Clontech), используя праймеры, специфичные для FVIII. Последовательность FVIII содержит нативную сигнальную последовательность для FVIII. Делеция В-домена захватывает область с серина 743 (S743; 2287 п.н.) по глутамин 1638 (Q1638; 4969 п.н.), суммарная длина делеции 2682 п.н. Структуру и получение этого белка см. в примере 1, на фиг. 1, в табл. 2А; и в патентах США №№ 7 404 956 и 7 348 004, содержание каждого из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки.

Кодирующую последовательность рекомбинантного Fc человека получили с помощью ОТ-ПЦР, используя библиотеку кДНК лейкоцитов человека (Clontech) и специфичные для Fc праймеры. Праймеры были сконструированы таким образом, чтобы последовательность FVIII с делетированным В-доменом была сшита непосредственно с N-концом последовательности Fc, без вставочного линкера. ДНК-последовательность FVIII_{Fc} клонировали в челночный экспрессионный вектор для клеток млекопитающих pBUDCE4.1 (Invitrogen) под контролем промотора CMV. Вторую идентичную последовательность Fc, содержащую сигнальную последовательность из Igk мыши, получили с помощью ОТ-ПЦР и клонировали ниже по течению от второго промотора, EF1α, в экспрессионном векторе pBUDCE4.1.

Экспрессионный вектор для rFVIII_{Fc} трансфецировали в клетки эмбриональной почки человека 293 (HEK293H; Invitrogen), применяя реагент для трансфекции Липофектамин 2000 (Invitrogen). Клеточные линии со стабильными клонами были получены с помощью селекции зеоцином (Invitrogen). Одну клеточную линию клонов, 3C4-22, применяли для получения FVIII_{Fc} с целью определения его характеристик *in vivo*. Рекомбинантный FVIII_{Fc} получали и подвергали очистке (McCue JT, et al., *J. Chromatogr. A*

2009;7824-7830, содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки) в компании Biogen Idec (Кембридж, Массачусетс, США). Ожидалось, что описанная выше стратегия трансфекции обеспечит выход трех продуктов, т.е., мономерного гибрида rFVIII_{Fc}, димерного гибрида rFVIII_{Fc} и димерного Fc. Однако в кондиционированной среде, полученной от этих клеток, практически не детектировался димерный гибриды rFVIII_{Fc}. Кондиционированная среда в основном содержала Fc и мономерный гибриды rFVIII_{Fc}. Возможно, размер димерного гибрида rFVIII_{Fc} слишком велик, и это препятствует эффективной секреции из клетки. Этот результат был благоприятным, так как он позволил упростить процесс очистки мономера, по сравнению с ситуацией, когда присутствовали бы все три белка. Материал, который применяли в данных исследованиях, обладал специфичной активностью примерно 9000 МЕ/мг. Кроме того, эти клетки человека продуцировали более высокий уровень белка, чем другие клетки, которые были протестированы в данном эксперименте.

Рекомбинантный FVIII.

Рекомбинантный FVIII с deletированным В-доменом (РеФакто®) приобрели в компании Novis Pharmaceuticals и подготовили в соответствии с указаниями производителя. РеФакто® (рекомбинантный FVIII с deletированным В-доменом) имеет ту же аминокислотную последовательность, что и последовательность аминокислот с 1 по 1438 в составе SEQ ID NO: 2.

Животные с гемофилией А.

Мыши с гемофилией А являются нокаутными по экзону 16 гена FVIII на генетическом фоне 129×B6, были получены от д-ра Казизиан (Kazazian) из Университета Пенсильвании (Bi L, et al., Nat. Genet. 1995; 10(1): 119-121, содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки) и выращены в компании Syntonix. Эти мыши демонстрируют увеличенное время свертывания цельной крови (> 60 мин) и, таким образом, являются удобной моделью тяжелой гемофилии А.

Собаки с гемофилией А были из колонии, полученной в результате близкородственного скрещивания в лаборатории Francis Owen Blood Research Laboratory Университета Северной Каролины в Чапел-Хилле (Graham, JB, et al., J. Exp. Med. 1949;90:97-111, содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки). Эти собаки обладают фенотипом тяжелой степени гемофилии, сопоставимой с тяжелой формой заболевания у человека (Graham, JB, et al., J. Exp. Med. 1949;90:97-111; Lozier, JN, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 2002;99:12991-12996, содержание каждой из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки).

Дизайн исследований.

Исследования на мышах с гемофилией А.

Влияние rFVIII_{Fc} и РеФакто® на время свертывания цельной крови (WBCT) исследовали у дефицитных по FVIII мышей. Каждый белок вводили внутривенно при дозе 50 МЕ/кг и отбирали пробы крови из хвостовой вены у каждой мыши до введения препарата и в различных временных точках после введения препарата. Пробы крови инкубировали в микропробирках при 37°C и визуально оценивали с частотой один раз в минуту на наличие сгустка. Время образования сгустка записывали. Если в течение 60 мин сгусток не образовывался, время свертывания записывали как >60 мин. Кровь, полученная от нормальных мышей, сворачивается примерно через 4 мин (диапазон 2-7 мин, n = 10 мышей), согласно анализу WBCT.

Во второй серии испытаний мышам с гемофилией А вводили разовую внутривенную дозу 50 МЕ/кг препаратов rFVIII_{Fc}, РеФакто® или Адвейт® (по 4 мыши на каждую временную точку). Пробы крови отбирали с помощью пункции сердца в одну десятую объема 3,2% цитрата натрия во временных точках 0,25, 8, 24, 48 и 72 ч после введения дозы. Плазму приготавливали и хранили при -80°C до проведения исследования активности FVIII с применением хромогенного анализа активности, специфичной для FVIII.

Исследования на собаках с гемофилией А.

В исследовании фармакокинетики и фармакодинамики rFVIII_{Fc} с разовой дозой двум собакам с гемофилией А из колонии из Чапел-Хилла вводили разовую внутривенную дозу 125 МЕ/кг и отбирали пробы крови до введения препарата и после введения препарата в выбранных временных точках для определения WBCT, активированного частичного тромбопластинового времени (АПТВ), концентрации FVIII_{Fc} в плазме, гематологических параметров и проведения биохимического анализа сыворотки. Временные точки для определения WBCT включали точку до введения препарата, 5 и 30 мин и 1, 2, 4, 8, 24, 32, 48, 72, 96, 144 и 168 ч после введения препарата. Отбор проб крови для определения активности свертывания (АПТВ) и концентрации FVIII_{Fc} в плазме проводили во временных точках, перечисленных выше для WBCT, а также в точках 15 мин и 3, 6, 12 ч после введения препарата.

Во втором исследовании РеФакто® (114 МЕ/кг для собаки M12 и 120 МЕ/кг для собаки M38) вводили внутривенно. WBCT измеряли до момента достижения времени свертывания ≥20 мин (соответствует соотношению FVIII:C >1%) и затем вводили 125 МЕ/кг rFVIII_{Fc} внутривенно тем же собакам и отбирали пробы крови для определения WBCT, АПТВ, концентрации FVIII_{Fc} в плазме, гематологических параметров и проведения биохимического анализа сыворотки. Временные точки для определения WBCT включали точку до введения препарата, 5 и 30 мин и 1, 2, 4, 8, 24, 32, 48, 72 ч после введения препарата.

Пробы крови также отбирали через 96, 120, 144 и 168 ч после введения FVIII_{FC}. Отбор проб крови для определения активности свертывания и концентрации FVIII_{FC} в плазме проводили во временных точках, перечисленных выше для WBCT, а также в точках 15 мин и 3, 6, 12 ч после введения препарата.

Методика определения WBCT у собак с гемофилией А немного отличалась от процедуры, применяемой для мышей с гемофилией А. После введения дозы rFVIII_{FC} или ReFacto® один миллилитр крови отбирали в различных временных точках и распределяли по 0,5 мл в две силиконизированные стеклянные пробирки, которые затем помещали в водяную баню с температурой 28°C. Начиная с точки одна минута, одну пробирку опрокидывали каждые 30 с, а вторую не трогали. Когда в опрокидываемой пробирке образовывался сгусток, начинали опрокидывать вторую пробирку каждые 30 с до образования сгустка. Время образования явно выраженного сгустка во второй пробирке записывали как WBCT.

Активность FVIII в плазме.

Измерение активности FVIII в плазме с помощью хромогенного анализа активности, специфичной для FVIII

Пробы плазмы испытывали на активность FVIII с помощью автоматизированного хромогенного метода, используя прибор Sysmex CA1500 и реагенты, приобретенные в компании Siemens Healthcare Diagnostics (Даллас, Техас, США; набор № B4238-40). Активность rFVIII_{FC} определяли, используя стандартную кривую, построенную для концентрата 7го международного стандарта фактора FVIII (код NIBSC: 99/678), добавленного в плазму человека, очищенную от FVIII (Stago USA) в концентрациях, находящихся в диапазоне 1,5 - 0,016 МЕ/мл.

Измерение уровня rFVIII_{FC} или FVIII с помощью ELISA.

Измерение FVIII_{FC} в плазме собак с помощью ELISA.

Антителом против FVIII, специфичным к A1-домену (Green Mountain Antibodies: GMA-8002) покрыли 96-луночные планшеты и инкубировали в течение 1 ч при 37°C.

Покрытые антителом планшеты блокировали трис-буферным раствором хлорида натрия, содержащим Tween 20, CaCl₂ и бычий сывороточный альбумин, в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем стандарты, контроли и экспериментальные пробы, приготовленные в нормальной плазме собак, развели 1:10 и потом добавили в планшеты и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Планшеты промывали и затем добавляли антитела ослы (F(ab')₂) против Fc человека, конъюгированные с HRP (Jackson: 709-036-098) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После отмывки добавляли в планшеты ТМБ (BioF_x, суперчувствительный субстрат: TMBS-0100-01), реакцию с участием субстрата останавливали кислотой и измеряли поглощение на спектрофотометре для прочтения многолуночных планшетов Spectra Max Plus (Molecular Devices) при 450 нм.

Измерение уровня РеФакто® в плазме собак с помощью ELISA.

Антителом против FVIII, специфичным к A1-домену тяжелой цепи (Green Mountain Antibodies: GMA-8002) покрыли 96-луночные планшеты и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Покрытые антителом планшеты блокировали в течение 1 ч 37°C, а затем после промывки приготовили стандарты, контроли и экспериментальные пробы в нормальной плазме собак, развели 1:10 и добавили в планшеты и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем планшеты промыли и обработали детектирующим антителом, предварительно разбавленным антителом против FVIII, конъюгированным с пероксидазой хрена (Affinity Biologicals: F8C-EIA-D), и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. После отмывки добавляли в планшеты ТМБ (BioF_x, суперчувствительный субстрат: TMBS-0100-01) на 10 мин. Реакцию с участием субстрата останавливали кислотой и измеряли сигнал на спектрофотометре для прочтения многолуночных планшетов SpectraMax Plus (Molecular Devices) при длине волны 450 нм.

Измерение уровня фибриногена.

Концентрацию фибриногена в плазме измеряли в Esoterix (Research Triangle Park, Северная Каролина, США) с применением набора, который содержит реагент HemosIL™ PT-Fibrinogen-HS (Instrumentation Laboratory, Лексингтон, Массачусетс, кат. № 0008468210) и анализатор коагуляции ACL 7000 (Beckman Coulter), в соответствии с указаниями производителя.

Измерение уровня тромбоцитов.

Количество тромбоцитов подсчитывали в цельной крови с добавлением ЭДТА для предотвращения свертывания с применением автоматизированного способа, использующего гематологический анализатор Vet-ABC-Diff, запрограммированный с помощью видо-специфичной смарт-карты (SCIL Animal Care Co., Gurnee, IL).

Фармакокинетический анализ.

Фармакокинетические параметры вычисляли с применением анализа без учета компартментов, используя программное обеспечение WinNonlin от компании Pharsight, версию 5.2 (Маунтин-Вью, Калифорния, США). Фармакокинетические параметры включали максимальную концентрацию в плазме (C_{max}), площадь под кривой зависимости концентрации в плазме от времени (AUC), период полувыведения (t_{1/2}), объем распределения (Vss) и клиренс (Cl).

Результаты.

Рекомбинантный FVIII-Fc.

rFVIII-Fc является результатом рекомбинантной сшивки FVIII человека с deletированным В-доменом и Fc из состава IgG1 человека, без вставочной линкерной последовательности (rFVIII-Fc; фиг. 1).

Очищенный rFVIII-Fc обладал специфической активностью примерно 9000 МЕ/мг, согласно определению с применением хромогенного анализа активности. Рекомбинантный FVIII с deletированным В-доменом (РеФакто®) обладает заявленной специфичной активностью 9110-13700 МЕ/мг. Перевод специфической активности в единицы МЕ/нмоль для учета разницы в размерах между FVIII-Fc и РеФакто® (216 кДа и 170 кДа, соответственно) показывает, что два этих белка обладают приблизительно эквивалентными специфичными активностями (1970 МЕ/нмоль для rFVIII-Fc и 1521-2287 МЕ/нмоль для РеФакто®). Таким образом, на активность FVIII у rFVIII-Fc не влияет сшивка С-конца FVIII человека с N-концом Fc человека.

Введение препаратов мышам с гемофилией А.

Разовую дозу 50 МЕ/кг rFVIII-Fc или РеФакто® вводили внутривенно дефицитным по FVIII мышам ($n = 6$ на группу). Пробы крови отбирали до введения препарата и после введения препарата вплоть до точки 120 ч и определяли WBCT как указано в "Материалах и методах". Показатель WBCT на исходном уровне был более 60 мин. Данные репрезентативного эксперимента приведены на фиг. 2 и в табл. 3.

Непосредственно после введения дозы либо rFVIII-Fc, либо РеФакто®, значение WBCT корректировалось до 2-17 мин. Кровь мышей, получавших РеФакто®, потеряла способность к свертыванию к временной точке 42 ч, тогда как кровь всех мышей, получавших rFVIII-Fc, продолжала свертываться во временной точке 96 ч, кровь одной из шести мышей свертывалась во временной точке 113 ч, но кровь всех мышей потеряла способность к свертыванию к временной точке 120 ч. Эти данные предполагают, что длительность воздействия у rFVIII-Fc приблизительно в два - три раза дольше, чем у РеФакто®.

Хромогенную активность rFVIII-Fc, РеФакто® или Адвейт® (полноразмерного рекомбинантного FVIII) изучали на дефицитных по FVIII мышках после разовой внутривенной дозы 50 МЕ/кг. Пробы крови отбирали до введения препарата и после введения препарата во временных точках 8, 24, 48 и 72 ч. Активность, измеренная с применением хромогенного анализа активности, специфичной для FVIII, показана на фиг. 3. Фармакокинетические параметры представлены в табл. 4. Период полувыведения из циркуляции у rFVIII-Fc был примерно в 1,6-2 раза длиннее (11,1 ч), чем у Адвейт® (7 ч) и РеФакто® (5 ч). C_{max} составила $1,6 \pm 0,36$ МЕ/мл у rFVIII-Fc, по сравнению с $0,47 \pm 0,30$ МЕ/мл у Адвейт® и $0,67 \pm 0,44$ МЕ/мл у РеФакто®. Системная экспозиция rFVIII-Fc была значительно выше у rFVIII-Fc ($22,6 \text{ ч} \times \text{МЕ/мл}$), чем у РеФакто® ($6,94 \text{ ч} \times \text{МЕ/мл}$) и Адвейт® ($3,90 \text{ ч} \times \text{МЕ/мл}$), и клиренс у rFVIII-Fc был заметен ниже ($2,09 \text{ мл/ч/кг}$), чем у РеФакто® ($7,2 \text{ мл/ч/кг}$) и Адвейт® ($12,8 \text{ мл/ч/кг}$), у мышей с гемофилией А.

Введение препаратов собакам с гемофилией А.

Фармакодинамику (ФД) и фармакокинетику (ФК) rFVIII-Fc изучали на собаках с гемофилией А из колонии из Чепел-Хилла. Разовую внутривенную дозу 125 МЕ/кг rFVIII-Fc вводили каждой из четырех собак с гемофилией А, и показатель WBCT сразу же корректировался до нормального уровня (фиг. 4). Диапазон значений WBCT у собак в норме составляет 8-12 мин. Значение WBCT сохранялось на уровне менее 20 мин, т.е. времени, соответствующего соотношению FVIII:C $>1\%$, вплоть до примерно 96 ч, за исключением одной собаки, у которой значение WBCT было <20 мин вплоть до временной точки 72 ч. Кроме того, показатель АПТВ также сразу же корректировался до нормального уровня (табл. 6). Концентрацию rFVIII-Fc в плазме измеряли, используя специфичный метод ELISA, который был разработан для детекции как FVIII-части, так и Fc-части молекулы. Кривые зависимости концентрации в плазме от времени показаны на фиг. 5. Фармакокинетический анализ данных показал, что $t_{1/2}$ составило $15,7 \pm 1,7$ ч (табл. 5). Схожие результаты были получены, когда rFVIII-Fc измеряли с применением хромогенного анализа активности, специфичной для FVIII ($t_{1/2} = 15,4 \pm 0,3$ ч, табл. 5), и кривые зависимости концентрации в плазме от времени были сходными при использовании обоих способов (фиг. 5 и 6). После перевода данных по активности из МЕ/мл в нг/мл с помощью показателя специфичной активности rFVIII-Fc наблюдалась хорошая корреляция с данными анализа ELISA, и это демонстрирует, что белок, исследуемый с помощью анализа ELISA, был полностью активен.

Двум собакам, которым вводили rFVIII-Fc, также вводили разовую дозу РеФакто®, 114 МЕ/кг для собаки M12 и 120 МЕ/кг для собаки M38, за 72 ч до введения дозы rFVIII-Fc. WBCT и АПТВ корректировались до нормального уровня сразу же после введения дозы РеФакто®. Однако нормализация уровня WBCT после разовой дозы rFVIII-Fc продолжалась примерно в два раза дольше, чем в случае РеФакто® (фиг. 4). Более того, период полувыведения из плазмы rFVIII-Fc ($15,7 \pm 1,7$ ч) был примерно в два раза дольше для rFVIII-Fc, чем для РеФакто® (7,0 и 6,7 ч), когда концентрацию белков в плазме определяли с применением анализа ELISA (табл. 5). Схожие результаты были получены, когда показатели двух молекул измеряли по хромогенной активности, специфичной для FVIII.

Для оценки потенциального риска тромбогенности проводили измерение тромбоцитов и фибриногена. После введения дозы либо rFVIII-Fc, либо РеФакто®, количество тромбоцитов и концентрация фибриногена в плазме не изменялись по сравнению со значениями до введения препарата (данные не приво-

дятся).

Обсуждение.

Рекомбинантный FVIII_{Fc} продуцировали в клетках эмбриональной почки человека 293 (HEK293) из стабильно трансфицированной клеточной линии и очищали из клеточной культуральной среды. Продукция в линии клеток человека представляет собой существенное изменение в процессе изготовления, по сравнению с имеющимися в настоящее время на рынке продуктами rFVIII, которые продуцируются либо в клетках яичника китайского хомячка, либо в клетках почки новорожденного хомяка. Основанием для этого изменения было ожидание, что клетки человека лучше приспособлены для выполнения необходимых пост-трансляционных модификаций соответствующей FVIII части молекулы.

