

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **038705**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.10.07**

**(21)** Номер заявки  
**201790221**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2013.01.12**

**(51)** Int. Cl. **C07K 19/00** (2006.01)  
**A61K 38/37** (2006.01)  
**A61K 47/68** (2017.01)  
**A61P 37/06** (2006.01)  
**A61P 7/00** (2006.01)

---

**(54) СПОСОБЫ СНИЖЕНИЯ ИММУНОГЕННОСТИ ФАКТОРА СВЁРТЫВАНИЯ КРОВИ VIII У ПАЦИЕНТОВ, ПОЛУЧАЮЩИХ ЛЕЧЕНИЕ ФАКТОРОМ VIII**

---

**(31)** 61/586,103; 61/668,961

**(32)** 2012.01.12; 2012.07.06

**(33)** US

**(43)** 2017.10.31

**(62)** 201491211; 2013.01.12

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**БИОВЕРАТИВ ТЕРАПЬЮТИКС  
ИНК.; ПАДЖЕТ САУНД БЛАД  
СЕНТР (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Цзян Хайянь, Лю Туняо,  
Кришнамурти Шрирам, Джозефсон  
Нейл, Пирс Гленн (US)**

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

**(56)** WO-A2-2011069164  
CASTAMAN Glancarlo et al. Pregnancy and delivery in women with von Willebrand's disease and different von Willebrand factor mutations. Haematologica, 2010; 95(6), p.963-969, реферат US-A1-20050260194

PAVLOVA A. et al. Impact of polymorphisms of the major histocompatibility complex class II, interleukin-10, tumor necrosis factor- $\alpha$  and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 genes on inhibitor development in severe hemophilia A. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2009, 7(12): 2006-2015, реферат

ROBERTS Sean A. et al. Engineering factor VIII for hemophilia gene therapy. J. Genet. Syndr. Gene Ther., 2011, S1:1-7, реферат

---

**(57)** В изобретении представлены способы введения полипептидов химерного и гибридного фактора VIII (FVIII), состоящих из частей FVIII и Fc, субъектам с риском развития ингибирующих иммунных реакций, включающих появление антител к FVIII и/или клеточно-опосредованный иммунитет. Введение таких полипептидов является достаточным для активации коагуляции и индуцирования иммунной толерантности к FVIII. Такой химерный полипептид может содержать полноразмерный FVIII или FVIII-полипептид, включающий делецию, например полную или частичную делецию В-домена.

---

**B1**

**038705**

**038705  
B1**

### Область техники

Изобретение в целом относится к области применения терапевтических средств при проблемах, связанных с остановкой кровотечения.

### Уровень техники

Гемофилия А - это нарушение свёртываемости крови, связанное с X-хромосомой, обусловленное мутациями и/или делециями в гене фактора VIII (FVIII), которые в результате приводят к недостаточной активности FVIII (Peuvandi F. и др. *Haemophilia* 12:82-89 (2006)). Заболевание характеризуется спонтанными случаями кровотечений и излишней кровоточивостью при травмах. С течением времени повторяющиеся случаи кровотечений в мышцах и суставах, которые часто происходят в раннем детстве, приводят к гемофильной артропатии и необратимым повреждениям суставов. Эти повреждения прогрессируют и могут привести к серьезному ограничению подвижности суставов, мышечной атрофии и хроническим болям (статья Rodriguez-Merchan E.C., *Semin. Thromb. Hemost.* 29:87-96 (2003), содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки).

Домен A2 является необходимым для проявления прокоагулирующей активности молекулы FVIII. Исследования показывают, что FVIII свиньи обладает в шесть раз большей активностью, чем FVIII человека (Lollar & Parker, *J. Biol. Chem.* 266:12481-12486 (1991)), и что различие коагулирующей активности между человеческим и свиным фактором FVIII, оказывается, основывается на различии в аминокислотной последовательности в одном или более остатках в доменах A2 фактора человека и свиньи (статья Lollar P. и др., *J. Biol. Chem.* 267:23652-23657 (1992), содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки).

Лечение гемофилии А для предотвращения спонтанных случаев кровотечений достигается путем заместительной терапии, направленной на восстановление активности FVIII от 1 до 5% его нормального уровня активности (статья Mannucci P.M. и др., *N. Engl. J. Med.* 344:1773-1779 (2001), содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки). Например.

Препараты FVIII человека, полученные из плазмы крови (pdFVIII), и рекомбинантные препараты FVIII (rFVIII) используются для лечения (лечение по требованию) и для предотвращения (профилактическое лечение) эпизодов кровотечений.