Перевод специфической активности в единицы МЕ/нмоль для учета разницы молекулярных масс rFVIII_{Fc} и рекомбинантного FVIII с deletированным В-доменом (РеФакто®) показывает, что два этих белка обладают приблизительно одинаковыми специфичными активностями (1970 МЕ/нмоль для rFVIII_{Fc} и 1521-2287 МЕ/нмоль для РеФакто®). Примечательно, что на специфичную активность rFVIII_{Fc} не влияет сшивка С-конца FVIII с N-концом Fc, так как C1 и C2 домены в составе FVIII участвуют в связывании с фосфолипидами, которое существенно для проявления полной активности FVIII (Fay, PJ, J. Hematology 83:103-8 (2006) и Raut, S, et al., Br. J. Haematol. 107:323 (1999), содержание каждой из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки).

Лечение гемофилии А проводят по необходимости, во время эпизода кровотечения, или для профилактики с целью предотвращения кровотечения. Хотя лечение по необходимости все еще часто применяется, имеется тенденция в сторону профилактики и предотвращения повреждения суставов (Blanchette P, et al., Haemophilia 2004; 10:679-683, Manco-Johnson, MJ, et al., N. Engl. J. Med. 2007;357:535-544, содержание каждой из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки). Доступные в настоящее время продукты FVIII вводят каждые два - три дня с целью профилактики из-за относительно короткого периода полувыведения 10-12 ч, с целью поддержания у пациентов соотношения FVIII: С выше 1 % (Morfini, M, Haemophilia 2003;9 (suppl 1):94-99;discussion 100, White GC, et al., Thromb. Haemost. 1997;77:660-7, Blanchette, P, et al., J. Thromb. Haemost. 2008 Aug;6(8): 1319-26, содержание каждой из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки). Лекарственные препараты FVIII длительного действия, которые обеспечивают продолжительную защиту от кровотечения, являлись бы существенным улучшением качества жизни для пациентов с гемофилией А. Стратегии увеличения периода полувыведения факторов свертывания крови включают стратегии, которые уже были успешно применены для других молекул, в том числе - пегилирование (Rostin J, et al., Bioconj. Chem. 2000; 11:387-96, содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки), гликопегилирование (Stennicke HR, et al., Thromb. Haemost. 2008; 100:920-8, содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки), применение лекарственной формы с пегилированными липосомами (Spira J, et al., Blood 2006;108:3668-3673, Pan J, et al., Blood 2009;114:2802-2811, содержание каждой из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки) и конъюгацию с альбумином (Schulte S., Thromb. Res. 2008; 122 Suppl 4:S14-9, содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки). Пегилирование представляет собой способ снижения клиренса, однако, влияние модификации в системе *in vivo* в настоящее время неизвестно. Результат прямого пегилирования FVIII на его свойства *in vivo* в настоящее время не выяснен, тогда как FVIII в составе лекарственной формы с пегилированными липосомами был клинически исследован, и было показано, что наблюдается умеренное влияние на периоды кровотечения или влияние отсутствует (Spira J, et al., Blood 2006; 108:3668-3673, Spira J, et al., Thromb. Haemost. 2008 Sep;100(3):429-34, содержание каждой из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки).

Примененный в этом изобретении способ увеличения периода полувыведения FVIII состоял в рекомбинантной сшивке FVIII с Fc-доменом из IgG1. Fc связывается с встречающимся в природных условиях рецептором, FcRn, нормальная функция которого состоит в защите IgG от деградации. Результаты, описанные в этом документе, представляют начальное определение фармакокинетических параметров и эффективности для rFVIII_{Fc}, по сравнению с rFVIII-содержащим продуктом, у мышей с гемофилией А и собак с гемофилией А. У обоих видов период полувыведения rFVIII_{Fc} был примерно в два раза больше, чем у rFVIII, при измерении активности FVIII или анализа ELISA (только у собак). Эти данные также хорошо коррелировали с результатами по WBCT для обеих моделей на животных, т.е., длительность воздействия rFVIII_{Fc} на WBCT была примерно в два раза дольше, по сравнению с РеФакто®. У собак C_{max} и клиренс были схожими для rFVIII_{Fc} и РеФакто®, но AUC и объем распределения в равновесном состоянии были примерно в 1,5 раза и 2 раза выше для rFVIII_{Fc}, по сравнению с РеФакто®, соответственно. Фармакокинетические параметры для РеФакто® в этой модели на животных согласуются со значениями, опубликованными в литературных источниках (Brinkhous K, et al., Sem. Thromb. Haemost. 2002;28:269-272, содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки).

Если эти результаты транслировать на увеличение в той же степени периода полувыведения у человека, это могло бы служить существенным прогрессом в лечении пациентов с гемофилией А.

Дополнительные ссылки на литературные источники (содержание каждого из которых целиком

включено сюда в качестве ссылки):

- Berkner K, *Methods Enzymol.* 1993;222:450-477.
 Bitonti AJ, and Dumont JA., *Adv. Drug Del. Rev.* 2006;58:1106-1118.
 Dumont JA, et al., *J. Aerosol Med.* 2005;18:294-303.
 Dumont JA, et al., *BioDrugs* 2006;20:151-160.
 Ellis CN, and Krueger GG., *N. Engl. J. Med.* 2001; 345:248-55.
 Low SC. et al., *HumReprod.* 2005;7:1805-1813.
 Manco-Johnson, M., *Haemophilia* 2007; 13 Suppl;2: 4-9.
 Mannucci. PM, and Tuddenham. EGD., *N. Engl. J. Med.* 2001;344:1773-1779.
 Peyvandi F, et al., *Haemophilia* 2006;12(Suppl 3):82-89.
 Rodriguez-Merchan. EC, *Semin. Thromb. Hemost.* 2003;29:87-96.
 Srouf MA, et al., *Ann. Hematol.* 2008; 87:107-12.

Пример 2.

Целью данного исследования было определение фармакокинетических и фармакодинамических параметров rFVIII^{FC} и BDD-rFVIII (Ксинта®) у яванских макаков после разовой внутривенной дозы.

Материалы и методы.

rFVIII^{FC} (Biogen Idec) поставляется в виде замороженной жидкости с концентрацией 1,2 мг/мл, и 9882 МЕ/мл. Специфичная активность составляет 8235 МЕ/мг. Хранили при -70°C. Перед инъекцией разводили.

Название: Ксинта (Novis Pharmaceuticals), поставляется в виде лиофилизированного порошка, который восстанавливали в соответствии с указаниями производителя для получения раствора с номинальной концентрацией 525 МЕ/мл. Хранили в соответствии с рекомендациями производителя.

Животные.

Яванские макаки были из колонии из New Iberia Research Center (NIRC), и исследование (NIRC, исследование № 8733-0903) проводили согласно утвержденному NIRC IACUC протоколу (APS 2008-8733-058) в NIRC в Нью-Иберия, Луизиана, США.

В данном исследовании использовали шесть наивных яванских макаков (три самца, три самки), которые были здоровы, согласно осмотру.

Исследование проводили в соответствии с протоколом и стандартной операционной процедурой UL Lafayette-NIRC.

Дизайн исследования.

rFVIII^{FC} вводили внутривенно в дозе 125 МЕ/кг каждой из шести обезьян (трем самцам, трем самкам). Ксинта (BDD-rFVIII) вводили внутривенно тем же животным в дозе 125 МЕ/кг согласно дизайну перекрестного исследования. Животные в группе 1 (n = 3) получали Ксинта в 0 день и rFVIII^{FC} на 3 день, тогда как животные в группе 2 (n = 3) получали rFVIII^{FC} в 0 день, а затем - Ксинта на 4 день. Дополнительный день между дозами в группе 2 был необходим для того, чтобы быть уверенными, что времени достаточно для снижения содержания rFVIII^{FC} ниже исходного уровня в начале проекта. Пробы крови для исследования плазмы отбирали в одну десятую объема 3,2% цитрата натрия от каждого животного до введения препарата и во временных точках 0,25, 4, 12, 24, 36, 48 и 72 ч после введения препарата с целью определения rFVIII^{FC} или Ксинта с применением анализа ELISA или хромогенного анализа активности, специфичной для FVIII.

Анализ ELISA для определения rFVIII^{FC} и FVIII в плазме.

Способ измерения содержания rFVIII^{FC} в плазме, полученной от обезьян Разработан способ твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) для количественного определения rFVIII^{FC} в плазме обезьян. В этом способе ELISA антитело козла против IgG-(H+L) человека (после этапа абсорбции антителами обезьяны), приобретенное в компании Bethyl Laboratories (кат. № A80-319A), разбавляют буфером для нанесения покрытия и иммобилизуют на 96-луночный титрационный микропланшет. Из планшета отсасывают жидкость и все неабсорбированные участки блокируют добавлением блокирующего буфера (3% БСА/1х трис) примерно на 2 ч при 37°C. Пробы плазмы разбавляют 1:20 буфером для разбавления проб с высокой концентрацией кальция (3% обезжиренное сухое молоко/TBST с 30 mM CaCl₂) и наносят на планшет. Планшеты инкубируют в течение примерно 2 ч при 37°C. Затем планшет промывают и добавляют в него антитело мыши против фактора VIII с deletированным В-доменом (α.BDDA1) (A1-домен) от компании Green Mountain Antibodies (кат. № GMA-8002) и инкубируют в течение примерно 1 ч при 37°C. После промывки планшета в него добавляют конъюгированное с HRP антитело козла против IgG2a мыши от компании Southern Biotech (кат. № 1080-05) и инкубируют в течение примерно 30 мин при комнатной температуре. Планшет промывают еще раз и добавляют раствор субстрата пероксидазы - тетраметилпродамина (ТМБ), и инкубируют в течение примерно 30 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливают добавлением не содержащего кислоты стоп-раствора. Развитие окраски про-

порционально количеству rFVIII_{FC}, присутствующего в пробе. Планшеты прочитывают на спектрофотометре для определения поглощения в многолуночных планшетах, используя для детекции одну длину волны: 650 нм. Концентрацию rFVIII_{FC} определяли по стандартной кривой, полученной при построении графика зависимости оптической плотности (OD) от концентрации с применением программы для вычерчивания по точкам четырехпараметрической логистической кривой. Диапазон калибровочной кривой в данном способе составляет 0,400 нг/мл - 51,2 нг/мл в 5% плазме обезьян (8,00 нг/мл - 1024 нг/мл в 100% плазме обезьян). Можно включить один калибровочный маркер, находящийся вне определенного диапазона аналитического способа - при 0,200 нг/мл в 5% плазме обезьян, с целью использовать его как точку привязки для облегчения вычерчивания кривой по точкам. Точку привязки удаляют или сохраняют, исходя из наилучшего варианта подобранной кривой (т.е., варианта, при котором больше всего стандартов дают значения в пределах заданной точности, % относительной погрешности).

Способ измерения содержания FVIII в плазме, полученной от обезьян.

Разработан способ твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) для количественного определения FVIII в плазме обезьян. В этом способе ELISA антитело мыши против aBDDaI FVIII, приобретенное в компании Green Mountain Antibodies (кат. № GMA-8002), разбавляют буфером для нанесения покрытия и иммобилизуют на 96-луночный титрационный микропланшет. Из планшета отсасывают жидкость и все неабсорбированные участки блокируют добавлением блокирующего буфера (3% BSA/1x трис) примерно на 1 ч при 37°C. Пробы плазмы разбавляют 1:20 буфером для разбавления проб с высокой концентрацией кальция (блокирующий буфер со 100 mM CaCl₂) и наносят на планшет. Планшеты инкубируют в течение примерно 2 ч при 37°C. Затем планшет промывают, детектирующее антитело из набора Affinity Biologicals, конъюгированное с HRP поликлональное антитело (кат. № F8C-EIA-D), дополнительно разбавляют в TBS/0,05% Tween 20 и добавляют в планшет и инкубируют в течение примерно 1 ч при комнатной температуре. Планшет промывают еще раз и добавляют раствор субстрата пероксидазы - тетраметилпродамина (ТМБ) и инкубируют в течение примерно 30 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливают добавлением кислотного стоп-раствора. Развитие окраски пропорционально количеству FVIII_{FC}, присутствующего в пробе. Планшеты прочитывают на спектрофотометре для определения поглощения в многолуночных планшетах, используя для детекции одну длину волны: 450 нм. Концентрацию FVIII определяют по стандартной кривой, полученной при построении графика зависимости оптической плотности (OD) от концентрации с применением программы для вычерчивания по точкам четырехпараметрической логистической кривой. Диапазон калибровочной кривой в данном способе составляет 0,625 нг/мл - 20 нг/мл в 5% плазме обезьян (12,5 нг/мл - 400 нг/мл в 100% плазме обезьян). Можно включить два калибровочных маркера, находящихся вне определенного диапазона аналитического способа - при 0,313 и 0,156 нг/мл в 5% плазме обезьян, с целью использовать их как точки привязки для облегчения вычерчивания кривой по точкам. Точки привязки можно удалять или сохранять, исходя из наилучшего варианта подобранной кривой (т.е., варианта, при котором больше всего стандартов дают значения в пределах заданной точности, % относительной погрешности).

Хромогенный анализ активности, специфичной для FVIII.

Активность FVIII в пробах плазмы яванских макаков оценивали на основании введенной дозы, а затем разбавляли примерно до 0,25 - 1 МЕ/мл в истощенной по FVIII человека плазме (Diagnostica Stago). Пробы анализировали в Sysmex CA1500 (Siemens Diagnostic Healthcare), используя набор FVIII chromogenic (Siemens). При данном хромогенном анализе rFVIII_{FC} в пробах плазмы активируется тромбином. После этого активированный фактор VIII (FVIIIa) ускоряет превращение фактора X (FX) в фактор Xa (FXa) в присутствии активированного фактора IX (FIXa), фосфолипидов (ФЛ) и ионов кальция. Активность FXa оценивают по гидролизу p-нитроанилидного субстрата, специфичного для FXa. Начальная скорость высвобождения p-нитроанилина (pNA), измеренная при 405 нм, пропорциональна активности FXa и, следовательно, активности FVIII в пробе. Предел количественного определения активности FVIII, обеспечиваемой присутствием rFVIII_{FC}, при данном способе анализа составляет примерно 0,3 МЕ/мл. Аналитический способ позволяет измерять суммарную активность FVIII вплоть до нижнего предела, равного примерно 0,06 МЕ/мл, с точностью $\pm 20\%$. Для построения фармакодинамических кривых (зависимости активности FVIII от времени) вычисленную активность в пробе до введения препарата конкретного животного вычитали из значения в каждой временной точке.

Стандартную кривую строили с применением концентрата 7го международного стандарта NIBSC фактора FVIII, разбавленного до 1 МЕ/мл в истощенной по FVIII человека плазме. Пробы для стандартной кривой подвергали серийному разведению в приборе Sysmex с получением концентраций: 0,15, 0,1, 0,05, 0,025, 0,0053 и 0,0026 МЕ/мл. Так как прибор разбавляет все пробы 1:10, концентрации стандарта FVIII соответствуют концентрациям в плазме 1,5-0,026 МЕ/мл, что является диапазоном активностей FVIII, которые могут быть определены.

Фармакокинетический анализ.

Профили зависимости концентрации от времени оценивали, используя модуль для анализа без учета компартментов в программном обеспечении WinNonlin (версия 5.2, Pharsight Corporation, Маунтин-Вью, Калифорния, США).

Результаты.

Концентрацию rFVIII_{FC} в плазме обезьян измеряли, используя сэндвич-формат анализа ELISA, при котором измеряются части молекулы, соответствующие и FVIII, и Fc, и данные представлены в табл. 7. Содержание во всех пробах, взятых до введения препарата, было ниже предела количественного определения. Фиг. 7 демонстрирует групповое среднее значение концентраций rFVIII_{FC} и Ксинта в плазме с течением времени, а индивидуальные значения концентрации в плазме в зависимости от времени представлены на фиг. 8. Резюме по фармакокинетическим параметрам для rFVIII_{FC} и Ксинта приведено в таблицах 9 и 10, соответственно. Среднее значение $t_{1/2}$ для rFVIII_{FC} составило $11,9 \pm 1,7$ ч (диапазон от 9,3 до 14,1 ч), и для Ксинта среднее значение элиминации $t_{1/2}$ составило $12,7 \pm 4,4$ ч (диапазон от 9,2 до 19,9 ч).

Активность FVIII измерили с применением хромогенного анализа активности, специфичной для FVIII, и данные приведены в табл. 8. Активность до введения препарата, обусловленная эндогенным FVIII, вычитали из значений для всех проб. График для данных по средним групповым значениям показан на фиг. 9, а кривые зависимости индивидуальных значений концентрации в плазме от времени представлены на фиг. 10. Резюме по фармакокинетическим параметрам для rFVIII_{FC} и Ксинта приведено в таблицах 9 и 10, соответственно. Среднее значение элиминации $t_{1/2}$ составило $16,1 \pm 6,9$ ч (диапазон от 11,6 до 29,4 ч) для rFVIII_{FC} и $12,5 \pm 1,7$ ч (диапазон от 10,4 до 14,3 ч) для Ксинта.

Обсуждение и заключение.

Периоды полувыведения после разовой внутривенной дозы 125 МЕ/кг у rFVIII_{FC} и Ксинта были схожими при измерении исследуемого вещества как с помощью ELISA, так и с помощью хромогенного анализа активности.

Пример 3.

Это будет открытое, с перекрестным дизайном, с увеличением дозы, многоцентровое и впервые проводимое с участием людей исследование I/IIa фазы, разработанное для оценки безопасности, переносимости и фармакокинетики разовой дозы rFVIII_{FC} у субъектов с тяжелой (определяемой как <1 МЕ/дл [1%] эндогенного фактора VIII [FVIII]) гемофилией А. Для участия будут привлечены в сумме примерно 12 ранее получавших лечение пациентов, которым будут вводить дозы с rFVIII_{FC}, равные 25 или 65 МЕ/кг. После проведения скрининга (запланированного в пределах 28 дней до введения первой дозы Адвейт® [rFVIII], референсного препарата сравнения) и по истечении не менее чем 4 дней (96 ч) без лечения с применением FVIII перед первой инъекцией, примерно 6 субъектам будет введена разовая доза 25 МЕ/кг Адвейт® со снятием фармакокинетического профиля (ФП) в течение следующих 3 дней (72 ч), после этого будет произведено переключение на другой препарат IV, и субъектам введут разовую, открытую дозу 25 МЕ/кг rFVIII_{FC} для снятия фармакокинетического профиля в течение 7 дней (168 ч). Первыми 3 субъектам дозы будут вводить последовательно. В случае первых трех (3) субъектов, получивших дозу 25 МЕ/кг rFVIII_{FC}, для каждого субъекта будет проведена оценка наличия ингибиторных антител во временной точке 14 дней (336 ч) после введения rFVIII_{FC}. Введение дозы следующему субъекту (только для первых трех субъектов) будет происходить по завершении испытания на наличие ингибиторных антител. После того, как третий субъект завершит 14-дневную оценку наличия ингибиторных антител, начнется последовательное привлечение в исследование оставшихся трех субъектов с дозой 25 МЕ/кг и шести субъектов с дозой 65 МЕ/кг, с интервалом, по меньшей мере, в 1 день в пределах каждой группы с разными дозировками.

Через неделю после введения дозы 25 МЕ/кг rFVIII_{FC} последнему субъекту примерно 6 индивидуальных субъектов будут привлечены в когорту с дозой 65 МЕ/кг. Каждому субъекту в когорте с дозой 65 МЕ/кг введут разовую дозу 65 МЕ/кг Адвейт® со снятием фармакокинетического профиля в течение следующих 4 дней (96 ч), после этого будет произведено переключение на другой препарат, и субъектам введут разовую, открытую дозу 65 МЕ/кг rFVIII_{FC} для снятия профиля в течение 10 дней (240 ч). Если в какой-либо когорте перед первой инъекцией rFVIII_{FC} будет отмечен эпизод кровотечения, необходимо использовать для лечения продукт FVIII, обычно применяемый этим субъектом, и затем необходимо выдержать интервал, по меньшей мере, 4 дня перед введением первой инъекции rFVIII_{FC} для построения фармакокинетического профиля.

Все субъекты будут находиться под врачебным наблюдением в течение 14 дней (336 ч) и 28-дневного периода оценки клинической безопасности после введения rFVIII_{FC} в дозах 25 МЕ/кг или 65 МЕ/кг с целью обеспечения безопасности. У всех субъектов будут взяты пробы для определения фармакокинетических параметров до введения препарата и после введения препарата, а также пробы крови для анализа активности FVIII в заданных временных точках.

Пример 4. Активность в комплексе, расщепляющем фактор X.

Для изучения связывания белков FVIII (rBDD FVIII и rFVIII_{FC}) с FIXa и измерения способности этих белков активировать FX провели кинетические исследования по проверке этих взаимодействий в контексте комплекса, расщепляющего фактор X. Данный анализ включал образование комплекса, расщепляющего фактор X, активированным FIX и активированным белком rBDD FVIII или rFVIII_{FC} на поверхности фосфолипидной мембраны в присутствии ионов кальция и наблюдение за превращением FX в FXa путем измерения расщепления хромогенного или флюорогенного субстрата.

Вкратце, сперва FVIII активировали а-тромбином в течение 5 мин, затем смешивали с FIXa в присутствии Ca^{2+} и синтетических фосфолипидных везикул (25% фосфатидилсерин (ФС)/75% фосфатидилхолин (ФХ)) или тромбов. В условиях, описанных ниже, FVIIIa и FIXa взаимодействуют в присутствии фосфолипидной поверхности и ионов кальция с образованием комплекса, расщепляющего фактор X, который опосредует превращение FX в FXa посредством протеолитического процессинга. В свою очередь, FXa расщепляет специфичный для FXa хромогенный или флюорогенный субстрат. Расщепленный субстрат является хромогенным и, следовательно, количество расщепленного субстрата в растворе является показателем количества образованного FXa. Это количество вычисляют путем измерения поглощения раствора при 405 нм.

А. Активация фактора X.

Способность rBDD FVIII и rFVIIIc расщеплять FX исследовали в контексте комплекса, расщепляющего фактор X, как описано выше. Активированные тромбином белки FVIII инкубировали с FIXa и фосфолипидами в присутствии ионов кальция, затем добавляли различные концентрации FX в присутствии со специфичным для FX субстрата и определяли скорости образования FXa (фиг. 11).

Согласно этим данным вычислили значения K_m и V_{max} для различных белков FVIII в контексте комплекса, расщепляющего фактор X (Chang 1997) (табл. 11). Данные представлены как среднее значение для шести измерений (3 эксперимента с двумя повторами в каждом) $\pm$ соответствующее значение стандартного отклонения. Исходя из этих данных, обнаружено, что эти белки (rBDD FVIII и rFVIIIc) имеют сопоставимые значения K_m и V_{max} , в пределах коэффициента вариации данного анализа. Следовательно, комплекс, расщепляющий фактор X, образованный с rFVIIIc, ведет себя схожим образом с комплексом, расщепляющим фактор X, образованным с лицензированным продуктом rBDD FVIII (РеФакто), в отношении взаимодействий с фосфолипидами и способности активировать FX. Обратите внимание, что эти сопоставимые данные также демонстрируют, что rFVIIIc активируется в сопоставимой степени с rBDD FVIII после кратковременной инкубации с тромбином.

В. Взаимодействие с FIXa.

Взаимодействие rBDD FVIII и rFVIIIc с FIXa также изучали в контексте комплекса, расщепляющего фактор X. Комплекс, расщепляющий фактор X, собирали как описано выше, используя фиксированное количество FX и варьируемые уровни FIXa, и определяли скорости образования FXa (фиг. 12). Согласно этим данным определяли значение K_d для комплекса, расщепляющего фактор X, образованного обоими белками FVIII с FIXa (Chang 1997). Данные представлены как среднее значение для шести измерений (3 эксперимента с двумя повторами в каждом) $\pm$ соответствующее значение стандартного отклонения (табл. 12). Обнаружено, что оба белка имеют схожие значения K_d и V_{max} , и это свидетельствует о том, что rFVIIIc образует взаимодействия с FIXa, сопоставимые с таковыми у лицензированного продукта rBDD FVIII.

Пример 5.

Промежуточные фармакокинетические данные клинического исследования I/IIa фазы, обсуждаемого в примере 3, продемонстрировали следующие результаты для FVIIIc. FVIIIc показал примерно 50% увеличение системной экспозиции (AUC_{INF}), примерно 50% снижение клиренса (Cl) и примерно 50-70% увеличение периода полувыведения и среднего времени удержания и, по сравнению с Адвейт (полно-размерным FVIII). Кроме того, FVIIIc продемонстрировал повышенные значения C168, TBLP1, TBLP3 и TBLP5, по сравнению с Адвейт.

AUC_{∞} - площадь под кривой концентрация-время от нуля до бесконечности;

Бета HL - период полувыведения; также называется $t_{1/2\beta}$;

C168 - расчетная активность FVIIIc выше исходного уровня во временной точке примерно 168 ч после введения дозы;

Cl - клиренс;

MRT - преднее время удержания;

TBLP1 - предсказанное моделью время после введения дозы, когда активность FVIIIc падает до уровня примерно 1 ME/дл выше исходного уровня;

TBLP3 - предсказанное моделью время после введения дозы, когда активность FVIIIc падает до уровня примерно 3 ME/дл выше исходного уровня;

TBLP5 - предсказанное моделью время после введения дозы, когда активность FVIIIc падает до уровня примерно 5 ME/дл выше исходного уровня.

Пример 6.

Рекомбинантный химерный белок фактора VIII с делетированным В-доменом с Fc (rFVIIIc) был создан в результате подхода, имеющего целью увеличение периода полувыведения FVIII. Фармакокинетику (ФК) rFVIIIc сравнили с таковой rFVIII у мышей с гемофилией А. Обнаружено, что терминальный период полувыведения у rFVIIIc был в два раза длиннее, чем у rFVIII. Для подтверждения того факта, что механизм, лежащий в основе увеличения периода полувыведения, обусловлен защитой rFVIIIc рецептором FcRn, провели фармакокинетическую оценку в мышах, нокаутных по FcRn, и в трансгенных мышах с FcRn человека. Вводили разовую внутривенную дозу (125 ME/kg) и определяли концентрацию в

плазме, используя хромогенный анализ активности. Значения $С_{max}$ у rFVIII-Fc и rFVIII (Ксинта®) были схожими в обеих линиях мышей. Однако, хотя период полувыведения у rFVIII-Fc был сопоставим с таковым у rFVIII у нокаутных по FcRn мышей, период полувыведения у rFVIII-Fc был увеличен примерно в два раза, чем таковой у rFVIII у трансгенных мышей с FcRn человека. Эти результаты подтверждают, что FcRn опосредует или отвечает за увеличение периода полувыведения rFVIII-Fc, по сравнению с rFVIII. Так как было показано, что гемостаз цельной крови, измененный с помощью ротационной тромбоэластометрии (ROTEM), коррелирует с эффективностью факторов свертывания крови в моделях кровотечения на мышах с гемофилией, а также при клинических применениях, мы провели оценку эффективности rFVIII-Fc *ex vivo* у мышей с гемофилией А, используя ROTEM. Мышам с гемофилией А вводили разовую внутривенную дозу 50 МЕ/кг rFVIII-Fc, Ксинта® (FVIII) или Адвейт® (FVIII). Во временной точке 5 мин после введения дозы образование сгустка было схожим в отношении времени свертывания (СТ), времени образования сгустка (CFT) и α -угла. Однако rFVIII-Fc продемонстрировал существенно улучшенные значения СТ во временных точках 72 и 96 ч после введения дозы, и значения CFT и α -угла также были улучшены во временной точке 96 ч, по сравнению как с Ксинта (FVIII), так и с Адвейт® (FVIII), что согласуется с увеличением фармакокинетических параметров у rFVIII-Fc. Следовательно, конструкция химеры Fc с FVIII дает молекулу с заданным механизмом действия, которая обладает увеличенным периодом полувыведения и возможностью обеспечивать более длительную защиту от кровотечения.

Пример 7.

Данный пример представляет окончательные результаты анализа активности FVIII у 16 пациентов, получавших лечение продуктами FVIII с дозами 25 и 65 МЕ/кг. См. примеры 3 и 5.

В данном примере rFVIII-Fc является рекомбинантным химерным белком, состоящим из одиночной молекулы рекомбинантного FVIII человека с делетированным В-доменом (BDD-rFVIII), сшитой с димерным доменом Fc из IgG1 человека, без вставочной линкерной последовательности. Эту белковую конструкцию также называют в этом документе гетеродимерным гибридным белком rFVIII-Fc, химерным белком FVIII-Fc и мономерного Fc, мономерным гибридом FVIII-Fc, гибридом мономерного FVIII-Fc и FVIII-Fc-мономер-димером. См. пример 1, фиг. 1 и табл. 2А.

Доклинические испытания с rFVIII-Fc продемонстрировали примерно 2-кратное увеличение периода полувыведения активности rFVIII, по сравнению с имеющимися в продаже продуктами rFVIII. Обоснованием для данного исследования была необходимость оценки безопасности и переносимости разовой дозы rFVIII-Fc в составе замороженной жидкой лекарственной формы и получения данными по фармакокинетики у субъектов с тяжелыми формами гемофилии А. В данном исследовании для фармакокинетической оценки были доступны 16 пригодных для оценки субъектов. Разовое введение двух доз rFVIII-Fc и Адвейт с номинальной дозой 25 (n=6) и 65 МЕ/кг массы тела (n=10) проводили в виде внутривенной инфузии в течение примерно 10 мин. Пробы крови для оценки фармакокинетических параметров плазмы отбирали перед инфузией, а также в течение периода вплоть до 10 дней после введения дозы. Фармакокинетику активности FVIII как для Адвейт, так и для rFVIII-Fc охарактеризовали в данном исследовании с применением модель-зависимого метода.

Цели исследования.

Основной целью данного исследования была оценка безопасности и переносимости разового введения двух доз rFVIII-Fc (25 и 65 МЕ/кг) ранее получавшим лечение пациентам (РТП) в возрасте от 12 лет и выше с тяжелой формой гемофилии А.

Дополнительными целями было определение фармакодинамических (ФК) параметров, выявляемых по фармакодинамической (ФД) активности FVIII с течением времени после разового введения 25 или 65 МЕ/кг rFVIII-Fc, в сравнении с Адвейт, при одноэтапном анализе свертывания и хромогенном анализе.

Дизайн исследования (см. пример 3).

Пробы крови для оценки фармакокинетических параметров по активности FVIII отбирали во время визита при проведении скрининга (в пределах 28 дней до введения дозы Адвейт); в 0 день (день инъекции Адвейт) до введения препарата и во временных точках 10 и 30 мин и 1, 3, 6 и 9 ч после введения препарата; в 1 день во временной точке 24 ч после инъекции Адвейт; на 2 день во временной точке 48 ч после инъекции Адвейт; на 3 день во временной точке 72 ч после инъекции Адвейт; и на 4 день во временной точке 96 ч после инъекции высокой дозы Адвейт (только в когорте В).

Пробы крови для оценки фармакокинетических параметров по активности FVIII отбирали в день инъекции rFVIII-Fc непосредственно перед введением rFVIII-Fc, во временных точках 10 и 30 мин и 1, 3, 6 и 9 ч после инъекции rFVIII-Fc; в 1 день во временной точке 24 ч после инъекции rFVIII-Fc; на 2-5 день во временных точках 48, 74, 96 и 120 ч после инъекции rFVIII-Fc; на 7 день во временной точке 168 ч после инъекции rFVIII-Fc; на 8, 9 и 10 день во временных точках 192, 216 и 240 ч после инъекции высокой дозы rFVIII-Fc (только в когорте В). Активность FVIII также измеряли во время заключительного визита в ходе исследования (через 28 дней после инъекции rFVIII-Fc) во временной точке 672 ч после инъекции rFVIII-Fc.

Фармакокинетическое моделирование и расчеты.

Сокращения.

TBLP1 = Предсказанное моделью время после введения дозы, когда активность FVIII падает до уровня примерно 1 МЕ/дл выше исходного уровня.

TBLP3 = Предсказанное моделью время после введения дозы, когда активность FVIII падает до уровня примерно 3 МЕ/дл выше исходного уровня.

$KV_M = C_{\max_M} / \text{фактическая доза (МЕ/кг)}$.

$KVOB = C_{\max_OB} / \text{фактическая доза (МЕ/кг)}$.

$IVR_M = 100 \times C_{\max_M} / \text{объем плазмы (дл)} / \text{суммарная доза в МЕ}$; где объем плазмы в мл = $(23,7 \times \text{рост в см}) + (9,0 \times \text{масса в кг}) - 1709$.

$IVR_OB = 100 \times C_{\max_OB} / \text{объем плазмы (дл)} / \text{суммарная доза в МЕ}$; где объем плазмы в мл = $(23,7 \times \text{рост в см}) + (9,0 \times \text{масса в кг}) - 1709$.

Результаты.

Фиг. 13. Профили зависимости наблюдаемого группового среднего значения активности FVIII ($\pm$ станд. ошибка) от времени, отсортированные по уровню дозы, сгруппированные по используемому соединению (одноэтапный анализ, 25 МЕ/кг (А) и 65 МЕ/кг (В)); и (хромогенный анализ, 25 МЕ/кг (С) и 65 МЕ/кг (D)).

Фиг. 14. Профили зависимости наблюдаемого группового среднего значения активности FVIII ($\pm$ станд. ошибка) от времени, сгруппированные по уровню дозы и используемому соединению (одноэтапный анализ, А; хромогенный анализ, В).

Фармакокинетика разовой дозы (одноэтапный анализ).

Наблюдаемая активность FVIII резко повышалась после кратковременной внутривенной инфузии либо Адвейт, либо гFVIII-Fc, со средними ($\pm$ станд. откл.) предсказанными моделью значениями $S_{\max}$, равными $56,6 \pm 4,74$ и $121 \pm 28,2$ МЕ/дл для Адвейт и $55,6 \pm 8,18$ и $108 \pm 16,9$ МЕ/дл для гFVIII-Fc в группах с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно. У всех пациентов, получавших лечение Адвейт или гFVIII-Fc, наблюдалось дозозависимое повышение активности FVIII. Наблюдаемое повышение значений $C_{\max}$ и AUC_{∞} было немного менее чем пропорционально дозе в исследованном диапазоне доз.

По окончании инфузии уменьшение наблюдаемой активности FVIII демонстрировало характеристики моноэкспоненциального снижения вплоть до достижения исходного уровня. Скорость снижения активности FVIII была ниже в случае гFVIII-Fc, чем в случае Адвейт, со средними ($\pm$ станд. откл.) предсказанными моделью значениями периода полувыведения, равными $11,9 \pm 2,98$ и $10,4 \pm 3,03$ ч для Адвейт и $18,0 \pm 3,88$ и $18,4 \pm 6,99$ ч для гFVIII-Fc в группах с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно. Значения периода полувыведения, по-видимому, являются дозозависимыми в исследованном диапазоне доз для обоих продуктов FVIII.

Суммарная системная экспозиция FVIII (оцененная по AUC_{∞}) была примерно на 48 и 61% выше после введения гFVIII-Fc, чем после введения Адвейт, в дозах 25 и 65 МЕ/кг, соответственно. Средние ($\pm$ ст. откл.) предсказанные моделью значения AUC_{∞} составили 974 ± 259 и 1810 ± 606 чхМЕ/дл для Адвейт и 1440 ± 316 и 2910 ± 1320 чхМЕ/дл для гFVIII-Fc, для групп с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно.

Так же как и период полувыведения, значение среднего времени удержания (MRT) было больше для гFVIII-Fc, по сравнению с Адвейт. Средние ($\pm$ ст. откл.) предсказанные моделью значения MRT составили $17,1 \pm 4,29$ и $14,9 \pm 4,38$ ч для Адвейт и $25,9 \pm 5,60$ и $26,5 \pm 10,1$ ч для гFVIII-Fc, для групп с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно. Значения MRT, по-видимому, являются дозозависимыми в исследованном диапазоне доз для обоих продуктов FVIII.

Кроме того, были определены значения первичных фармакокинетических параметров для CL и V. Значения CL для гFVIII-Fc составили всего примерно 66% от таковых, наблюдаемых для Адвейт при эквивалентных дозах. Средние ($\pm$ ст. откл.) предсказанные моделью значения CL составили $2,70 \pm 0,729$ и $4,08 \pm 1,69$ мл/ч/кг для Адвейт и $1,80 \pm 0,409$ и $2,69 \pm 1,25$ мл/ч/кг для гFVIII-Fc, для групп с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно. Значения V были сопоставимыми между Адвейт и гFVIII-Fc со средними ($\pm$ ст. откл.) предсказанными моделью значениями V $43,9 \pm 4,27$ и $56,1 \pm 13,4$ мл/кг для Адвейт и $45,3 \pm 7,23$ и $61,6 \pm 10,6$ мл/кг для гFVIII-Fc, для групп с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно. Незначительное повышение значений CL и V было отмечено с повышением дозы Адвейт и гFVIII-Fc; однако увеличение стандартного отклонения при дозе 65 МЕ/кг, в сочетании с ограниченными уровнями доз, затрудняло оценку зависимости этих параметров от дозы. Например, коэффициент вариации (CV%) геометрического среднего значений CL для группы, получавшей лечение гFVIII-Fc, увеличился с 23,0% (25 МЕ/кг) до 48,6% (65 МЕ/кг).

В дополнение к первичным фармакокинетическим параметрам, были определены вторичные фармакокинетические параметры (например, значение K, IVR и т.д.) для оценки длительности воздействия, оказываемого FVIII. Также наблюдали признаки различия в фармакокинетике, заключавшиеся в повышенных значениях TBLP1 и TBLP3 у гFVIII-Fc, по сравнению с Адвейт в эквивалентных дозах. IVR и значения K для Адвейт и гFVIII-Fc, по-видимому, сопоставимы. Небольшое повышение значений TBLP1 и TBLP3 наблюдали с повышением дозы Адвейт и гFVIII-Fc. В противоположность этому, небольшое снижение средних значений IVR и K было отмечено с повышением дозы Адвейт и гFVIII-Fc. Как указано

ранее, оценка зависимости этих параметров от дозы затруднена ограниченными уровнями доз.

Средние ($\pm$ ст. откл.) наблюдаемые значения TBLP1 составили $2,88 \pm 0,733$ и $2,93 \pm 0,848$ МЕ/дл на МЕ/кг для Адвейт и $4,28 \pm 0,873$ и $5,16 \pm 2,02$ МЕ/дл на МЕ/кг для гFVIII_{Fc}, для групп с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно. Средние ($\pm$ ст. откл.) наблюдаемые значения TBLP3 составили $2,06 \pm 0,527$ и $2,26 \pm 0,666$ МЕ/дл на МЕ/кг для Адвейт и $3,09 \pm 0,623$ и $3,93 \pm 1,59$ МЕ/дл на МЕ/кг для гFVIII_{Fc}, для групп с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно.