Препарат rFVIII был разработан для снижения риска передачи патогенов, находящихся в крови, после распространения контаминации препаратов плазмы ВИЧ и вирусами гепатитов и для безопасного и надлежащего снабжения пациентов препаратами FVIII. Однако защита от кровотечений существующими препаратами FVIII имеет временное ограничение из-за малого периода полувыведения ( $t_{1/2}$ ) примерно 8-12 ч, что требует проводить профилактическое введение препаратов три раза в неделю или через день большинству пациентов для того, чтобы поддержать содержание FVIII на уровне больше 1%. Этот уровень был установлен в качестве защищающего от большинства случаев спонтанных кровотечений. Manco-Johnson и др., *New Engl. J. Med.* 357(6):535-44 (2007). В результате многих исследований показано, что даже высокие дозы препаратов при лечении по требованию не являются эффективными при предупреждении артропатии Aledort L. и др., *J. Intern. Med.* 236:391-399 (1994); Petrini P. и др., *Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.* 13:280-287 (1991). Преимущества профилактического лечения были продемонстрированы в многочисленных клинических исследованиях. Статьи Aznar J. и др., *Haemophilia* 6(3):170-176 (2000), Feldman B. и др., *J. Thromb. Haemost.* 4:1228-1236 (2006), Kreuz W. и др., *Haemophilia* 4:413-417 (1998), Liesner R. и др., *B. J. Haem.* 92:973-978 (1996), Ljung R., *Haemophilia* 4(4):409-412 (1998), Löfqvist T. и др., *J. Intern. Med.* 241:395-400 (1997), Nilsson I. и др., *B. J. Int. Med.* 232:25-32 (1992), Risebrough N. и др., *Haemophilia* 14:743-752 (2008), Van Den Berg H. и др., *Haemophilia* 9 (Suppl. 1):27-31 (2003), Van Den Berg H. и др., *Haematologica* 89(6):645-650 (2004) и Manco-Johnson и др., см. выше, установлено, что дети, начинавшие первичную профилактику после их первого кровотечения в суставах, имели значительно меньшие кровоизлияния и меньше повреждений суставов, чем дети, лечившиеся по требованию.

По сравнению с лечением по требованию профилактическая терапия также снижает нарушения функционирования, частоту госпитализации и потери времени для посещения школы или работы: Aznar J. и др., *Haemophilia* 6(3):170-176 (2000), Molho P. и др., *Haemophilia* 6(1):23-32 (2000) и повышает качество жизни пациентов и их семей Coppola A. и др., *Blood Transfus.* 6(2):4-11 (2008). Однако профилактическая терапия часто требует использования у детей устройств для центрального венозного доступа, использование которых сопровождают риски развития инфекции, сепсиса и тромбозов. Кроме того, несмотря на преимущества, приемлемость и согласованность профилактики снижается с возрастом, особенно из-за неудобств и ее инвазивного характера. Geraghty S. и др., *Haemophilia* 12:75-81 (2006), Hacker M. и др., *Haemophilia* 7(4):392-396 (2001). Поэтому препарат rFVIII с пролонгированным  $t_{1/2}$  в плазме пациентов может потенциально обладать благоприятными свойствами Lillicrap D., *Current Opinion in Hematology* 17:393-397 (2010).

Благодаря разработке препаратов pdFVIII и rFVIII важными достижениями терапии стали снижение уровня смертности, предотвращение повреждений суставов и улучшенное качество жизни. Пролонгированная защита от кровотечений могла бы стать другим ключевым продвижением в терапии пациентов с гемофилией А. При этом в настоящее время не было разработано препаратов, которые позволяли обеспечить пролонгированную защиту от кровотечений. Следовательно, остаётся необходимость улучшения

способов лечения гемофилии из-за того, что недостаточность FVIII является более устойчивой, длится дольше и более действенной, чем существующие виды её терапии.

Кроме того, у 15-30% не лечившихся ранее пациентов после трансфузии препаратов FVIII возникают нейтрализующие FVIII антитела (ингибиторы). Рассматривались различные методики для избегания таких иммунных реакций. Эти методики включают применение протоколов приобретения толерантности с высокими дозами препаратов, использование пептидных ловушек, имитирующих антитела к FVIII, обход иммунного распознавания с помощью гибридных молекул FVIII человека/свиньи, нейтрализацию Т-клеток CD4, реактивных к FVIII, с помощью антиклонотипических антител, использование универсальных эпитопов CD4 и блокирование костимуляции иммуноглобулина CTLA-4-Ig или антител к CD40L. See, e.g., Lei и др., *Transfusion Medicine* 105: 4865-4870 (2005). Для того чтобы индуцировать развитие толерантности также исследовали представление FVIII иммунным клеткам. Например, исследователи Lei и др. обнаружили, что презентирование доменов FVIII на остове молекулы Ig В-клеткам предотвращали или снижали образование антител. Там же. В дополнение к этому, исследователи Qadurga и др. нашли, что толерогенное презентирование FVIII с использованием незрелых дендритных клеток способно снижать иммуногенность. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 6: 2095-2104 (2008). Однако такие методы являются дорогостоящими, сложными (например, требуют совместного введения других лекарственных средств в комбинации с FVIII или введения цельноклеточных препаратов вместо сравнительно простых белков), что, вероятно, приводит к проявлению нежелательных побочных реакций и/или являются неэффективными. Следовательно, остаётся необходимость в получении простых способов лечения гемофилии из-за того, что недостаточность FVIII проявляется у пациентов, у которых развиваются реакции ингибирования препаратов.