Средние значения IVR и K, вычисленные с применением наблюдаемых значений $C_{\max}$ (за вычетом исходного уровня и остаточного лекарства в соответствии с моделью), в общем случае были выше, чем значения, определенные с применением предсказанных моделью значений $C_{\max}$; это соответствует небольшой недооценке наблюдаемой пиковой активности при использовании модели с одним компартментом. Средние ($\pm$ ст. откл.) наблюдаемые значения K составили $2,57 \pm 0,198$ и $2,13 \pm 0,598$ МЕ/дл на МЕ/кг для Адвейт и $2,46 \pm 0,330$ и $1,85 \pm 0,332$ МЕ/дл на МЕ/кг для гFVIII_{Fc}, для групп с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно. Средние ($\pm$ ст. откл.) наблюдаемые значения IVR составили $94,1 \pm 15,6$ и $85,8 \pm 16,5$ % для Адвейт и $89,5 \pm 11,9$ и $74,8 \pm 6,72$ % для гFVIII_{Fc}, для групп с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно.

Фармакокинетика разовой дозы (хромогенный анализ)

Наблюдаемая активность FVIII резко повышалась после кратковременной внутривенной инфузии либо Адвейт, либо гFVIII_{Fc}, со средними ($\pm$ станд. откл.) предсказанными моделью значениями $C_{\max}$, равными $70,2 \pm 9,60$ и $157 \pm 38,6$ МЕ/дл для Адвейт и $70,3 \pm 10,0$ и $158 \pm 34,7$ МЕ/дл для гFVIII_{Fc} в группах с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно.

У всех пациентов, получавших лечение Адвейт или гFVIII_{Fc}, наблюдалось дозозависимое повышение активности FVIII. Наблюдаемое повышение значений $C_{\max}$ и AUC_{∞} было немного менее чем пропорционально дозе в исследованном диапазоне доз.

По окончании инфузии уменьшение наблюдаемой активности FVIII демонстрировало характеристики моноэкспоненциального снижения вплоть до достижения исходного уровня. Скорость снижения активности FVIII была ниже в случае гFVIII_{Fc}, чем в случае Адвейт, со средними ($\pm$ станд. откл.) предсказанными моделью значениями периода полувыведения, равными $10,7 \pm 1,98$ и $10,3 \pm 3,27$ ч для Адвейт и $16,2 \pm 2,92$ и $19,0 \pm 7,94$ ч для гFVIII_{Fc} в группах с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно. Значения периода полувыведения, по-видимому, являются дозозависимыми в исследованном диапазоне доз для обоих продуктов FVIII.

Суммарная системная экспозиция FVIII (оцененная по AUC_{∞}) была примерно на 53% и 84% выше после введения гFVIII_{Fc}, чем после введения Адвейт, в дозах 25 и 65 МЕ/кг, соответственно. Средние ($\pm$ ст. откл.) предсказанные моделью значения AUC_{∞} составили 1080 ± 236 и 2320 ± 784 ч*МЕ/дл для Адвейт и 1650 ± 408 и 4280 ± 1860 ч*МЕ/дл для гFVIII_{Fc}, для групп с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно.

Так же, как и период полувыведения, значение среднего времени удержания (MRT) было больше для гFVIII_{Fc}, по сравнению с Адвейт. Средние ($\pm$ ст. откл.) предсказанные моделью значения MRT составили $15,3 \pm 2,86$ и $14,8 \pm 4,72$ ч для Адвейт и $23,4 \pm 4,22$ и $27,3 \pm 11,4$ ч для гFVIII_{Fc}, для групп с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно. Значения MRT, по-видимому, являются дозозависимыми в исследованном диапазоне доз для обоих продуктов FVIII.

Кроме того, были определены значения первичных фармакокинетических параметров для CL и V. Значения CL для гFVIII_{Fc} составили всего примерно 58-66% от таковых, наблюдаемых для Адвейт при эквивалентных дозах. Средние ($\pm$ ст. откл.) предсказанные моделью значения CL составили $2,39 \pm 0,527$ и $3,21 \pm 1,40$ мл/ч/кг для Адвейт и $1,57 \pm 0,349$ и $1,86 \pm 0,970$ мл/ч/кг для гFVIII_{Fc}, для групп с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно. Значения V были сопоставимыми между Адвейт и гFVIII_{Fc}, со средними ($\pm$ ст. откл.) предсказанными моделью значениями V $35,8 \pm 5,52$ и $43,6 \pm 11,2$ мл/кг для Адвейт и $35,9 \pm 6,65$ и $42,7 \pm 8,91$ мл/кг для гFVIII_{Fc}, для групп с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно. Повышение значений CL и V было отмечено с повышением дозы Адвейт и гFVIII_{Fc}; однако увеличение стандартного отклонения при дозе 65 МЕ/кг, в сочетании с ограниченными уровнями доз, затрудняло оценку зависимости этих параметров от дозы.

В дополнение к первичным фармакокинетическим параметрам, были определены вторичные фармакокинетические параметры (например, значение K, IVR и т.д.) для оценки длительности воздействия, оказываемого FVIII. Также наблюдали признаки различия в фармакокинетике, заключавшиеся в повышенных значениях TBLP1 и TBLP3 у гFVIII_{Fc}, по сравнению с Адвейт в эквивалентных дозах. IVR и значения K для Адвейт и гFVIII_{Fc}, по-видимому, сопоставимы.

Небольшое повышение значений TBLP1 и TBLP3 наблюдали с повышением дозы Адвейт и гFVIII_{Fc}. В противоположность этому, небольшое снижение средних значений IVR и K было отмечено с повышением дозы Адвейт и гFVIII_{Fc}. Как указано ранее, оценка зависимости этих параметров от дозы затруднена ограниченными уровнями доз.

Средние ($\pm$ ст. откл.) наблюдаемые значения TBLP1 составили $2,70 \pm 0,511$ и $3,09 \pm 0,978$ МЕ/дл на МЕ/кг для Адвейт и $4,06 \pm 0,798$ и $5,66 \pm 2,38$ МЕ/дл на МЕ/кг для гFVIII_{Fc}, для групп с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно. Средние ($\pm$ ст. откл.) наблюдаемые значения TBLP3 составили $1,98 \pm 0,377$ и $2,39$

$\pm 0,718$ МЕ/дл на МЕ/кг для Адвейт и $3,04 \pm 0,598$ и $4,44 \pm 1,84$ МЕ/дл на МЕ/кг для rFVIII Fc, для групп с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно.

Средние значения IVR и K, вычисленные с применением наблюдаемых значений $C_{\max}$ (за вычетом исходного уровня и остаточного лекарства в соответствии с моделью), в общем случае были выше, чем значения, определенные с применением предсказанных моделью значений $C_{\max}$; это соответствует небольшой недооценке наблюдаемой пиковой активности при использовании модели с одним компартментом. Средние ($\pm$ ст. откл.) наблюдаемые значения K составили $3,08 \pm 0,429$ и $2,85 \pm 0,721$ МЕ/дл на МЕ/кг для Адвейт и $3,12 \pm 0,451$ и $2,92 \pm 0,985$ МЕ/дл на МЕ/кг для rFVIII Fc, для групп с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно. Средние ($\pm$ ст. откл.) наблюдаемые значения IVR составили $112 \pm 14,5$ и $116 \pm 26,9\%$ для Адвейт и $113 \pm 16,3$ и $117 \pm 33,6\%$ для rFVIII Fc, для групп с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно.

Выводы.

У всех пациентов, получавших лечение Адвейт и rFVIII Fc, было сопоставимое дозозависимое повышение значений $C_{\max}$ и AUC_{∞} в оцененном диапазоне доз. Максимальные уровни активности Адвейт и rFVIII Fc в плазме в общем случае наблюдались в пределах первого часа после окончания инфузии, и активность сохранялась на детектируемых уровнях в течение нескольких дней после введения дозы. По окончании инфузии уменьшение активности FVIII, скорректированной относительно исходного уровня, демонстрировало моноэкспоненциальное снижение до достижения исходного уровня в случае обоих продуктов. Значения параметров периода полувыведения и MRT, по-видимому, являются дозозависимыми в исследованном диапазоне доз для обоих продуктов FVIII. Небольшое повышение значений CL и V было отмечено с повышением дозы Адвейт и rFVIII Fc; однако увеличение вариабельности значений между субъектами при дозе 65 МЕ/кг, в сочетании с ограниченными уровнями доз, затрудняло оценку зависимости этих параметров от дозы.

Сравнение фармакокинетики активности rFVIII Fc и Адвейт выявило повышение примерно на 48-61% (одноэтапный анализ) или 53-84% (хромогенный анализ) системной экспозиции, снижение примерно на 30-40% клиренса и увеличение примерно на 50-80% периода полувыведения и MRT у rFVIII Fc, по сравнению с Адвейт в сопоставимых дозах. Также наблюдали признаки различия в фармакокинетике, заключавшиеся в повышенных значениях TBLP1 и TBLP3 у rFVIII Fc, по сравнению с Адвейт в эквивалентных дозах. IVR и значения K для Адвейт и rFVIII Fc, по-видимому, сопоставимы.

Фармакокинетические параметры, полученные с помощью результатов хромогенного анализа, в общем случае согласовывались с таковыми, полученными при одноэтапном анализе, за исключением того, что хромогенный анализ дал более высокую оценку параметров экспозиции (например, $C_{\max}$, AUC_{∞} и т.д.)

С учетом наблюдаемых улучшений фармакокинетических параметров, rFVIII Fc может обеспечить более продолжительную защиту от кровотечения, позволяя производить инъекции людям с гемофилией А с меньшей частотой.

Пример 8.

На основании результатов промежуточного фармакокинетического анализа, проведенного в ходе первого исследования rFVIII Fc с участием людей (пример 3), был разработан дизайн исследования A-LONG. A-LONG - это открытое, многоцентровое исследование по оценке безопасности, фармакокинетики и эффективности химерного белка рекомбинантного фактора VIII с Fc (FVIII Fc) при профилактике и лечении кровотечения у ранее получавших лечение субъектов с тяжелой формой гемофилии А (определяемой как <1 МЕ/дл [1%] эндогенного FVIII).

Приблизительно 106 субъектов будут привлечены к лечению с одним из трех режимов: корректируемый профилактический режим (группа 1), режим с еженедельным введением дозы (группа 2) и режим лечения по необходимости (группа 3).

Группа 1. Корректируемый профилактический режим.

Группа 1 будет включать общую группу и подгруппу для исследования фармакокинетики. Будет привлечено примерно 66 субъектов. Начальным режимом будет введение два раза в неделю: 25 МЕ/кг в первый день и затем 50 МЕ/кг на четвертый день недели. Субъектам будут водить rFVIII Fc согласно данному еженедельному профилактическому режиму до момента, когда будут готовы результаты исследования фармакокинетики для rFVIII Fc. Исходя из этих результатов будет установлен корректируемый профилактический режим персонально для каждого пациента, в котором доза и интервал между введениями будут определены таким образом, чтобы поддерживать минимальный уровень активности FVIII равным 1-3%. После этого каждому пациенту будут вводить препарат согласно его индивидуально скорректированному профилактическому режиму в течение всего исследования.

В течение всего исследования за субъектами будет вестись мониторинг, и будут вноситься корректировки в используемую дозу и интервал между введениями. Корректировки будут вноситься только если субъект испытывает неприемлемые эпизоды кровотечения, определяемые как ≥ 2 спонтанных эпизодов кровотечений в течение непрерывного периода длительностью два месяца. В этом случае корректировка будет нацелена на получение минимальных уровней, равных 3-5%.

Группа 2. Режим с еженедельным введением дозы.

Будут привлечены и рандомизированы примерно 20 субъектов, с участием которых будет проведено сокращенное исследование фармакокинетических профилей согласно следующему плану: Вымывание препарата в течение, по меньшей мере, 96 ч; разовая доза rFVIII-Fc 65 МЕ/кг; сокращенный план отбора проб, начиная с 0 дня введения rFVIII-Fc, включая временные точки: до введения препарата и через 10 (± 2) мин, 3 ч (± 15 мин), 72 (± 2) ч [3 день] и 96 (± 2) ч [4 день] с момента начала инъекций. После проведения сокращенного исследования фармакокинетических профилей субъектам будут вводить фиксированную дозу 65 МЕ/кг rFVIII-Fc каждые 7 дней.

Группа 3. Режим лечения по необходимости.

В ходе исследования будет проведена оценка не менее чем 10 случаев обширного оперативного вмешательства у, по меньшей мере, 5 субъектов. Под обширным оперативным вмешательством понимается любая хирургическая процедура (факультативная или экстренная), которая включает применение общей анестезии и/или искусственного дыхания, во время которой происходит проникновение и вскрытие основной полости тела, или при которой происходит существенное ослабление физических или физиологических функций (например, лапаротомия, торакотомия, краниотомия, замена сустава и ампутация конечности).

Для профилактики во время хирургического вмешательства субъектам будут вводить от 35 до 50 МЕ/кг rFVIII-Fc через каждые 12-24 ч. Перед хирургическим вмешательством врач будет проводить проверку фармакокинетического профиля для rFVIII-Fc у субъекта и оценивать режим дозирования для замещения фактора VIII, в общем случае необходимый для данного типа планируемого хирургического вмешательства, и клинический статус субъекта. Эти факторы будут учитываться при составлении рекомендаций для правильного дозирования rFVIII-Fc во время периода хирургического лечения, включая время восстановления.

Основными целями данного исследования являются: (а) оценка безопасности и переносимости rFVIII-Fc, вводимого в режимах профилактического лечения, лечения по необходимости и хирургического вмешательства; и (б) оценка эффективности rFVIII-Fc, вводимого в режимах профилактического лечения, лечения по необходимости и хирургического вмешательства. Дополнительными целями данного исследования являются: (а) определение параметров фармакокинетического профиля для rFVIII-Fc и сравнение фармакокинетики of FVIII-Fc и имеющегося в настоящее время на рынке продукта Адвейт; (б) оценка индивидуальных ответов на FVIII-Fc; и (с) оценка потребления FVIII-Fc.

Основные цели.

Оценка безопасности и переносимости rFVIII-Fc, вводимого в режимах профилактического, еженедельного лечения, лечения по необходимости и хирургического вмешательства.

Оценка эффективности rFVIII-Fc, вводимого в режимах корректируемого профилактического лечения, лечения по необходимости и хирургического вмешательства.

Дополнительные цели.

Определение параметров фармакокинетического профиля для rFVIII-Fc и сравнение фармакокинетики of FVIII-Fc и имеющегося в настоящее время на рынке продукта Адвейт®.

Оценка индивидуальных ответов на rFVIII-Fc.

Определение диапазона дозы и режима дозирования, необходимых для адекватного предотвращения кровотечений в профилактическом режиме; поддержания гомеостаза в условиях хирургического вмешательства; или для лечения эпизодов кровотечения в условиях лечения по необходимости, лечения с еженедельным введением доз или профилактики.

Оценка потребления rFVIII-Fc (например, суммарное среднегодовое потребление rFVIII-Fc на одного субъекта).

Пример 9. Клиническая оценка методом ротационной тромбоэластометрии (ROTEM).

В исследовании, описанном в примере 8, в дополнение к измерению активности FVIII в плазме с применением одноэтапного анализа активированного частичного тромбопластинового времени (АПТВ), также применяли метод ротационной тромбоэластометрии (ROTEM) цельной крови для оценки улучшения общего гемостаза препаратами rFVIII-Fc и Адвейт у 2 субъектов, а именно, у 1 субъекта в когорте с низкой дозой и у 1 субъекта в когорте с высокой дозой.

rFVIII-Fc и Адвейт, по-видимому, имеют сопоставимый уровень активности в отношении образования сгустка при введении их в кровь субъекта перед проведением лечения с применением rFVIII-Fc. Время свертывания (СТ) имело линейную зависимость от дозы rFVIII-Fc и Адвейт в диапазоне примерно от 1% до 100% от нормального уровня, и дозозависимый эффект rFVIII-Fc и Адвейт у одного и того же субъекта был сопоставимым.

После введения доз Адвейт с последующим введением rFVIII-Fc произвели отбор проб цитратной цельной крови в различных временных точках и с помощью ROTEM измерили параметры образования сгустка после реактивации. Несмотря на различия в значениях СТ на исходном уровне из-за присутствия остаточного FVIII, до введения доз Адвейт или rFVIII-Fc, оба продукта эффективно корректировали СТ до сопоставимых уровней через 30 мин после инъекции. Кроме того, улучшение показателей СТ было более длительным во временной точке 3 ч после инъекции и далее в случае 25 МЕ/кг rFVIII-Fc, по срав-

нению с Адвейт, у субъекта, получавшего низкую дозу. Однако разница в улучшении показателей в случае rFVIII_{Fc}, по сравнению с Адвейт, была намного менее существенна при дозе 65 МЕ/кг.

Таблицы

Таблица 1. Полинуклеотидные последовательности

А. FVIII_{Fc} с делегированным В-доменом.

(i) Последовательность ЦНК цепи FVIII_{Fc} с делегированным В-доменом (сигнальный пептид FVIII подчеркнут, область Fc выделена жирным шрифтом) (SEQ ID NO: 1, которая кодирует SEQ ID NO: 2).

661	A	TGCAAAATAGA	GCTCTCCACC	TGCTTCTTTC
721	TGTGCCTTTT	GCCATTCTGC	TTTAGTGCCA	CCAGAAGATA
781	TGTCATGGGA	CTATATGCAA	AGTGAICTCG	GTGAGCTGCC
841	CTAGAGTGCC	AAAATCTTTT	CCATTCAACA	CCTCAGTCGT
901	TAGAATTCCAC	GCATCACCTT	TTCAACATCG	CTAACCCAAG
961	TAGGTCCCTAC	CATCCAGGCT	GAGGTTTATG	ATACAGTGGT
1021	CTTCCCCTCC	TGTCAGTCTT	CATGCTGTTG	GTGTATCCTA
1081	CTGAATATGA	TGATCAGACC	AGTCAAAGGG	AGAAAGAAGA
1141	GAAGCCATAC	ATATGTCTGG	CAGGTCTCTG	AAGAGAATGG
1201	TGTGCCCTTAC	CTACTCATAT	CTTTCTCATG	TGGACCTGGT
1261	TCATGGGAGC	CCTACTAGTA	TGTAGAGAAAG	GGAGTCTGGC
1321	TGCACAAATT	TATACTACTT	TTTGCTGTAT	TTGATGAAGG
1381	CAAAGAACTC	CTTGATGCAG	GATAGGGATG	CTGCATCTGC
1441	ACACAGTCAA	TGGTTATGTA	AACAGGTCTC	TGCCAGGTCT
1501	CAGTCTATTG	GCATCTGATT	GGAAATGGCCA	CCACTCCTGA
1561	AAGGTCACAC	ATTTCTTGTG	AGGAACCATC	GCCAGGCGTC
1621	CTTTCCCTTAC	TGCTCAAACA	CTCTTGATGG	ACCTTGGACA
1681	TCTCTTCCCA	CCAACATGAT	GGCATGGAAG	CTTATGTCAA
1741	AACCCCAACT	ACGAATGAAA	AATAATGAAG	AAGCGGAAGA
1801	ATTCTGAAAT	GGATGTGGTC	AGGTTTGATG	ATGACAACTC
1861	GCTCAGTTGC	CAAGAAGCAT	CCTAAACCTT	GGGTACATTA
1921	ACTGGGACTA	TGCTCCCTTA	GTCTCGCCCC	CCGATGACAG
1981	TGAACAATGG	CCCTCAGCGG	ATTGGTAGGA	AGTACAAAAA
2041	CAGATGAAAC	CTTTAAGACT	CGTGAAGCTA	TTCAGCATGA
2101	TACTTTATGG	GGAAGTGGGA	GACACACTCT	TGATTATATT
2161	CATATAACAT	CTACCCCTCAC	GGAATCAGTG	ATGTCCGTCC
2221	CAAAAGGTGT	AAAACATTTG	AAGGATTTTC	CAATTCTGCC
2281	AATGGACAGT	GACTGTAGAA	GATGGGCCAA	CTAAATCAGA
2341	ATTACTCTAG	TTTCGTAAAT	ATGGAGAGAG	ATCTAGCTTC
2401	TCATCTGCTA	CAAAGAATCT	GTAGATCAAA	GAGGAAACCA
2461	ATGTCATCCT	GTTTTCTGTA	TTTGATGAGA	ACCGAAGCTG
2521	AACGCTTTCT	CCCCAATCCA	GCTGGAGTGC	AGCTTGAGGA
2581	ACATCATGCA	CACCATCAAT	GGCTATGTTT	TTGATAGTTT
2641	ATGAGGTGGC	ATACTGGTAC	ATTCTAAGCA	TTGGAGCACA
2701	TCTTCTCTGG	ATATACCTTC	AAACACAAAA	TGGTCTATGA
2761	CATTCTCAGG	AGAAACTGTC	TTCATGTCCA	TGGAAAACCC
2821	GCCACAACCT	AGACTTTCCG	AACAGAGGCA	TGACCGCCTT
2881	ACAAGAACAC	TGGTGATTAT	TACGAGGACA	GTTATGAAGA
2941	GTAAAAACAA	TGCCATTGAA	CCAAGAAGCT	TCTCTCAAAA
3001	ATCAACGGGA	AATAACTCGT	ACTACTCTTC	AGTCAGATCA
3061	ATACCATATC	AGTTGAAATG	AAGAAGGAAG	ATTTTGACAT
3121	AGAGCCCCCG	CAGCTTTCAA	AAGAAAACAC	GACACTATTT
3181	TCTGGGATTA	TGGGATGAGT	AGCTCCCCAC	ATGTTCTAAG
3241	GTGTCCCTCA	GTTCAAGAAA	GTGTGTTTCC	AGGAATTTAC
3301	CCTTATACCG	TGGAGAACTA	AATGAACATT	TGGGACTCCT

```

3361 AAGTTGAAGA TAAIATCATC GTAACCTTCA GAAATCAGGC CTCTCTGCCC TATTCCTTCT
3421 ATTCTAGCCT TATTTCTTAT GAGGAAGATC AGAGGCAAGG AGCAGAACCT AGAAAAAACT
3481 TTGTCAAGCC TAATGAAACC AAAACCTTACT TTTGGAAAGT GCAACATCAT ATGCCACCCA
3541 CTAAAGATGA GTTTGACTGC AAACCCCTGGG CTTATTTCTC TGATGTTGAC CTGGAAAAAG
3601 AIGTGCACCT AGGCTGTGAT EGACCCCTTC TGGTCTGCCA CACTAACACA CTGAACCCCTG
3661 CTCATGGGAG ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTI TTTCACCATC TTTGATGAGA
3721 CCAAAAGCTG GTACTTCACT GAAAATATGG AAAGAAACTG CAGGCTCTCC TGCAATATCC
3781 AGATGGAAGA TCCCACCTTT AAAGAGAATT ATCGCTTCCA TGCAATCAAT GGCTACATAA
3841 TGGATACACT ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG GATTCTGATG TATCTGCTCA
3901 GCATGGGCAG CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTTCA TGGACATGTG TTCACTGTAC
3961 GAAAAAAGA GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA TCCAGGTGTT TTTGAGACAG
4021 TGGAAATGTT ACCATCCAAA GCTGGAAATF GGCGGTGGA ATGCTTATF GGCAGCATC
4081 TACATGCTGG GATGAGCACA CTTTTCTGG TGTACAGCAA TAAGTGTCAG ACTCCCTGG
4141 GAATGGCTTC TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA TATGGACAGT
4201 GGGCCCCAAA GCTGGCCAGA CTTCAATTAT CCGGATCAAT CAATGCCTGG AGCACCAAGG
4261 AGCCCTTTTC TTGGATCAAG GTGATCTGT TGGCACCAAT GATTATTCAC GGCATCAAGA
4321 CCCAGCCTGC CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC ATCATGTATA
4381 GTCTTGATGG GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC TTAATGGTCT
4441 TCTTTGGCAA TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTAAACCT CCAATTTATG
4501 CTGATACAT CCGTTTGAC CCAACTCAT ATAGCATTCG CAGCACTCTT CGCATGGAGT
4561 TGATGGGCTG TGATTTAAAT AGTTCAGCA TGCATGGG AATGGAGAT AAAGCAATAT
4621 CAGATGCACA GATTACTGCT TCATCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC TGGTCTCCTT
4681 CAAAAGCTCG ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGGCTG GAGACCTCAG GTGAATAATC
4741 CAAAAGAGTG GCTGCAAGTG GACTTCAGAG AGACAATGAA AGTCACAGGA GTAACCTACTC
4801 AGGGAGTAAA ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC TCCAGCAGTC
4861 AAGATGGCCA TCAGTGGACT CTCTTTTCTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTAGGGAA
4921 ATCAAGACTC CTTACACCT GTGGTCAACT CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGCTACC
4981 TPCGAATTCA CCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT
5041 GCGAGGCACA GGACCTCTAC GACAAACTC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCTCCAGAAC
5101 TCCTGGGCGG ACCGTCACTC TTCTCTTCTC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT
5161 CCCGGACCCC TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA
5221 AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCGTGGAG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGAGG
5281 AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC
5341 TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA
5401 AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT
5461 CCCGGGATGA GCTGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC
5521 CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGAGGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA
5581 CGCTCCCGT GTTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA
5641 AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA
5701 ACCACTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA A

```

(ii) ДНК последовательность Fc (сигнальный пептид Igk мыши подчеркнут) (SEQ ID NO: 3, которая кодирует SEQ ID NO: 4)

```

7981 ATGGA GACAGACACA
8041 CTCTGCTAT GGGTACTGCT GCTCTGGGTT CCAGGTCCA CTGGTGACAA AACTCACACA
8101 TGCCCAACCT GCCCAGCAC TGAACCTCTG GGAGGACCGT CAGTCTCTCT CTTCCTCCCA
8161 AAACCAAGG ACACCTCAT GATCTCCGG ACCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC
8221 GTGAGCCACG AAGACCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT
8281 AATGCCAAGA CAAAGCCGGG GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTACGCTCT
8341 CTCACCTCC TGCACCAAG CTOGCTGAAT GGCAAGGAT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC
8401 AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAGCGGCA GOCOCGAGAA
8461 CCACAGGTCT ACACCTGCT CCCATCCCGC GATGAGCTGA CCAAGAACCA GGTGAGCTG
8521 ACCTGCTGG TCAAAGCTT CTATCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG
8581 CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCT CCCGTGTTGG ACTCCGACGG CTCCTCTTCT
8641 CTCTACAGCA AGCTCACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC
8701 TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACACCAC TACAGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
8761 GGTAA

```

B. Полноразмерный FVIII_{FC}.

(i) Последовательность ДНК полноразмерного FVIII_{FC} (сигнальный пептид FVIII подчеркнут, область Fc выделена жирным шрифтом) (SEQ ID NO: 5, которая кодирует SEQ ID NO: 6).

```

661.                                     ATG CAAATAGAGC TCCTCACCTG
721 CTTCTTCTCG TGCCTTTTGC GATCTGCTTT TAGTGCCACC AGAAGATACT ACCTCGGTGC
781 AGTGGAACTG TCAATGGGACT ATATGCAAAAG TGATCTCCGT GAGCTGCGTG TGGAGCGAAG
841 ATTTCCTCCT ACAGTGCCAA AATCTTTTCC ATTCAACACC TCAGTCGTGT ACAAAAAGAC
901 TCTGTTTCTA CAATTCACGG ATCACCTTTT CAACATCGCT AAGCCAAAGC CACCTTGGAT
961 GGGICTGCTA GGTCTTACCA TCCAGGCTGA GGTTCATGAT ACAGTGGTCA TTACACTTAA
1021 GAACATGGCT TCCCATCTCG TCAGTCTTCA TGCTGTTGCT GTATCCTACT GGAAAGCTTC
1081 TGAGGGAGCT GAATATGATG ATCAGACCAG TCAAAGGGAG AAAGAAGATG ATAAACTCTT
1141 CCTGGTGGGA AGCCATACAT ATGCTCTGGCA GGTCTTGAAA GAGAAATGGT CAATGGCTTC
1201 TGACCCACTG TGCCTTACCT ACTCATATCT TTCTCATGIG GACCTGGTAA AAGACTTGAA
1261 TTCAGGCTTC ATTGGAGCCC TACTAGTATG TAGAGAAGGG AGTCTGGCCA AGGAAAAGAC
1321 ACAGACCTTG CACAAATTTA TACTACTTTT TGCTGTATTT GATGAAGGGA AAAGTTGGCA
1381 CTCAGAAACA AAGAACTCCT TGATGCAGGA TAGCGATGCT GCATCTGCTC GGGCCTGGCC
1441 TAAATATGAC ACATCAATG GTTATGTAAA CAGGTCTCTG CCAGGCTGTA TTGGAATGCA
1501 CAGGAATCA GTCTATTGGC ATGIGATTGG AATGGGCACC ACTCCTGAAG TGCACATCAAT
1561 ATTCTCTGAA GGTCAACAT TTCTTTGAG GAACCATCGC CAGGCTGCTC TGGAAATCTC
1621 GCCAATAACT TTCTTACTAG CTCAAACACT CTTGATGGAC CTTGGACAGT TTCTACTGTT
1681 TTGTCATATC TCTTCCCAAC AACATGATGG CATGGAAGCT TATCTCAAG TAGACAGCTG
1741 TCCAGAGGAA CCCCAACTAC GAATGAAAAA TAATGAAGAA GCGGAAGACT ATGATGAIGA
1801 TCTTACTGAT TCTGAAATGG ATGTGGTCAG GTTTGATGAT GACAACCTC CTCTCTTTAT
1861 CCAAAATTCG TCAGTTGCCA AGAAGCATCC TAAAACTTGG GTACATTACA TTGCTGCTGA
1921 AGAGGAGGAC TGGGACTATG CTCCTTAGT CCTCGCCCC GATGACACAA GTTATAAAG
1981 TCAATATTG AACAAATGCC CTCAGCGGAT TGGTAGGAAG TACAAAAAAG TCCGATTAT
2041 GGCATACACA GATGAAACCT TTAAGACTCG TGAAGCTATT CAGCATGAAT CAGGAATCTT
2101 GGGACCTTTA CTTTATGGGG AAGTTGGAGA CACACTGTIG ATTATATTTA AGAATCAAGC
2161 AAGCAGACCA TATAACATCT ACCCTCACGG AATCACTGAT GTCCGTCTCT TGTATTCAG
2221 GAGATTACCA AAAGGTCTAA AACATTTGAA GGATTETCCA ATTCTGCCAG GAGAAATATT
2281 CAAATATAAA TGGACAGTGA CTGTAGAAGA TGGGCCAACT AAATCAGATC CTCGGTGCCT
2341 GACCCGCTAT TACTCTAGTT TCGTTAATAT GGAGAGAGAT CTAGCTTCAG GACTCATGG
2401 CCTCTCCTC ATCTGCTACA AAGAATCTGT ACATCAAGA GGAAACGAGA TAATGTCAGA
2461 CAAGAGGAAT GTCATCCTGT TTTCTGTATT TGATGAGAAC CGAAAGCTGT ACCTCAGAGA
2521 GAATATACAA CGCTTTCTCC CCAATCCAGC TGGAGTGCAG CTTGAGGATC CAGAGTTCCA
2581 AGCCTCCAAC ATCATGCACA GCATCAATGG CTATGTTTTT GATAGTTTGC AGTTGTGAGT
2641 TTGTTTGCAT GAGGTGSCAT ACTGGTACAT TCTAAGCATT GGAGCACAGA CTGACTCCT
2701 TTCTGTCTTC TTCTCTGGAT ATACCTTCAA ACACAAATG STCTATGAAG ACACACTCAC
2761 CCTATTCCCA TTCTCAGGAG AAACGTCTT CATGTTCGATG GAAAACCCAG GTCTATGGAT
2821 TCTGGGGTGC CACAACTCAG ACTTTCCGAA CAGAGGCATG ACCGCCCTAC TGAAGGTTTC
2881 TAGTTGTGAC AAGAACACTG GTGATTATTA CGAGGACAGT CATGAAGATA TTTCAGATA
2941 CTGTGCTGAGT AAAAACCAATG CCATTGAACC AAGAAGCTTC TCCCAGAAAT CAAGACACCC
3001 TAGCACTAGG CAAAAGCAAT TTAATGCCAC CACAATTCCA GAAAATGACA TAGAGAAGAC
3061 TGACCTTTGG TTTGCACACA GAACACCTAT GCCTAAAAAT CAAAATGTCT CCTCTAGTGA
3121 TTGTGTGATG CTCTTGGGAC AGAGTCCTAC TCCACATGGG CTATCCTTAT CTGATCTCCA
3181 AGAAGCCAAA TATGAGACTT TTTCTGATGA TCCATCACCT GGAGCAATAG ACAGTAATAA
3241 CAGCCTGTCT GAAATGACAC ACTTCAGGCC ACAGCTCCAT CACACTGGGG ACATGGTATT
3301 TACCCCTGAG TCAGGCTTCC AATTAGATT AAATGAGAAA CIGGGGACAA CTGCAGCAAC
3361 AGAGTGAAG AAACCTGATT TCAAAGTTTC TAGTACATCA AATAATCTGA TTCAACAAT
3421 TCCATCAGAC AATTTGGCAG CAGGTACTGA TAATACAGT TCCTTAGGAC CCCCAGTAT
3481 GCCAGTTCAT TATGATAGTC AATTAGATAC CACTCTATTT GCCAAAAAGT CATCTCCCT
3541 TACTGAGTCT GGTGGACCTC TGAGCTTGAG TGAACAAAAT AATGATTCAA AGTTCTTAGA

```

```

3601 ATCAGGTTTA ATGAATAGCC AAGAAAGTTC ATGGGGAAAA AATGTATCGT CAACAGAGAG
3661 TGGTAGGTTA TTAAAGGGA AAAGAGCTCA TGGACCTGCT TTGTTGACTA AAGATAATGC
3721 CTTATTCAAA GTTAGCATCT CTTTGTIAAA GACAAACAAA ACTTCCAATA ATTCAGCAAC
3781 TAATAGAAAG ACTCACATTG ATGGCCCATC ATTATTAATT GAGAATAGTC CATCAGTCTG
3841 GCAAAATATA TTAGAAAGTG ACACTGAGTT TAAAAAAGTG ACACCTTTGA TTCATGACAG
3901 AATGCTTATG GACAAAAATG CTACAGCTTT GAGGCTAAAT CATATGTCAA ATAAACTAC
3961 TTCATCAAAA AACATGGAAA TGGTCCAACA GAAAAAGAG GCGCCCATTC CACCAGATGC
4021 ACAAAATCCA GATATGTCTG TCTTTAAGAT GCTATTCTTG CCAGAATCAG CAAGGTGGAT
4081 ACAAAGGACT CATGGAAAGA ACTCTCTCAA CTCTGGSCAA GCGCCAGTC CAAAGCAATT
4141 AGTATCCTTA GGACCAGAAA AATCTGTGGA AGGTGAGAA TTTCTGTCTG AGAAAAACAA
4201 AGTGCTAGTA GGAAAGGGTG AATTTACAAA GGACGTAGGA CTCAAAGAGA TGGTTTTTCC
4261 AAGCAGCAGA AACCTATTTC TTACTAATTT GCATAATTTA CATGAAAAATA ATACACACAA
4321 TCAAGAAAAA AAAATTCAGG AAGAAATAGA AAAGAAGGAA ACATTAATCC AAGAGAATGT
4381 AGTTTTGCCT CAGATACATA CAGTGAATGG CACTAAGAAT TTCATGAAGA ACCTTTCTCT
4441 ACTGAGCACT AGGCAAAATG TAGAAGGTTT ATATGACGGG GCATATGTCT CAGTACTTCA
4501 AGATTTTAGG TCATTAAATG ATTCAACAAA TAGAACAAAG AAACACACAG CTCATTTCTC
4561 AAAAAAAGGG GAGGAAGAAA ACTTGGAAAG CTTGGGAAAT CAAACCAAGC AAATTGTAGA
4621 GAAATATGCA TGCACCACAA GCATATCTCC TAATACAAGC CAGCAGAATT TTGTACGCA
4681 ACCTAGTAAG AGACCTTTGA AACCAATCAG ACTCCCACTA GAAGAAACAG AACTTGAAAA
4741 AAGGATAATT GTGCATGACA CCTCAACCCA GTGGTCCAAA AACATGAAAC ATTTGACCCC
4801 GAGCACCTTC ACACAGATAG ACTACAATGA GAAGGAGAAA GGGGCCATTA CTCAGTCTCC
4861 CTTATCAGAT TGCCTTACGA GGAGTCATAG CATCCCTCAA GCAAAATAGA CTCCATTACC
4921 CATTGCAAAG GTATCATCAT TTCCATCTAT TAGACCTATA TATCTGACCA GGGTCTTATT
4981 CCAAGACAAC TCTTCTCATC TTCCAGCAGC ATCTTATAGA AAGAAAGATT CTGGGCTCCA
5041 AGAAAGCAGT CATTTCTTAC AAGGAGCCAA AAAAAATAAC CTTCTTTTAG CCATTCTAAC
5101 CTTGGAGATG ACTGGTGATC AAAGCAGAGT TGGCTCCCTG GGGACAAGTG CCACAAATTC
5161 AGTCACATAC AAGAAACTTG AGAACACTGT TCTCCCGAAA CCAGACTTGC CCAAAACATC
5221 TGGCAAAGTT GAATTGCTTC CAAAAGTTCA CATTIATCAG AAGGACCTAT TCCCTACGGA
5281 AACTAGCAAT GGGTCTCCTG GCCATCTGSA TCTCCTGGA GGGAGCCTTC TTCAGGGAAC
5341 AGAGGGAGCG ATTAAGTGA ATGAAGCAAA CAGACCTGGA AAAGTTCCTT TTCTGAGAGT
5401 AGCAACAGAA AGCTCTGCAA AGACTCCCTC CAAGCTATTG GATCCTCTTG CTTGGGATAA
5461 CCACATATGGT ACTCAGATAC CAAAAGAGCA GTGGAAATCC CAAGAGAGAT CACCAAGAAA
5521 AACAGCTTTT AAGAAAAAGG ATACCATTTT GTCCCTGAAC GCTTGTGAAA GCAATCATGC
5581 AATAGCACCA ATAAATGAGG GACAAATAAA GCGCGAAATA GAAGTCACCT GGGCAAAGCA
5641 AGGTAGGACT GAAAGGCTGT GCTCTCAAAA CCCACCAGTC TTGAAACGCC ATCAACGGGA
5701 AATAACTCGT ACTACTCTTC AGTCAGATCA AGAGCAAAAT GACTATGATG ATACCATATC
5761 AGTTGAAATG AAGAAGGAAG ATTTTGACAT TTATGATGAG GATGAAAAATC AGAGCCCCCG
5821 CAGCTTTCAA AAGAAAACAC CACACTATTT TATTGCTGCA GTGGAGAGGC TCTGGGATTA
5881 TGGGATGAGT AGCTCCCCAC ATGT'TCTAAG AAACAGGGCT CAGAGTGGCA GTGCTCCTCA
5941 GTTCAAGAAA GTTGT'TTTC AGGAATTTAC TGATGGCTCC TTTACTCAGC CCTTATACCG
6001 TGGAGAATA AATGAACATT TGGGACTCCT GGGGCCATAT ATAAGAGCAG AAGTTGAAGA
6061 TAATATCATG GTAAC'TTTC GAAATCAGGC CTCTCGTCCC TATTOCTTCT ATTCTAGCCT
6121 TATTTCTTAT GAGGAAGAIC AGAGGCAAGG AGCAGAACCT AGAAAAAAT TTGTCAGGCC
6181 TAATGAAACC AAAACTTACT TTTGGAAAGT GCAACATCAT ATGGCACCCA CTAAGATGA
6241 GTTTGACTGC AAAGCCTGGG CTTATTTCTC TGATGTTGAC CTGGAAAAAG ATGTGCACTC
6301 AGGCCCTGAT GGACCCCTTC TGGTCTGCCA CACTAACACA CTGAACCCCTG CTCATGGGAG
6361 ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT TTTCACCATC TTTGATGAGA CCAAAAGCTG
6421 GTACTTCACT GAAATATATG AAAGAAACTG CAGGGCTCCC TGCAATATCC AGATGGAAGA
6481 TCCACTTTT AAAGAGAAAT ATCGCTTCCA TGCAATCAAT GGCTACATAA TGGATACACT
6541 ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG GATTCGATGG TATCTGCTCA GCATGGGCAG
6601 CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTTCA TGGACATGTG TTCACTGTAC GAAAAAAGA
6661 GGAGTATAAA ATGGACATGT ACAATCTCTA TCCAGGTGTT TTTGAGACAG TGGAAATGTT
6721 ACCATCCAAA GCTGGAATTT GCGGGCTGGA ATGCTTTATT GCGGAGCATC TACATGCTGG
6781 GATGAGCACA CTTTTCTGG TGTACAGCAA TAAGTGTGAG ACTCCCTTGG GAATGCTTC
6841 TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA TATGGACAGT GGGCCCCAAA
6901 TGTGGCCAGA CTTTATTATT CCGGATCAAT CAATGCCCTGG AGCACCAGG AGCCCTTTTC
6961 TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACCATT GATTAATCAC GGCATCAAGA CCCAGCGTSC
7021 CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC ATCATGTATA GTCTTGATGG
7081 GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC TTAATGGTCT TCTTTGCCAA