#### Краткое описание

В изобретении предлагаются способы введения препаратов фактора VIII (FVIII), которые повышают его иммунную переносимость (толерантность). Эти способы включают введение химерного полипептида, содержащего FVIII-часть и Fc-часть (rFVIII-Fc), субъекту с риском развития ингибирующего FVIII иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъекта может развиваться ингибирующий иммунный ответ, если вводится эквивалентная доза полипептида, содержащего FVIII-часть. В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъекта может развиваться ингибирующий иммунный ответ или ингибирующий FVIII иммунный ответ. Введение химерного полипептида, содержащего FVIII-часть и часть Fc, может быть достаточным для лечения состояний кровотечения и для индуцирования иммунной толерантности к FVIII. Такое введение может быть профилактическим. В некоторых вариантах осуществления изобретения такое введение снижает случаи спонтанных кровотечений или предотвращает кровотечения.

Иммунный ответ может включать ингибирующие антитела к FVIII. Титр антител составляет по меньшей мере 0,6 единиц Бетесда (БЕ), по меньшей мере 1,0 БЕ, или по меньшей мере, 5,0 БЕ. Иммунный ответ может также включать клеточно-опосредованный иммунный ответ, например высвобождение цитокинов. Цитокинами могут быть, например, IL-12, IL-4 или TNF- $\alpha$ . Иммунный ответ может также приводить к появлению клинических симптомов, таких как увеличение тенденции кровотечений, высокий уровень использования FVIII, недостаточный ответ на терапию с помощью FVIII, снижение эффективности терапии с помощью FVIII и/или сокращение периода полувыведения FVIII.

Пациенты с риском развития ингибирующего иммунного ответа включают тех, которые несут мутацию, делецию или перестройку в гене FVIII. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъекты не синтезируют белок FVIII. В некоторых вариантах осуществления изобретения пациенты страдают серьёзной формой гемофилии. В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъекта есть родственник (например, родитель, двоюродный родственник, тётя, дядя, прауродитель, ребёнок или внук) у которых развился ингибирующий иммунный ответ к FVIII или другому терапевтическому протеину. В некоторых вариантах осуществления изобретения пациент одновременно или ранее получал терапию, которая повышает иммунную функцию при введении FVIII. В некоторых вариантах осуществления изобретения пациент получает лечение с помощью интерферонов или противовирусную терапию в сочетании с FVIII. В некоторых вариантах осуществления изобретения пациент с риском развития ингибирования со стороны иммунной системы обладал генетическим полиморфизмом, связанным с повышенным уровнем цитокинов, таких как TNF- $\alpha$  или IL10. В некоторых вариантах пациент с риском развития ингибирования со стороны иммунной системы обладал полиморфизмом TNF- $\alpha$ -308G>A или микросателлитным IL10G аллели 134. В некоторых вариантах осуществления изобретения пациент с риском развития ингибирующего иммунного ответа к FVIII ранее не получал препараты FVIII. В некоторых вариантах пациент с риском развития ингибирующего иммунного ответа к FVIII принимал препараты FVIII. В некоторых вариантах пациенты с риском развития ингибирующего иммунного ответа к FVIII принимали препараты FVIII менее 150, менее 50 или менее 20 дней лечения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента с риском развития ингибирующего иммунного ответа к FVIII ранее не проявлялся иммунный ответ к FVIII или другому терапевтическому протеину. В некоторых вариантах у субъекта с риском развития ингибирующего FVIII иммунного ответа

ранее возник иммунный ответ к FVIII (pdFVIII или rFVIII) или другому терапевтическому протеину. В некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента с риском развития ингибирующего FVIII иммунного ответа ранее возник иммунный ответ к препаратам FVIII, таким как ADVATE®, RECOMBINATE®, KOGENATE FS®, HELIXATE FS®, XYNTHA®/REFACTO AB®, HEMOFIL-M®, MONARC-M®, MONOCLATE-P®, HUMATE-P®, ALPHANATE®, KOATE-DVI® или HYATE:C®. В некоторых вариантах осуществления изобретения препараты FVIII являются полноразмерным белком FVIII, зрелым белком FVIII или FVIII с удалённым В-доменом.