```

```

7141 TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTTAACCCCT CCAATTATTG CTCGATACAT
7201 CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCG CAGCACTCTT CGCATGGAGT TGATGGGCTG
7261 TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG AATGGAGAGT AAAGCAATAT CAGATGCACA
7321 GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC TGGTCTCCTT CAAAAGCTCG
7381 ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG GTGAATAATC CAAAAGAGTG
7441 GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA GTAACCTACT AGGGAGTAAA
7501 ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCTCTATC TCCAGCAGTC AAGATGGCCA
7561 TCAGTGGACT CTCTTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTCAGGGAA ATCAAGACTC
7621 CTTTACACCT GTGGTGAAC CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGCTACC TTGGAATTCA
7681 CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT GCGAGGCACA
7741 GGACCTCTAC GACAAAACCTC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCTCCAGAAC TCCTGGGCGG
7801 ACCGTCTAGT TTCTCTTCC CCCCCAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCGGACCCCC
7861 TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG
7921 GTACGTGGAC GCGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA
7981 CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCTCAC CGTCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA
8041 GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC
8101 CAAAGCCAAA GGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCGGGATGA
8161 GCTGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT
8221 CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT
8281 GTTGGACTCC GACGGCTCCT TCTCTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG
8341 GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC
8401 GCAGAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGTAA A

```

(ii) Fc (та же последовательность, что и A (ii) (SEQ ID NO: 3)).

C. (i) Последовательность ДНК тяжелой цепи (HC)-Fc (без линкера между HC и Fc) (сигнальный пептид подчеркнут, область Fc выделена жирным шрифтом) (SEQ ID NO: 7, которая кодирует SEQ ID NO: 8).

```

1 ATGCAAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TGCGATTCTG CTTTAGTGGC
61 ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA CTGTCTATGGG ACTATATGCA AAGTGAGCTC
121 GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCCT CTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC
181 ACCTCAGTCG TGTACAAAAA GACTCTCTTT GTAGAAATCA CGGATCAOCT TTTCACATC
241 GCTAAGCCAA GGCACCCCTG GATGGGTCTG CTAGGTCTTA CCATCCAGGC TGAGGTCTAT
301 GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCACTCT TCATGCTGTT
361 GGTGTATCCT ACTGGAAAAG TCTGTAGGGA GCTGAATATG ATGATCAGAC CAGTCAAAGG
421 GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTTCCCTGGT GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCTCT
481 AAAGAGAATG GTCCAATGCC CTCTGAOCCA CTGTGCCTTA CCTACTCATA TCTTTCTCAT
541 GTGGACCTGG TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCGTACTAGT ATGTAGAGAA
601 GGGAGTCTGG CCAAGGAAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATACTACT TTTTGCTGTA
661 TTTGATGAAG GGAAAAGTTG GCACTCAGAA ACAAAGAACT CCTTGATGCA GGATAGGGAT
721 GCTGCATCTG CTCGGGCTCG GCCTAAAATG CACACAGTCA ATGGTTATGT AAACAGGTCT
781 CTGCCAGGTC TGATTGGATG CCACAGSAAA TCAGTCTAAT GGCATGTGAT TGGAAATGGGC
841 ACCACTCTG AAGTGCATC AATATTCTCT GAAGGTGACA CATTTCTGTG GAGGAACCAT
901 CGCCAGGCGT CTTGGAAAT CTGCGCAATA ACTTTCTCTA CTGCTCAAAC ACTCTTGATG
961 GACCTTGGAC AGTTTCTACT GTTTTGTCTAT ATCTCTCCC ACCAACATGA TGGCATGGAA
1021 GCTTAATGTA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA
1081 GAAGCGGAAG ACTATGATGA TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT
1141 GATGACAACT CTCCTTCTTT TATCCAAATT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAACCT
1201 TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT AGTCTCTGCC
1261 CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG GCCCTCAGCG GATTGGTAGG
1321 AAGTACAAA AAGTCCGATT TATGGCATAC ACAGATGAAA CTTTAAGAC TCGTGAAGCT
1381 ATTCTAGCATG AATCAGGAAT CTTGGGACCT TTACTTTATG GGGAAGTTGC AGACACACTG

```

```

1441 TTGATTATAT TTAAGAATCA AGCAAGCAGA CCATATAACA TOTACCCCTCA CGGAATCACT
1501 GATGTCGGTC CTTTGTATTC AAGGAGATTTA CCAAAAGGTG TAAAACATTT GAAGGATTTT
1561 CCAATTCTGC CAGGAGAAAT ATTCAAATAT AAATGGACAG TGACTGTAGA AGATGGGCCA
1621 ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCGC TATTACTCTA GTTTCGTTAA TATGGAGAGA
1681 GATCTAGCTT CAGGACTCAT TGGCCCTCTC CTCATCTGCT ACAAAGAATC TGTAGATCAA
1741 AGAGGAAACC AGATAATCTC AGACAAGAGG AATGTCATCC TGTTTTCTGT ATTTGATGAG
1801 AACC GAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTTC TCCCCAATCC AGCTGGAGTG
1861 CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCTCC AACATCATGC ACAGCATCAA TGGCTATGTT
1921 TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTTGTITG CATGAGGTGG CATACTGGTA CATTCTAAGC
1981 ATTGGAGCAC AGACTGACTT CCTTCTGTGC TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA
2041 ATGGTCTATG AAGACACACT CACCCATTTC CCATTCTCAG CAGAAACTGT CTTTCATCTCG
2101 ATGGAAGAAC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACAACCT CAGACTTTCC GAACAGAGGC
2161 ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAACA CTGGTGATTA TTACGAGGAC
2221 AGTTATGAAG ATATTTCAGC ATACTTGCTG AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAGAC
2281 AAACTCACA CATGCCACC GTGCCAGCT CCAGAACTCC TGGGCGGACC GTCAGTCTTC
2341 CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTACATGTC
2401 GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCCT GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGACGGC
2461 GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGCGAGGACC ACTACAACAG CACGTACCGT
2521 GTGGTCAGCG TCCTCACCCT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC
2581 AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG
2641 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTC CCCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC
2701 CAGGTTCAGC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCCG CGTGGAGTGG
2761 GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACCTAC AAGACCACGC CTCCCGTGTG GACTCCGAC
2821 GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
2881 GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
2941 TCCTGTCTC CGGGTAAA

```

С. (ii) Последовательность ДНК тяжелой цепи (НС)-Fc (с линкером длиной 5 аминокислот между НС и Fc) (сигнальный пептид подчеркнут, область Fc выделена жирным шрифтом, линкер длиной 5 аминокислот подчеркнут двойной чертой) (SEQ ID NO: 9, которая кодирует SEQ ID NO: 10)

```

1 ATGCAAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCCTT TGCGATTCTG CTTTAGTGGC
61 ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA CTGTCATGGG ACTATATGCA AASTGATCTC
121 GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCTT CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC
181 ACCTCAGTCG TGTACAAAAA GACTCTGTTT GTAGAATTCA CGGATCACCT TTTC AACATC
241 CCTAAGCCAA GGCCACCCTG GATGGGTCTG CTAGGTCTTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
301 GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCACTCT TCATGCTGTT
361 GGTGTATCCT ACTGGAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG ATGATCAGAC CAGTCAAAGG
421 GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTTCCCTGGT GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCTCTG
481 AAAGAGAATG GTCCAATGGC CTCTGACCCA CTGTGCCCTA CCTACTCATA TCTTTCTCAT
541 GTGGACCTGG TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCCTACTAGT ATGTAGAGAA
601 GGGAGTCTGG CCAAGGAAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATACTACT TTTTGCTGTA
661 TTTGAIGAAG GGAAAAGTTG GCACTCAGAA ACAAAAGAACT CCTTGATGCA GGATAGGGAT
721 CCTGCATCTG CTCEGGCCTG GCCTAAAATG CACACAGTCA ATGGTTATGT AAACAGGTCT
781 CTGCCAGGTC TGATTGGATG CCACAGGAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGGAAATGGGC
841 ACCACICCTG AAGTGCACTC AATATTCTTC GAAGGTCACA CATTCTCTGT GAGGAACCAT
901 CGCCAGGCGT CCTTGAAAT CTGCCCAATA ACTTTCCCTA CTGCTCAAAC ACTCTTGATC
961 GACCTTGGAC AGTTTCTACT GTTTTGTCTAT ATCTCTTCCC ACCAACATGA TGGCATGCAA
1021 GCTTAATGTA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA
1081 GAAGCGGAAG ACTATGATGA TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT
1141 GATGACAACT CTCCTTCCCT TATCCAAAT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAACT
1201 TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT AGTCTCTGCC
1261 CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG GCCCTCAGCG GATTGGTAGG
1321 AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATAC ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT

```

```

1381 ATTCAGCATG AATCAGGAAT CTGGGGACCT TTACTTTATG GGGAAAGTTGG AGACACACTG
1441 TTGATTATAT TTAAGAATCA AGCAAGCAGA CCAATAAACA TCTACCCTCA CGGAATCACT
1501 CATGTCCGTC CTTTGTATTC AAGGAGATTA CCAAAAGGTG TAAAACATTT GAAGGATTTT
1561 CCAATTCTGC CAGGAGAAAT ATCCAAATAT AAATGGACAG TGACTGTAGA AGATGGGCCA
1621 ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCGACCCGC TATTACTCTA GTTTCGTTAA TATGGAGAGA
1681 CATCTAGCTT CAGGACTCAT TSGCCCTCTC CTCACTGTGT ACAAAGAATC TGTAGATCAA
1741 AGAGGAAACC AGATAATCTC AGACAAGAGG AATGTCATCC TGTTTTCTGT ATTTGATGAG
1801 AACCAGAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAAAGCTTTC TCCCCAATCC AGCTGGAGTG
1861 CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCTCC AACATCATGC ACAGCATCAA TCGCTATGTT
1921 TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTTGTGTT CATGAGGTGG CATACTGCTA CATTCTAAGC
1981 ATTCGAGCAC AGACTGACTT CCTTTCTGTC TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA
2041 ATGCTCTATG AAGACACACT CAGCCTATTC CCATTCTCAG GAGAACTGT CTTCATGTGG
2101 ATGGAAAACC CAGGTCTATG GATTCIGGGG TGCCACAACCT CAGACTTTGG GAACAGAGGC
2161 ATGACCGCTT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAAAC CTGGTGATTA TTACGAGGAC
2221 ACTTAATCAG ATATTTCAGC ATACTTCTGT ACTAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAGAG
2281 TTCTCCCAAG ATGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCTCCAGA ACTCCTGGGC
2341 GGACCGTCAG TCTTCTCTTT CCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC
2401 CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC
2461 TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC
2521 AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCTGTC ACCAGGACTG GCTGAATGGC
2581 AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAAACAA GCCCTCCCAG CCCCCATCGA GAAAACCATC
2641 TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAT
2701 GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC
2761 ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCTCCC
2821 TGGTTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCTCT TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG
2881 TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
2941 ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAA

```

C. (iii) Последовательность ДНК легкой цепи (LC)-Fc (сигнальный пептид подчеркнут, область Fc выделена жирным шрифтом) (SEQ ID NO: 11, которая кодирует SEQ ID NO: 12)

```

1 ATGGGAGACAG ACACACTCCT CCATGCGGTA CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG TTCCACTGGT
61 GAAATAACTC GTACTACTCT TCAGTCAGAT CAAGAGGAAA TTGACTATGA TGATACCATA
121 TCAGTTGAAA TGAAGAAGGA AGATTTTGAC ATTTATGATG AGCATGAAAA TCAGAGCCCC
181 CCACCTTTTC AAAAGAAAAC ACGACACTAT TTTATTGCTG CAGTGGAGAG GCTGTGGGAT
241 TATGGGATGA GTAGCTCCCC ACATGTTCTA AGAAACAGGG CTCAGAGTGG CAGTGTCCCT
301 CAGTTCAAGA AAGTTGTTTT CCAGGAATTT ACTGATGGCT CCTTTACTCA GGCTTATAC
361 CCTGGAGAAC TAAATGAACA TTTGGGACTC CTGGGGCCAT ATATAAGAGC AGAAGTTGAA
421 GATAATATCA TGGTAACTTT CAGAAATCAG GCCTCTGCTC CCTATCCTCT CTATTCTAGC
481 CTTATTTCTT ATGAGGAAGA TCAGAGCCAA CGAGCAGAAC CTAGAAAAAA CTTTGTCAAG
541 CCTAATGAAA CCAAAACCTA CTTTTGAAA GTGCAACATC ATATGGCACC CACTAAAGAT
601 CAGTTTGACT GCAAGCCCTG GGCTTATTTT TCTGATGTGT ACCTGGAAAA AGATGTGCAC
661 TCAGGCCTCA TTGGACCCCT TCTGGTCTGC CACACTAACA CACTGAACCC TGCTCATGGG
721 AGACAAGTGA CAGTACAGGA ATTGCTCTCT TTTTTCACCA TCTTTGATGA GACCAAAAGC
781 TGGTACTTCA CTGAAAATAT GGAAAGAAAC TGCAGGGCTC CCTGCAATAT CCAGATGCAA
841 GATCCCACTT TTAAAGAGAA TTATCGCTTC CATGCAATCA ATGGCTACAT AATGGATACA
901 CTACCTGGCT TAGTAATGGC TCAGGATCAA AGGATTGAT GGTATCTGCT CAGCATGGGC
961 AGCAATGAAA ACATCCATTC TATTCATTTT AGTGGACATG TGTTCACTGT ACGAAAAAAA
1021 GAGGAGTATA AAATGGCACT GTACAATCTC TATCCAGCTG TTTTTGAGAC AGTGGAAATG
1081 TTACCATCCA AAGCTGGAAT TTGGGGGCTG GAATGCCCTTA TTGGCGAGCA TCTACATGCT
1141 GGGATGAGCA CACTTTTCTT GGTGTACAGC AATAAGTGTC AGACTCCCTT GGGAATGGCT
1201 TCTGGACACA TTAGAGATTT TCAGATTACA GCTTCAGGAC AATAAGGACA GTGGGCCCCA
1261 AAGCTGGCCA GACTTCATTA TTCCGGATCA ATCAATGCCT GGAGCACCAC GGAGCCCTTT
1321 TCTTGGATCA AGGTGGATCT GTGGGCACCA ATGATTATTC ACGGCATCAA GACCCAGGGT

```

```

1381  GCCCCGTCAGA AGTTCTCCAG CCTCTACATC TCCTCAGTTTA TCATCATGTA TAGTCTTGAI
1441  GGGGAAGAAGT GGCAGACTTA TCGAGGAAAT TCCACTGGAA CCTTAATGGT CTCTCTTGGC
1501  AATGTCGATT CATCTGGGAT AAAACACAAT ATTTTAAACC CTCCAATTAT TGCTCGATAC
1561  ATCCGTTTGC ACCCAACTCA TTATAGCATT CGCAGCACTC TTCGCATGGA GTTCATGGGC
1621  TGTGATTTAA ATAGTTGCAG CATGCCATTG GGAATGGAGA GTAAAGCAAT ATCAGATCCA
1681  CAGATTAATC CTTCATCCTA CTTTACCAAT ATGTTTGCCA CCTGGTCTCC TTCAAAAGCT
1741  CGACTTCAAC TCCAAGGGAG GAGTAATGCC TGGAGACCTC AGGTGAATAA TCCAAAAGAG
1801  TGGCTGCAAG TGGACTTCCA GAAGACAATG AAAGTCACAG GAGTAACTAC TCAGGGAGTA
1861  AAATCTCTGC TTACCAGCAT GTATGTGAAG GAGTTCCTCA TCTCCAGCAC TCAAGATGGC
1921  CATCAGTGA CTCTCTTTTT TCAGAAATGGC AAAGTAAAGG TTTTTCAGGG AAATCAAGAC
1981  TCCTTCACAC CTGTGGTGAA CTCTCTAGAC CCACCGTTAC TGACTCGCTA CCTTCGAATT
2041  CACCCCCAGA GTTGGGTGCA CCAGATTGCC CTGAGGATGG AGGTCTCTGGG CTGCGAGGCA
2101  CAGGACCTCT ACGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCTCCAGA ACTCCTGGGC
2161  GGACCGTCAG TCTTCTCTTT CCCCCAAA CCACAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC
2221  CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTC AAC
2281  TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC
2341  AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCTCT ACCGTCTCTG ACCAGGACTG GCTGAATGGC
2401  AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC
2461  TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAT
2521  GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC
2581  ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCTCCC
2641  GTGTTGGA CTGACGGCTC CTCTCTCTCT TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG
2701  TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
2761  ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAA

```

Таблица 2. Полипептидные последовательности

А. Гибрид FVIII с делегированным В-доменом-Fc мономера (BDD FVIII-Fc-мономер-димер): создан совместной экспрессией BDD FVIII-Fc и цепей Fc.