Способы введения FVIII, представленные в этой заявке, могут индуцировать иммунную устойчивость. В некоторых вариантах осуществления изобретения такое введение снижает у пациента количество антител к FVIII, титр антител к FVIII и/или содержание цитокина (например, IL-12, IL-4 или TNF) по сравнению с этим количеством, титром или содержанием до введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения такое введение снижает у пациента количество антител к FVIII, титр антител к FVIII и/или содержание цитокина (например, IL-12, IL-4 или TNF) по сравнению с количеством, титром или содержанием, которые получены в результате предыдущего лечения с помощью полипептида, содержащего полипептид FVIII. В некоторых вариантах осуществления изобретения такое введение снижает у пациента количество антител к FVIII, титр антител к FVIII и/или содержание цитокина (например, IL-12, IL-4 или TNF) по сравнению с количеством, титром или содержанием, которые могли бы быть получены введением субъекту полипептида, содержащего полипептид FVIII.

Эти способы включают введение химерного полипептида, содержащего FVIII-часть и Fc-часть. Часть FVIII может быть FVIII человека, полноразмерным белком FVIII или FVIII, содержащим полноразмерный или частично удалённый В-домен. FVIII-часть может быть биологически активным полипептидом, например полипептидом FVIII, обладающим коагулирующей активностью. Часть FVIII может быть по меньшей мере на 90% идентична, 95% идентична или полностью идентична аминокислотной последовательности FVIII, показанной в табл. 2, без сигнальной последовательности (аминокислоты 20-1457 SEQ ID № 2; аминокислоты 20-2351 SEQ ID № 6). Часть FVIII может быть по меньшей мере на 90% идентична, 95% идентична или полностью идентична аминокислотной последовательности FVIII, показанной в табл. 2, с сигнальной последовательностью (аминокислоты 1-1457 SEQ ID № 2; аминокислоты 1-2351 SEQ ID № 6). Часть молекулы Fc может быть идентична аминокислотной последовательности Fc, показанной в табл. 2 (аминокислоты 1458-1684 SEQ ID № 2 или аминокислоты 2352-2578 SEQ ID № 6).

Химерный полипептид может быть в форме гибридной молекулы, включающей второй полипептид в сочетании с химерным полипептидом. Второй полипептид может быть преобладающим или содержать Fc-часть.

В некоторых вариантах осуществления изобретения эти способы включают введение химерного полипептида в особой дозировке. Дозировка, например, может составлять 10-100 МЕ/кг, составлять дозу 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90 или 90-100 МЕ/кг или составлять дозу 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 МЕ/кг.

В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный полипептид вводится пациенту в состоянии кровотечения. Состояния кровотечения могут быть представлены, например, кровотечением вследствие нарушения коагуляции, гемартрозом, кровотечением в мышечной ткани, кровотечением в ротовой полости, кровоизлиянием, кровоизлиянием в мышечной ткани, кровоизлиянием в ротовой полости, последствием травмы, травмой головы, гастроинтестинальным кровотечением, внутричерепным кровоизлиянием, внутрибрюшным кровоизлиянием, внутригрудным кровоизлиянием, переломом костей, кровотечением в пределах центральной нервной системы, кровотечением в заглоточной области, кровотечением в забрюшинной области или кровотечением в области окружения мышц илюиопсоас. В некоторых вариантах нарушением коагуляции при кровотечении является гемофилия А.

Настоящее изобретение также предлагает способ введения фактора свёртывания крови для субъекта с риском развития ингибирующего иммунного ответа на фактор свёртывания крови, включающий введение пациенту химерного полипептида, содержащего часть фактора свёртывания крови и часть Fc. Также предлагается способ индуцирования иммунной толерантности к фактору свёртывания крови у субъекта, когда субъектом является плод, этот способ включает введение матери, несущей плод, полипептид, включающий химерный полипептид, содержащий часть фактора свёртывания крови и Fc-части. В некоторых вариантах осуществления изобретения фактор свёртывания крови является проферментом FVII, активированным FVII, способным к активации FVII или фактором FIX.

В некоторых вариантах осуществления изобретения введение пациенту химерного полипептида снижает случаи спонтанных кровотечений или предотвращает кровотечения.

Настоящее изобретение также предлагает способ индуцирования иммунной толерантности к FVIII у пациента, нуждающегося в этом факторе, включающий введение пациенту химерного полипептида, содержащего часть FVIII и часть Fc. В некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента может развиваться ингибирующий иммунный ответ к FVIII. В некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента развился ингибирующий иммунный ответ к FVIII.

Настоящее изобретение также предлагает способ предотвращения или ингибирования развития

синтеза ингибитора FVIII, указанный метод включает введение пациенту, нуждающемуся в иммунной толерантности к химерному полипептиду, содержащему FVIII-часть и Fc-часть.

Настоящее изобретение также предлагает способ индуцирования иммунной толерантности к фактору свёртывания крови у пациента, нуждающегося в этом факторе, включающий введение пациенту химерного полипептида, содержащего часть фактора свёртывания крови и часть Fc. В некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента может существовать риск развития ингибирующего фактора свёртывания крови иммунный ответ. В других вариантах у субъекта развился ингибирующий фактор свёртывания крови иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления изобретения часть фактора свёртывания крови включает фактор VII, IX или фактор фон Виллебранда. Настоящее изобретение также предлагает способ предотвращения или ингибирования возникновения ингибитора к фактору свёртывания, указанный метод включает введение пациенту, нуждающемуся в иммунной толерантности к химерному полипептиду, содержащему часть фактора свёртывания крови и Fc-часть. В некоторых вариантах осуществления изобретения часть фактора свёртывания крови является фактором VII, IX или фактором фон Виллебранда.

В некоторых вариантах субъект лечения является человеком, и способ введения FVIII является способом лечения состояний кровотечения у упомянутого субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения состояние кровотечения обусловлено нарушением коагуляции крови. В некоторых вариантах нарушением коагуляции является гемофилия или заболевание фон Виллебранда. В некоторых вариантах нарушением коагуляции является гемофилия А. В некоторых вариантах у пациента существует патологическое состояние, требующее профилактического лечения или лечения по требованию, такое как эпизод кровотечения. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект лечения является пациентом, страдающим нарушением свёртываемости крови или ожидаемо нуждается в таком лечении.

Настоящее изобретение также предлагает набор, включающий: (а) фармацевтическую композицию, включающую химерный полипептид, содержащий часть фактора свёртывания крови и часть Fc или часть молекулы связывания с FcRn и фармацевтически приемлемого носителя, и (b) инструкцию по введению этой композиции пациенту, нуждающемуся в иммунной толерантности к фактору свёртывания крови. В некоторых вариантах осуществления изобретения этот химерный полипептид включает FVIII-часть, FVII-часть или FIX-часть. В некоторых вариантах этот химерный полипептид является мономер-димерным гибридным фактором FVIII, мономер-димерным гибридным фактором FVII или мономер-димерным гибридным фактором FIX. В некоторых вариантах эти инструкции дополнительно включают по меньшей мере одну стадию определения того, что пациент нуждается в приобретении иммунной толерантности к фактору свёртывания крови. В некоторых вариантах осуществления изобретения стадия определения того, что пациенты нуждаются в приобретении иммунной толерантности, включает одно или более определений из множества: (а) идентификация субъектов, несущих мутацию или делецию в гене фактора свёртывания крови; (b) идентификация субъектов, несущих перестройку гена фактора свёртывания крови; (c) идентификация субъектов, имеющих родственника, у которого ранее развился ингибирующий иммунный ответ к фактору свёртывания крови; (d) идентификация субъектов, получающих терапию препаратами интерферонов; (e) идентификация субъектов, получающих терапию противовирусными препаратами; (f) идентификация субъектов, несущих генетическую мутацию гена, отличного от гена, кодирующего фактор свёртывания крови, который связан с повышенным риском развития ингибирующего иммунного ответа; и (g) комбинация двух или больше этих вариантов. В некоторых вариантах указанная генетическая мутация гена, отличного от гена, кодирующего фактор свёртывания крови, включает одну или более мутаций, выбранных из множества: (а) генетический полиморфизм, связанный с повышением уровня TNF- $\alpha$ ; (b) генетический полиморфизм, связанный с повышением уровня IL10; (c) генетический полиморфизм, связанный с понижением уровня CTLA-4; (d) мутация молекул DR15 или DQB0602 главного комплекса гистосовместимости (MHC) II класса; и (e) включает комбинацию двух или больше этих вариантов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения методы лечения, представленные в настоящем изобретении, дополнительно включают измерения уровня ингибирующего иммунного ответа после их введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения методы лечения, представленные в настоящем изобретении, дополнительно включают сравнение уровня ингибирующего иммунного ответа после их введения с уровнем ингибирующего иммунного ответа перед их введением. В некоторых вариантах при ингибирующем иммунном ответе развиваются антитела к FVIII. В некоторых вариантах при ингибирующем иммунном ответе происходит секреция цитокинов.

#### **Краткое описание фигур**

Фиг. 1 иллюстрирует схематическое представление мономера молекулы gFVIII<sub>Fc</sub>;

фиг. 2А и 2В - результаты анализа gFVIII<sub>Fc</sub> в нередуцирующих и редуцирующих условиях методом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) (обработанный препарат или одноцепочечная молекула). Фиг. 2С иллюстрирует структуру молекулы gFVIII<sub>Fc</sub>, проанализированную методами ЖХ/УФ (LC/UV) и ЖХ/МС (LC/MS);

фиг. 3А, 3В и 3С - результаты биохимического анализа молекулы gFVIII-Fc. Фиг. 3А иллюстрирует активацию фактора X (FX) в виде функции концентрации фосфолипидных везикул. Фиг. 3В иллюстри-

рует активацию FX в виде функции концентрации FX. Фиг. 3С иллюстрирует активацию FX в виде функции концентрации активированного фактора FIX (FIXa);

фиг. 4 - активизацию FX с последующим расщеплением активированной протеиназой С;