Конструкция = химерная сшивка HC-LC-Fc. Экспрессионную кассету для Fc трансфецируют совместно с BDDFVIII-Fc с образованием BDD FVIII-Fc-мономера. В случае цепи BDD FVIII-Fc, последовательность Fc указана жирным шрифтом; последовательность HC подчеркнута двойной линией; оставшаяся часть В-домена указана курсивом. Сигнальные пептиды подчеркнуты.

i) Цепь FVIII с делегированным В-доменом-Fc (сигнальная последовательность из 19 аминокислот подчеркнута) (SEQ ID NO: 2).

```

MQIELSTCFFLCLLRFCFS
ATTRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNISVVYKKTLFVEFTDHLFENIAKPR
PPWMGLLGPTIQAEVYDVTVVITLKNMASHFVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFP
GGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDPKMDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKF
ILLFAVFDGKSWHSETKNSLMQDRDAASARWAPKMHVTNGYVNRSLPGLIGCHRSVYWHVIGM
GTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPTFLTAQTLMDLGQFLFCHISSHQHDGMEAYVK
VDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDI.TDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEE
EDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLYG
EVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDG
PTKSDPRCLTRYSSFEVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSW
YLTENIQRFLLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS
VFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFFSGETVFMSENPGWLWILGCHNSDFRNRMGTALLKVSSCDKNT
GDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNPVLRKHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKK
EDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPFKKVVFQEF
DGSFTQPLYRGELNEHLGLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPK
NFVKPNETKTYFWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAGHR
QVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVM
AQDQIRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVE
CLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDEFQITASGQYQGWAPKLARLHYSGSINAWST
KEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGN
VDSSGIKHNIIFNPPIIARYIRLHPHTYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASS
YFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTQGVKSLTSMYVKE
FLISSQDGHQWTLFFQNGKVVFQGNQDSFTPVNSLDPPLLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVL
GCEAQDLYDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
YVDQVEVHNAAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYVTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

ii) Цепь Fc (гетерологичный сигнальный пептид длиной 20 аминокислот из цепи Igk мыши подчеркнут) (SEQ ID NO: 4).

METDTLLLWVLLLWVPGSTG

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
LTTPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

В. Гибрид полноразмерного FVIII_h-мономера (полноразмерного FVIII_h-мономер-димер): создан совместной экспрессией цепей FVIII_h и Fc.

Конструкция = химерная сшивка HC-B-LC-Fc. Экспрессионную кассету для Fc трансфецируют совместно с полноразмерным FVIII_h-Fc с образованием полноразмерного FVIII_h-мономера. В случае цепи FVIII_h, последовательность Fc указана жирным шрифтом; последовательность HC подчеркнута двойной линией; последовательность В-домена указана курсивом. Сигнальные пептиды подчеркнуты.

i) Цепь полноразмерного FVIII_h (сигнальный пептид FVIII подчеркнут (SEQ ID NO: 6))

MQIELSTCFFLCLLRFCFS

ATTRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFP
PPRVPKSFPFNTSVVYKKTLEFVEFTDHLFNI
AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASH
PSLHAGVSVYWKASEGAEYDDOTSQREKED
DKVFP
GGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSH
VDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTL
HKFI
ILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARA
WPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKS
SVYWHVIGM
GTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPI
TFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAY
VK
VDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSMDV
VRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTTWVHYIAAE
EDWDYAPLVLAPDDRSYKSOYLNNGPQRIGR
KYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGIIGPL
LYG
EVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLY
SRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVE
DG
PTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLCY
KESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSW
YLTENIQRFELPNPAGVQLEDPEFQASNIMHS
INGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDF
LS
VFFSGYTFKHKMVEYEDTLTLFPFSGETVFMS
MENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCD
KNT
GDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSONSR
HPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPPFAHRTMP
KIQNVSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEA
KYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLH
HSG
DMVFTPESGQLRLNEKLGTTAATELKKLDKVS
SSTSNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMF
VHYDSQLDITLFGKKSSPLTESGGPLSLSEEN
NDSKLLSGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFK
G
KRAHGPAALLTKDNALFKVSI
SLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENS
PSVWQNI
LES
DTFEK
KVTPLIHDRMLMDKNATALRLN
HMSNKTSSKNMEMVQKKEGP
IPPDANFDM
SFFKMLFL
PES
ARWIQRT
HGKNSLNSGQGPS
PKQLVSLGPEKS
VEGQNF
ELSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFP
S
SRNLF
LTNL
DLN
HN
HN
THNQEK
QEEIEK
ETLIQEN
VVLPQIHTVTGT
KNFMKNL
FLLSTRQ
N
VEGSYD
GAYAPV
LD
QD
FRSLND
STNR
TKKHTAH
FSKKGEE
ENLEGLGNQTKQ
IVEKYACT
TRISPN
TSQQNF
VTQ
RSKRALKQ
FR
LPLEETE
LEKRI
I
VDDT
STQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKE
KGAI
TQSPLSDCL
TRSHSIPQAN
RSPLPIAKVSS
FP
SIRPIYL
TRVLFQDNSSHLPAAS
YRKKD
SGVQE
SSHFLQ
GAKNNLSLAILT
LEMTGDQREV
GLGTSATNSV
TYKKVENTVLPKPDLP
RTSGKV
VELL
PKVHIYQKDLFPT
ETSN
SGSPGHLDL
VEGSL
LQGT
EGA
IKWNEAN
RP
PKVPFLRV
ATESSAK
TPSK
LLDPLAW
DNHYGTQIPKEE
WKSQEK
SP
EKTA
FKK
KDTILSLN
ACESN
HAIAA
INECQNKPE
IEVT
WAKQGR
TERLCSQNPPVLKR
HQREIT
RTLQSDQEE
IDYDDTIS
VEMKKE
DFDIY
DEDENQ
SPRS
FQKKTR
HYFIAA
VERLWDYGMSSSPH
VLNR
NAQSGSV
PQFKKV
VQEFTDGS
FTQPLY
R
GELNEH
LGLLGPY
IRAE
VEDNIM
VTFRNQASRPYS
FYSS
LISYEEDQ
RQGAEP
PKNEV
KPNETKTY
FWKVQ
HMMA
PTKDE
FDCKAWAY
FS
DVDLEKDVHSG
LIGPLL
VCHTNTLNPAHGRQ
VTVQEF
ALFF
TI
FDE
TKSWYFT
ENMER
NCRAPCNIQ
MEDPT
FKENY
RFHA
INGYIM
DTLPGLVMAQDQ
RIRWYLL
SMGSN
ENIHSI
HFSGHV
FTVRKKEEY
KMALYN
LYPGVFET
VEMLPSKAGI
WRVECLIGEHLHAGM
STLFL
VYSNKCQ
TP
LG
MASGHIRDFQITASG
QYGQWAPKLARLH
YSGSINAWSTKEP
FSWIKVDLLAPMI
IHG
IKTQGARQ
KFSSLYISQFIIM
YSLDGKKWQTYRGN
STGTLMVFFGNVDSSGI
KNIFNPPII
ARYIRLHP
THYSIR
STLR
MELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARL
HLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKV
TGVTTQGVKSL
LTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFF
QNGKVVFQGNQDSFTPVVNSLDP
LLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ii) Цепь Fc (гетерологичный сигнальный пептид длиной 20 аминокислот из цепи Igk мыши подчеркнут) (SEQ ID NO: 4)

METDTLLLWVLLLVPGSTG
 DKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
 LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

С. Гетеродимерный гибрид FVIII-Fc.

Создается путем совместной трансфекции конструкций HC-Fc и LC-Fc. Были сделаны две HC-Fc конструкции. Одна не содержит линкера между HC и Fc (HC-Fc), тогда как другая содержит линкер из 5 аминокислот между HC и Fc (HC+5-Fc). Для конструкций HC-Fc использовали сигнальный пептид FVIII, а для конструкций LC-Fc - сигнальную последовательность из Igk мыши.

(i) HC-Fc (последовательность Fc указана жирным шрифтом, сигнальный пептид подчеркнут) (SEQ ID NO: 8).

MQIELSTCFFLCLLRFCFS
 ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRPVPSFPPNTSVVYKKTLEFVEFTDHLFNIAPR
 PPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFP
 GGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKF
 ILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGM
 GTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVK
 VDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTVWHYIAAEE
 EDWDYAPLVLPAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGFLLYG
 EVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDG
 PTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSW
 YLTENIQRFPLNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS
 VFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNT
 GDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR**DKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT**
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(ii) HC+5-Fc (последовательность Fc указана жирным шрифтом, последовательность линкера длиной 5 аминокислот (из В-домена FVIII) указана курсивом, сигнальный пептид подчеркнут) (SEQ ID NO: 10)

MQIELSTCFFLCLLRFCFS
 ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRPVPSFPPNTSVVYKKTLEFVEFTDHLFNIAPR
 PPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFP
 GGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKF
 ILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGM
 GTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVK
 VDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTVWHYIAAEE
 EDWDYAPLVLPAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGFLLYG
 EVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDG
 PTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSW
 YLTENIQRFPLNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS
 VFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNT
 GDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR**SCQDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR**
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(iii) LC-Fc6His (последовательность Fc указана жирным шрифтом, сигнальный пептид подчеркнут) (SEQ ID NO: 12)

METDTLLLVVLLWVPGSTG

EITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDEFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSS
SPHVLNRNAQSGSVPOQFKKVVFEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQ
ASRPYSFYSSLSIYEEDQRQGAEPKKNFVKPNETKTYFWKVQHMAPTKDEFDCWAYFSDVDL
EKDVHSGSLIGPLLVCNTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTFIDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQME
DPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKM
ALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGELHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMAAGHIRDFQIT
ASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFII
MYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIENPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMG
CDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVD
FQKTMKVTGVTQGVKSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLD
PPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDVLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
K

Таблица 3. Определение времени свертывания цельной крови (WBCT) у мышей с гемофилией А после разовой внутривенной дозы 50 МЕ/кг rFVIIIc или РеФакто®.

А.

		Время отбора проб крови, ч							
Лечение	Номер животного	До введения дозы	0,25	24	36	42	96	113	120
		WBCT, мин							
50 МЕ/кг РеФакто®	1	>60	18	>60	ND	ND			
	2	>60	5	16	>60	ND			
	3	>60	4	7	>60	ND			
	4	>60	7	8	10	>60			
	5	>60	6	9	16	>60			
	6	>60	5	15	>60	ND			
50 МЕ/кг rFVIIIc	7	>60	7				8	>60	ND
	8	>60	5				8	>60	ND
	9	>60	4				16	>60	ND
	10	>60	3				11	4	>60
	11	>60	3				9	>60	ND
	12	>60	4				6	>60	ND

ND = не определялось, так как предыдущая временная точка была >60 мин

В.

		Время отбора проб крови, ч					
Лечение	Номер животного	До введения дозы	0,25	24	48	96	120
		WBCT, мин					
50 МЕ/кг РеФакто®	1	>60	11	15	>60	>60	ND
	2	>60	3	3	>60	>60	>60
	3	>60	4	6	>60	>60	>60
50 МЕ/кг rFVIIIc	4	>60	3	5	5	>60	>60
	5	>60	3	6	7	13	>60
	6	>60	5	8	9	9	>60

ND = не определялось, так как предыдущая временная точка была >60 мин.

Таблица 4. Фармакокинетические параметры после разовой внутривенной дозы у мышей с гемофилией А (50 МЕ/кг)

Лечение	C _{max} (МЕ/мл)	AUC (ч×МЕ/мл)	T _{1/2} (ч)	CL (мл/ч/кг)	V _{ss} (мл/кг)
rFVIIIc	1,56	22,6	11,1	2,09	28,4
РеФакто®	0,67	6,94	5,0	7,2	43,8
Адвейт®	0,47	3,90	7,1	12,8	103