фиг. 5А, 5В, 5С и 5D - наблюдаемую групповую среднюю активность FVIII ( $\pm$ CO) по отношению к профилям распределения во времени. Профили разделены по уровню дозировки, сгруппированы по разным соединениям по отношению ко времени. Фиг. 5А отражает результаты одностадийного анализа с применением дозы 25 МЕ/кг. Фиг. 5В - результаты одностадийного анализа с применением дозы 65 МЕ/кг. Фиг. 5С отражает результаты хромогенного анализа с применением дозы 25 МЕ/кг. Фиг. 5D отражает результаты хромогенного анализа с применением дозы 65 МЕ/кг;

фиг. 6А и 6В - наблюдаемую групповую среднюю активность FVIII ( $\pm$ CO) по отношению к профилям распределения во времени, сгруппированным по разным уровням дозировки и соединениям по отношению к времени. Фиг. 6А отражает результаты одностадийного анализа. Фиг. 6В отражает результаты хромогенного анализа;

фиг. 7А, 7В и 7С отображают эффективность одноцепочечной молекулы FVIII<sub>Fc</sub> (SC rFVIII<sub>Fc</sub>) *in vivo* в отношении гемофилии А (HemA) на модели рассечения хвостовой вены мышей. Фиг. 7А иллюстрирует взаимосвязь между дозировкой FVIII и эффектом защиты препарата. Дозы препарата одноцепочечного фактора rFVIII<sub>Fc</sub> показаны в виде квадратов, а действующие дозы rFVIII<sub>Fc</sub> - в виде кругов. Фиг. 7В демонстрирует процент выживания после рассечения хвостовой вены после введения 4,6 мкг/кг, 1,38 и 0,46 мкг/кг препаратов rFVIII<sub>Fc</sub> или SC rFVIII<sub>Fc</sub>. Фиг. 7С иллюстрирует процент остановки кровотечений после рассечения хвостовой вены после введения 4,6 мкг/кг (чёрный круг или перевёрнутый треугольник), 1,38 мкг/кг (треугольник или ромб) и 0,46 мкг/кг (квадрат и серый круг) препаратов rFVIII<sub>Fc</sub> или SC rFVIII<sub>Fc</sub>;

фиг. 8 изображает схему исследования клинического изучения фаз 1/2а, которые были построены в виде непрерывного исследования с возрастающей дозой, для оценки безопасности и фармакокинетики (PK) распределения препарата rFVIII<sub>Fc</sub> по сравнению с препаратом ADVATE® после однократного внутривенного введения дозы 25 МЕ/кг (низкая доза, группа А) или 65 МЕ/кг (высокая доза, группа В);

фиг. 9 иллюстрирует корреляцию активности rFVIII при определении одностадийным (aPTT) или хромогенным анализами. Результаты измерения активности FVIII (МЕ/мл) после введения препаратов ADVATE® (♦) и rFVIII<sub>Fc</sub> (□);

фиг. 10А и 10В иллюстрируют фармакологические профили средних групповых значения активности FVIII в плазме исследуемых групп, получавших низкие и высокие дозы препарата. Значения активности FVIII в плазме (одностадийный анализ aPTT) относительно временного графика после однократной внутривенной инъекции препаратов rFVIII<sub>Fc</sub> или ADVATE® показаны для 25 МЕ/кг (группа, получавшая низкую дозу, n=6) (фиг. 10А); и 65 МЕ/кг (группа, получавшая высокую дозу, n=10 [ADVATE®]; n=9 [rFVIII<sub>Fc</sub>]) (фиг. 10В). Результаты представлены в виде среднего значения в группе  $\pm$  стандартная ошибка среднего значения (SEM);

фиг. 11А и 11В показывают влияние уровня антигенов VWF на клиренс (Cl) и период полувыведения ( $t_{1/2}$ ) активности FVIII после введения ADVATE® или rFVIII<sub>Fc</sub>. Показано корреляцию между концентрациями антигенов VWF и скорректированному к массе Cl препаратов ADVATE® ( $R^2=0,5415$  и  $p=0,0012$ ) и rFVIII<sub>Fc</sub> ( $R^2=0,5492$  и  $p=0,0016$ ) (фиг. 11А); и  $t_{1/2}$  препаратов ADVATE® ( $R^2=0,7923$  и  $p<0,0001$ ) и rFVIII<sub>Fc</sub> ( $R^2=0,6403$  и  $p=0,0003$ ) (фиг. 11В). Каждой точкой представлен результат одного исследуемого субъекта;

фиг. 12А и 12В - результаты инструментального определения тромбоэластометрии цельной крови *ex vivo* прибором ROTEM® у исследуемых субъектов после введения препаратов ADVATE® или rFVIII<sub>Fc</sub>. Образцы крови отбирались у пациентов до и после лечения с помощью препаратов ADVATE® и rFVIII<sub>Fc</sub> в дозе 25 МЕ/кг (фиг. 12А) и 65 МЕ/кг (фиг. 12В) в определённые моменты времени. Время свёртывания крови определяли методом NATEM при иницировании свёртывания  $Ca^{++}$  и на приборе ROTEM®. Результаты представлены по данным трёхкратного считывания каждого образца пациента в виде среднего значения в группе  $\pm$  стандартная ошибка среднего значения (SEM);