Таблица 5. Фармакокинетические параметры после разовой внутривенной дозы у собак с гемофилией А (125 МЕ/кг rFVIII^{Fc}, 114 и 120 МЕ/кг РеФакто®).

А. Фармакокинетические параметры согласно данным по хромогенному анализу активности.

Лечение	C _{max} (МЕ/мл)	AUC (ч×МЕ/мл)	T _{1/2} (ч)	Клиренс CL (мл/ч/кг)	Vz (мл/кг)
rFVIII ^{Fc}	2,0 ± 0,54	25,9 ± 6,47	15,4 ± 0,3	5,1 ± 1,4	113 ± 29
РеФакто®*	2,0	18,2	7,4	6,5	68,7

В. Фармакокинетические параметры согласно данным ELISA.

Лечение	C _{max} (нг/мл)	AUC (ч×нг/мл)	T _{1/2} (ч)	Клиренс CL (мл/ч/кг)	Vz (мл/кг)
rFVIII ^{Fc}	210 ± 33	2481 ± 970	15,7 ± 1,7	6,2 ± 3,0	144 ± 83
РеФакто®*	211	1545	6,9	8,7	85

Среднее ± ст. откл., n = 4 для rFVIII^{Fc}, n = 2 для РеФакто®;

*ст. откл. для РеФакто® не приведено, так как в исследовании участвовало всего две собаки.

Таблица 6. Активность в отношении свертывания, измеренная по АПТВ, у собак с гемофилией А после разовой внутривенной дозы rFVIII^{Fc} или РеФакто®

ID собаки	Лечение	АПТВ, сек	
		До дозы	Через 5 мин после дозы
M10	rFVIII ^{Fc}	86,5	53,6
M11	rFVIII ^{Fc}	99,8	56,4
M12	rFVIII ^{Fc}	119	68,7
	РеФакто®	108	60,7
M38	rFVIII ^{Fc}	115	76,6
	РеФакто®	118	68,0

Таблица 7. Концентрация в плазме rFVIII^{Fc} или Ксинта у обезьян после введения в виде разовой внутривенной дозы 125 МЕ/кг, измеренная с помощью ELISA

А. Концентрация в плазме rFVIII^{Fc} (мкг/мл)

Время, ч	Группа 1			Группа 2			Среднее	Ст.откл.
	604376	606595	С36195	С36066	С36174	604362		
До дозы	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
0,25	0,400	0,334	0,374	0,348	0,383	0,323	0,360	0,030
4	0,266	0,259	0,236	0,233	0,259	0,217	0,245	0,019
12	0,165	0,152	0,12	0,15	0,161	0,149	0,150	0,016
24	0,079	0,074	0,047	0,08	0,088	0,076	0,074	0,014
36	0,035	0,04	0,022	0,04	0,041	0,046	0,037	0,008
48	0,019	0,021	BLQ	0,021	0,024	0,025	0,022	0,002

В. Концентрация в плазме Ксинта (мкг/мл)

Время, ч	Группа 1			Группа 2			Среднее	Ст.откл.
	604376	606595	С36195	С36066	С36174	604362		
До дозы	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
0,25	0,252	0,074	0,155	0,317	0,217	0,167	0,197	0,084
4	0,197	0,159	0,152	0,229	0,19	0,082	0,168	0,051
12	0,137	0,099	0,104	0,166	0,158	0,081	0,124	0,035
24	0,09	0,068	0,051	0,082	0,08	0,084	0,076	0,014
36	0,037	0,043	0,015	0,041	0,035	BLQ	0,034	0,011
48	0,022	BLQ	BLQ	0,017	0,013	BLQ	0,017	0,005

Таблица 8. Концентрация в плазме rFVIII^{Fc} или Ксинта у обезьян после введения в виде разовой внутривенной дозы 125 МЕ/кг, измеренная с помощью хромогенного анализа активности, специфичной для

FVIII (приведена в МЕ/мл)

А. Ксинта

Время(ч)	Группа 1			Группа 2		
До дозы	604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362
0,25	5,62	4,55	5,01	4,5	5,15	3,77
4	3,9	4,05	3,2	3,19	3,46	2,36
12	2,51	2,82	1,69	2,17	2,5	2,01
24	1,67	1,66	1,18	0,95	1,57	1,5
36	0,7	0,85	0,48	0,44	0,85	0,82
48	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	0,38	0,48

В. rFVIIIFc

Время(ч)	Группа 1			Группа 2		
До дозы	604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362
0,25	4,31	3,82	3,54	4,13	4,12	3,68
4	3	3,36	2,53	2,7	2,74	2,81
12	2	2,15	1,42	2,28	2,75	2,22
24	1,01	1,17	0,5	1,5	1,61	1,01
36	BLQ	0,52	0,48	0,88	0,72	0,64
48	0,31	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
72	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	0,31	BLQ

BLQ = ниже предела количественного определения.

Таблица 9. Фармакокинетические параметры rFVIII Fc после разовой дозы 125 МЕ/кг

ФК параметр	rFVIII Fc, данные ELISA							
	Единицы	Группа 1			Группа 2			Среднее Ст.отк л.
		604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362	
T _{max}	Ч	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25 0,00
C _{max}	мкг/мл	0,4	0,334	0,374	0,348	0,383	0,323	0,368 0,030
T _{1/2}	Ч	11,4	13,3	9,3	12,7	12,7	14,1	11,9 1,7
AUC	мкг×ч/мл	5,86	5,65	4,37	5,56	4,37	5,58	5,16 0,68
Клиренс CL	мл/ч/кг	2,15	2,23	2,88	2,27	2,07	2,26	2,32 0,29
V _z	мл/кг	35,3	42,5	38,8	37,9	37,9	46,1	38,5 3,9
MRT	Ч	15,3	17	12,1	17,1	17,3	19,2	15,8 2,4
ФК параметр	rFVIII Fc, данные по хромогенной активности							
	Единицы	Группа 1			Группа 2			Среднее Ст. откл.
		604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362	
T _{max}	Ч	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25 0,00
C _{max}	МЕ/мл	4,31	3,82	3,54	4,13	4,12	3,68	3,93 0,30
T _{1/2}	Ч	13,4	12,0	11,6	17,5	12,4	29,4	16,1 6,9
AUC	МЕ×ч/мл	74,7	75,5	53,5	92,9	88,9	92,7	79,7 15,2
Клиренс CL	мл/ч/кг	1,67	1,65	2,34	1,35	1,41	1,35	1,63 0,38
V _z	мл/кг	32,3	28,7	39,2	33,9	25,2	57,2	36,1 11,4
MRT	Ч	17,8	16,8	16,9	25	19,2	33,3	21,5 6,5

Таблица 10. Фармакокинетические параметры Ксинта после разовой внутривенной дозы (125 МЕ/кг)

ФК параметр	Ксинта, данные ELISA							
	Единицы	Группа 1			Группа 2			Ст. откл.
		604376	606595	С36195	С36066	С36174	604362	
T _{max}	Ч	0,25	4	0,25	0,25	0,25	0,25	0,88
C _{max}	МЕ/мл	0,252	0,159	0,155	0,317	0,217	0,167	0,21
T _{1/2}	Ч	13,6	19,9	9,7	11	9,2	ND	12,7
AUC	МЕ×ч/мл	5,15	4,39	3,17	5,53	4,79	6,32	5,24
Клиренс CL	мл/ч/кг	2,21	2,6	3,59	2,06	2,38	ND	2,57
V _z	мл/кг	43,4	74,7	50,1	32,9	31,5	ND	46,5
MRT	Ч	19	28,4	14	16,1	15,9	ND	18,7
ФК параметр	Ксинта, данные по хромогенной активности							
	Единицы	Группа 1			Группа 2			Ст. откл.
		604376	606595	С36195	С36066	С36174	604362	
T _{max}	Ч	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
C _{max}	МЕ/мл	5,62	4,55	5,01	4,5	5,15	3,77	4,77
T _{1/2}	Ч	12,8	14,3	11,4	10,4	11,7	14,6	12,5
AUC	МЕ×ч/мл	97,1	104,2	71,3	70,7	94,0	82,8	86,7
Клиренс CL	мл/ч/кг	1,29	1,20	1,75	1,77	1,33	1,51	1,48
V _z	мл/кг	23,7	24,8	28,9	26,6	22,5	31,8	26,4
MRT	Ч	17,8	20,1	16,0	14,8	18,4	23,2	18,4

Таблица 11. Активация фактора X

	Km (нМ)	V _{max} (нМ/мин)
rFVIII _{Fc}	55,0 ± 5,9	65,6 ± 8,6
BDD FVIII	51,0 ± 8,7	73,5 ± 10,1

Таблица 12. Взаимодействие с фактором IXa

	Kd (нМ)	V _{max} (нМ/мин)
rFVIII _{Fc}	2,8 ± 0,4	4,5 ± 0,3
BDD FVIII	2,5 ± 0,3	4,0 ± 1,0

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ введения фактора VIII ("FVIII") человеку, которому необходима хирургическая профилактика, периоперационное лечение или лечение повреждений, возникших при проведении хирургического вмешательства, включающий введение человеку множественных доз от 25 до 60 МЕ/кг химерного полипептида FVIII длительного действия, содержащего часть, соответствующую FVIII, и партнер по связыванию рецептора к Fc ("FcRn BP"), с интервалом между введением доз от 12 до 24 ч между двумя дозами, где FcRn BP содержит Fc, где Fc слит с С-концом части FVIII.

2. Способ по п.1, где указанный FcRn BP представляет собой Fc.

3. Способ по п.1 или 2, где введение предотвращает эпизод кровотечения у человека.

4. Способ по любому из пп.1-3, где хирургическое вмешательство представляет собой малое хирургическое вмешательство, обширное оперативное вмешательство, удаление зуба, удаление миндалин, грыжесечение паховой грыжи, синовэктомия, полную замену коленного сустава, краниотомию, остеосинтез, хирургическое вмешательство при травме, внутричерепное хирургическое вмешательство, внутрибрюшное хирургическое вмешательство, внутригрудное хирургическое вмешательство или хирургическую замену сустава.

5. Способ по любому из пп.1-4, где хирургическое вмешательство представляет собой обширное оперативное вмешательство.

6. Способ по любому из пп.1-5, где каждая из множественных доз составляет 30, 40 или 50 МЕ/кг.

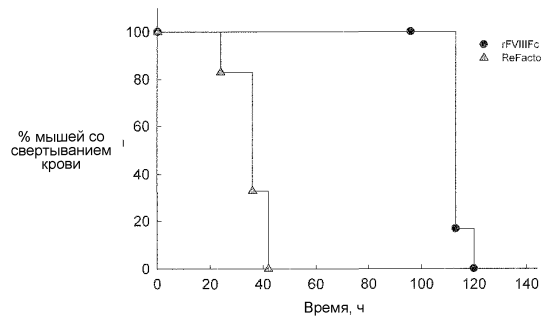
7. Способ по любому из пп.1-6, где интервал между введением доз составляет от 12 до 24 ч.

8. Способ по любому из пп.1-6, где каждая из множественных доз составляет от 25 до 40 МЕ/кг и интервал между введением доз составляет 24 ч.

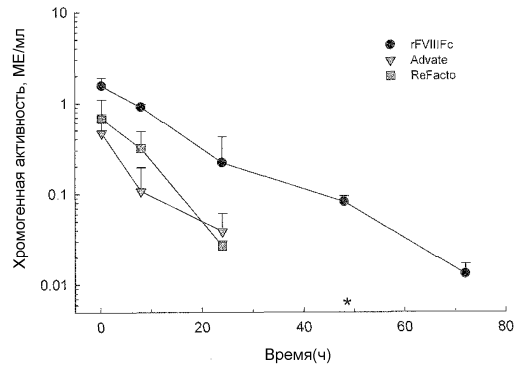
9. Способ по любому из пп.1-6, где каждая множественная доза составляет от 25 до 40 МЕ/кг и интервал между введением доз составляет 12 ч.
10. Способ по любому из пп.1-6, где каждая множественная доза составляет от 40 до 60 МЕ/кг и интервал между введением доз составляет 24 ч.
11. Способ по любому из пп.1-6, где каждая множественная доза составляет от 40 до 60 МЕ/кг и интервал между введением доз составляет 12 ч.
12. Способ по любому из пп.1-11, где часть, соответствующая FVIII, содержит полноразмерный FVIII, зрелый FVIII или FVIII с полной или частичной делецией В-домена.
13. Способ по любому из пп.1-12, где средний клиренс (CL) (активность) у человека составляет $2,33 \pm 1,08$ мл/ч/кг или меньше.
14. Способ по любому из пп.2-13, где среднее время удержания (MRT) (активность) у человека в 1,5 раза больше, чем среднее значение MRT (активность) полипептида, состоящего из той же части, соответствующей FVIII, без Fc.
15. Способ по любому из пп.1-14, где время полужизни ($t_{1/2}$) (активность) у человека в 1,5 раза больше, чем среднее значение $T_{1/2}$ (активности) полипептида, состоящего из той же части, соответствующей FVIII, без Fc.
16. Способ по любому из пп.1-15, где средняя удельная степень извлечения (значение K) у человека составляет 90% от средней удельной степени извлечения полипептида, состоящего из той же части, соответствующей FVIII, без Fc.
17. Способ по любому из пп.1-16, где среднее значение объема распределения в стабильном состоянии V_{ss} (активность) у человека составляет от 37,7 до 79,4 мл/кг.
18. Способ по любому из пп.1-17, где значение AUC/дозу (активность) у человека составляет от 19,2 МЕ·ч/дл на МЕ/кг до 81,7 IU·ч/дл на МЕ/кг.
19. Способ по п.1, где человеку необходимо периоперационное лечение при хирургическом вмешательстве.
20. Способ введения фактора VIII ("FVIII") человеку-человеку, которому необходима хирургическая профилактика, периоперационное лечение или лечение повреждений, возникших при проведении хирургического вмешательства, причем указанный способ включает введение человеку множественных доз от 35 до 50 МЕ/кг химерного полипептида FVTII длительного действия с интервалом между введением доз от 12 до 24 ч, где химерный полипептид FVTII содержит часть соответствующую FVIII и партнер по связыванию FcRn ("FcRn BP"), где FcRn BP содержит Fc, где Fc слит с С-концом части FVIII.
21. Способ по п.20, где каждая из множественных доз составляет от 35 до 40 МЕ/кг.
22. Способ по п.20, где каждая из множественных доз составляет от 40 до 60 МЕ/кг.
23. Способ по п.20, где каждая из множественных доз составляет от 40 до 50 МЕ/кг.
24. Способ по любому из пп.20-23, где интервал между введением доз составляет 24 ч.
25. Способ по любому из пп.1-24, где указанный химерный полипептид FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 2 без сигнальной последовательности.
26. Способ по п.25, где химерный полипептид FVIII содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2 без сигнальной последовательности.
27. Способ по любому из пп.1-26, где химерный полипептид содержит часть FVIII и два Fc.
28. Способ по любому из пп.1-27, где химерный полипептид FVIII является гибридом мономер димер, содержащим единичную молекулу рекомбинантного FVIII человека с делетированным В-доменом, сшитую с димерным Fc-доменом из IgG1 человека, без вставочной линкерной последовательности.



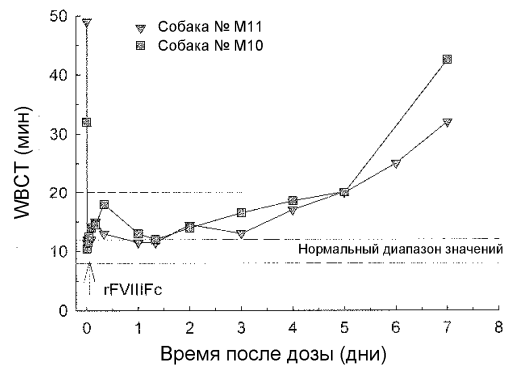
Фиг. 1



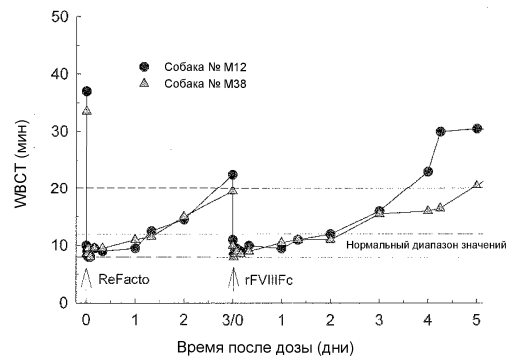
Фиг. 2



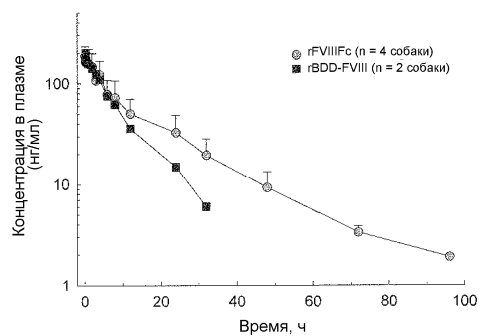
Фиг. 3



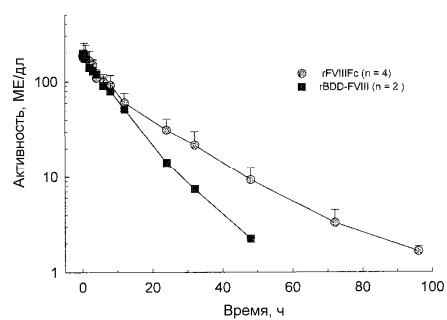
Фиг. 4А



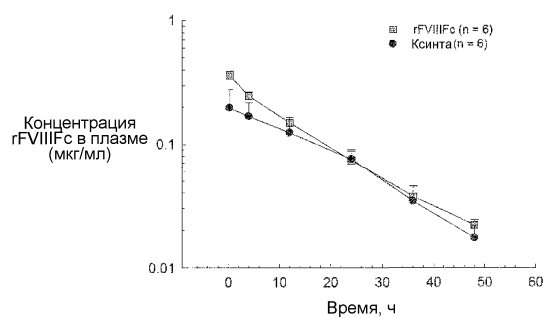
Фиг. 4В



Фиг. 5

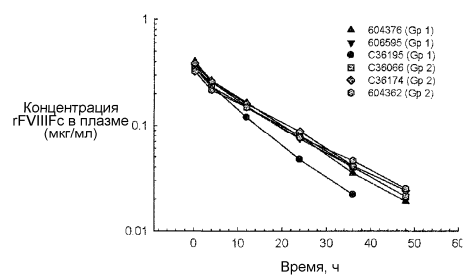


Фиг. 6

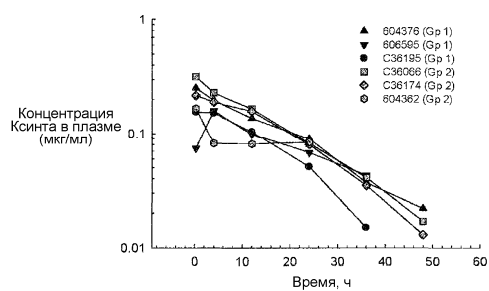


Фиг. 7

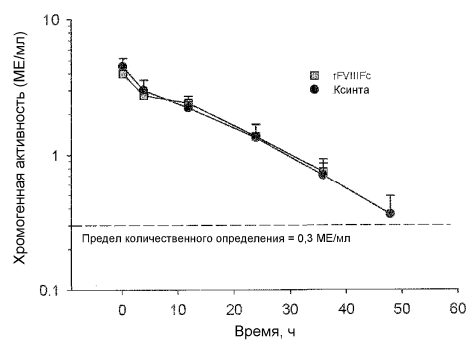
А.



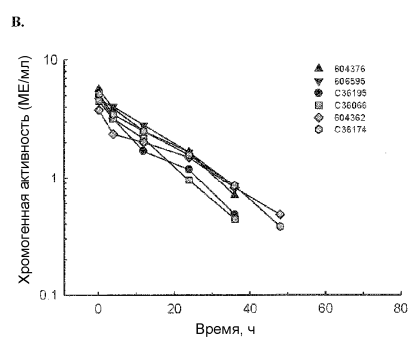
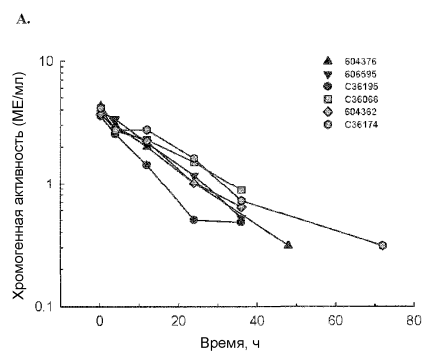
В.



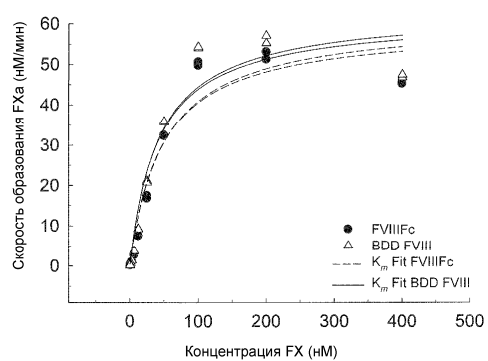
Фиг. 8



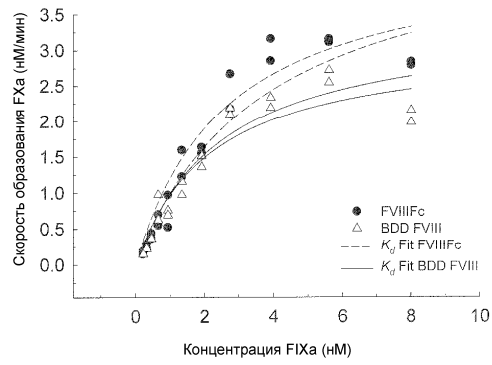
Фиг. 9



Фиг. 10

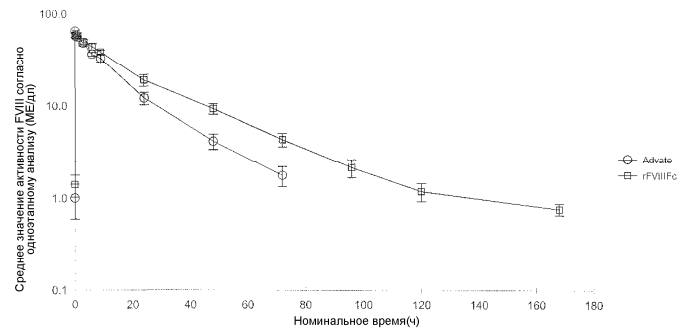


Фиг. 11



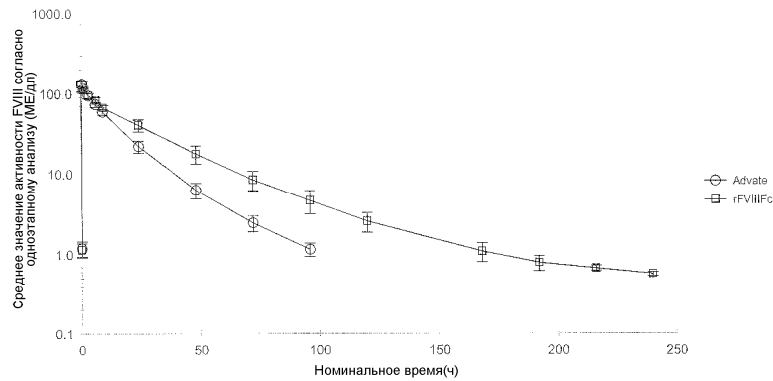
Фиг. 12

Уровень дозы=25



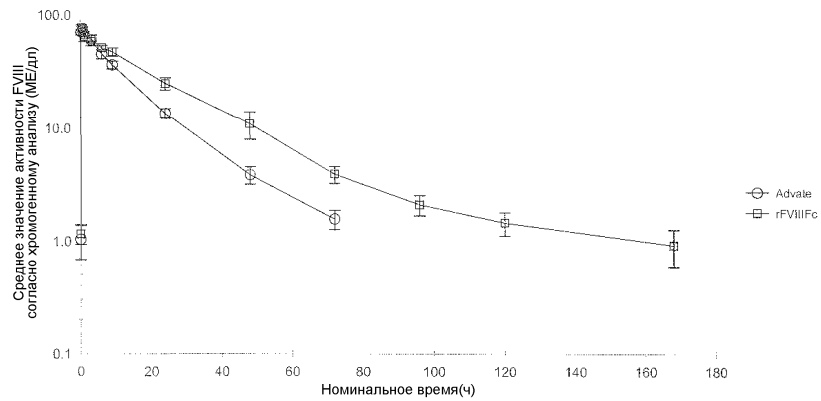
Фиг. 13A

Уровень дозы=65



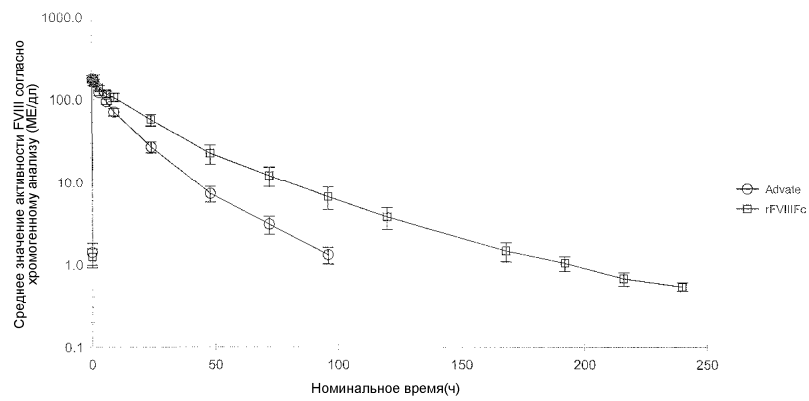
Фиг. 13B

Уровень дозы=25

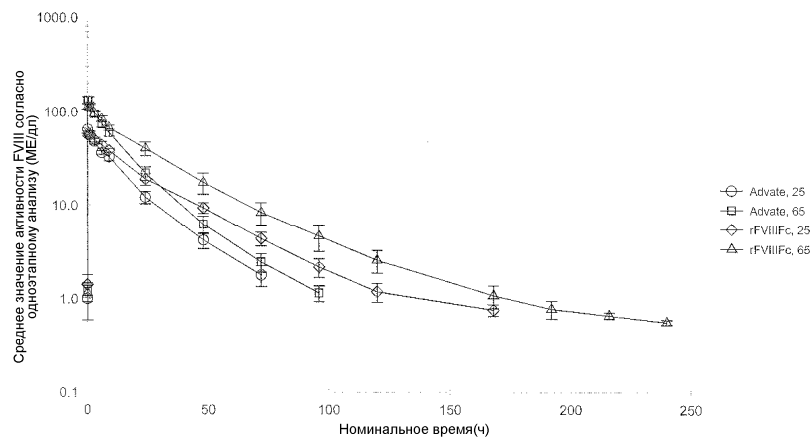


Фиг. 13C

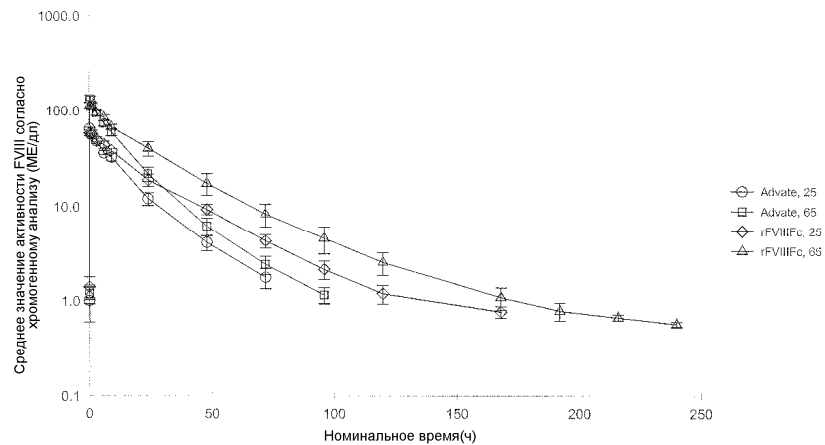
Уровень дозы=65



Фиг. 13D



Фиг. 14А



Фиг. 14В