на фиг. 13А и 13В сравниваются активности rFVIII<sub>Fc</sub> и SC rFVIII<sub>Fc</sub> по анализу образования тромбина (TGA). Фиг. 13А сравнивает потенциал эндогенного тромбина (ETP) для препаратов rFVIII<sub>Fc</sub>, SC rFVIII<sub>Fc</sub>, полностью процессированного rFVIII<sub>Fc</sub> и стандартного образца FVIII ВОЗ. Фиг. 13В сравнивает пиковый уровень для препаратов rFVIII<sub>Fc</sub>, SC rFVIII<sub>Fc</sub>, полностью процессированного rFVIII<sub>Fc</sub> и стандартного образца FVIII ВОЗ;

на фиг. 14 показано схематическое представление мономера rFVIII<sub>Fc</sub>. rFVIII<sub>Fc</sub> является рекомбинантным белком слияния FVIII человека с удалённым В-доменом с частью Fc IgG1 человека без промежуточной линкерной последовательности;

фиг. 15А, 15В, 15С и 15D показывают фармакокинетические (PK) профили, сравнивающие распределение rFVIII<sub>Fc</sub> и rFVIII у мышей с HemA (фиг. 15А), мышей линии C57BL/6 (фиг. 15В), мышей FcRn KO (фиг. 15С) и трансгенных мышей Tg32В с человеческими рецепторами FcRn (фиг. 15D) после инъекции в хвостовую вену доз 125 МЕ/кг. Результаты показаны как среднее  $\pm$  стандартное отклонение (CO),

полученные на 4 мышках на схему лечения в каждый момент времени. Оценка параметра РК представлена в табл. 12;

на фиг. 16 сравнивается активность для острого случая кровотечения rFVIII<sub>Fc</sub> и rFVIII на модели мышей с HemA по кровотечению хвостов после надреза. Самцам мышей с HemA делали инъекцию в хвостовую вену с 24, 72 или 216 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub> и rFVIII с последующим надрезанием хвостов на 10 мм через 5 мин после получения дозы препаратов. Результаты представлены как индивидуальные или медианные потери крови через 30 мин после надрезания хвоста у 20 мышей каждой группы лечения.  $P < 0,05$  для плацебо по сравнению с другими способами лечения и  $P > 0,05$  для мышей линии C57Bl/6 по сравнению с мышками с HemA, которые получали 72 или 216 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub> или 216 МЕ/кг rFVIII;

фиг. 17А и 17В показывают профилактическую эффективность rFVIII<sub>Fc</sub> по отношению к rFVIII в модели определения кровотечения по рассечению хвостовой вены (РХВ). Самцам мышей с HemA наносили повреждение способом РХВ через 24 ч после введения плацебо, rFVIII или rFVIII<sub>Fc</sub>, или через 48 ч после введения rFVIII<sub>Fc</sub>. Фиг. 17А иллюстрирует степень выживания после РХВ.  $P < 0,001$  для логранговых критериев кривых выживаемости животных, получивших 12 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub> по сравнению с rFVIII за 24 ч до РХВ. Фиг. 17В иллюстрирует случаи повторного кровотечения в течение 24 ч после РХВ.  $P < 0,002$  для логранговых критериев кривых отсутствия повторного кровотечения у животных, получивших 12 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub> по сравнению с rFVIII за 24 ч до РХВ;

фиг. 18А и 18В - время свёртывания цельной крови (WBCT) у собак с гемофилией А, получивших лечение препаратами rFVIII<sub>Fc</sub> и rFVIII. Нормальный диапазон WBCT для собак показан линиями с длинными штрихами. Область выше линий с короткими штрихами (20 мин) указывает на точку, в которой активность FVIII в плазме ожидается ниже 1% от нормальной. Фиг. 18А иллюстрирует WBCT после введения rFVIII<sub>Fc</sub>. Фиг. 18В иллюстрирует WBCT после введения rFVIII с последующим введением rFVIII<sub>Fc</sub> в перекрёстном исследовании;

фиг. 19А и 19В представляют данные фармакокинетики (РК) в сравнении препарата rFVIII<sub>Fc</sub> с rFVIII после их в/в введения у собак, страдающих гемофилией А. Фиг. 19А демонстрирует концентрацию антигена в плазме, измеренной методом ИФА (ELISA). Фиг. 19В иллюстрирует активность FVIII в плазме, измеренную хромогенным анализом.  $N=4$  для rFVIII<sub>Fc</sub> и  $N=2$  для rFVIII;

фиг. 20 иллюстрирует схему исследования для оценки иммуногенности FVIII у мышей с HemA. Внутривенное (в/в) введение дозы rFVIII<sub>Fc</sub>; химерного белка FVIII человека - Fc мыши; УВД (с удалённым В-доменом)-FVIII (XYNTHA®); полноразмерного белка rFVIII (ADVATE®); и контрольного плацебо проводили на 0, 7, 14, 21 и 35 день. Образцы крови отбирали на 14, 21, 28, 35 и 42 день;

фиг. 21А, 21В и 21С - общее количество антител к FVIII в экспериментах по определению иммуногенности, проведённых на мышках с HemA согласно схеме исследования, показанной на фиг. 20. Фиг. 21А относится к результатам измерений общего количества антител к FVIII после повторного в/в введения доз 50 МЕ/кг FVIII<sub>Fc</sub>; химерного белка FVIII человека - Fc мыши; УВД-FVIII (XYNTHA®); или полноразмерного белка rFVIII (ADVATE®). Фиг. 21В относится к результатам измерений общего количества антител к FVIII после повторного в/в введения доз 100 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub>; химерного белка FVIII человека - Fc мыши; УВД-FVIII (XYNTHA®); или полноразмерного белка rFVIII (ADVATE®). Фиг. 21С относится к результатам измерений общего количества антител к FVIII после повторного в/в введения доз 250 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub>; химерного белка FVIII человека - Fc мыши; УВД-FVIII (XYNTHA®); или полноразмерного белка rFVIII (ADVATE®);

фиг. 22А, 22В, 22С и 22Д показывают результаты измерений общего количества антител к FVIII в разное время после введения доз 50, 100 и 250 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub>; химерного белка FVIII человека - Fc мыши; УВД-FVIII (XYNTHA®); или полноразмерного белка rFVIII (ADVATE®). Фиг. 22А иллюстрирует данные, относящиеся к отобраным на 14 день образцам. Фиг. 22В иллюстрирует данные, относящиеся к отобраным на 21 день образцам. Фиг. 22С иллюстрирует данные, относящиеся к отобраным на 28 день образцам. Фиг. 22Д иллюстрирует данные, относящиеся к отобраным на 42 день образцам;

фиг. 23 демонстрирует корреляцию между общим содержанием антител и содержанием антител, нейтрализующих FVIII;

фиг. 24 иллюстрирует увеличение количества антител к hFc после лечения rFVIII<sub>Fc</sub> в дозах 50 и 250 МЕ/кг (rFVIII с Fc человека);

фиг. 25 является диаграммой, показывающей экспериментальные методики изоляции и анализа спленоцитов мышей с HemA в исследовании, в котором измеряли ответ лимфоцитов селезёнки под действием rFVIII<sub>Fc</sub> по сравнению с коммерчески доступным препаратом FVIII;

фиг. 26 - диаграммой, изображающей методику внутриклеточного окрашивания цитокинов с помощью метода сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS). В методике использовано 5 красителей, один - для маркера CD4 лимфоцитов и четыре других - для цитокинов IL2, IL-4, IL-10 и TNF- $\alpha$ ;

фиг. 27А и 27В представляет точечный график анализа FACS. Фиг. 27А относится к внутриклеточному окрашиванию цитокинов при изотипическом контроле;

фиг. 27 относится к внутриклеточному окрашиванию цитокинов дважды положительных клеток,



с частью Fc человека (hFc) или мыши (mFc), XYNTHA® (Хун) и ADVATE® (Адв). Лечение препаратами FVIII осуществляли путем введения в дозах 50 и 250 МЕ/кг;

фиг. 37 является диаграммой, демонстрирующей представленную в примере 13 схему исследования иммуногенности. Препараты FVIII (rFVIII-Fc, XYNTHA®, ADVATE®) и контрольное плацебо вводили мышам с NemA на 0, 7, 14, 21, 35 и 53 день. Кровь отбирали на 0, 14, 21, 28 и 42 день. Селезёнку мышей извлекали на 56 день. Лечение препаратами FVIII осуществляли путем введения в дозах 50, 100 и 250 МЕ/кг;

фиг. 38 иллюстрирует методологию, использованную для анализа ответов спленоцитов и Т-клеток мышей, представленную в примере 13;

фиг. 39 демонстрирует общие уровни антител к FVIII в образцах крови, отобранных на 42 день. Лечение препаратами rFVIII-Fc, с удалённым В-доменом (УВД)-rFVIII (XYNTHA®) и полноразмерным пр-rFVIII (ADVATE®) осуществляли путем введения в дозах 50, 100 и 250 МЕ/кг;

фиг. 40А, 40В и 40С показывают результаты внутриклеточного окрашивания цитокинов CD4+ Т-клеток селезёнки мышей с NemA, которых лечили разными дозами препаратов FVIII (rFVIII-Fc, УВД-rFVIII (XYNTHA®) или пр-rFVIII (ADVATE®)). Каждая фигура иллюстрирует результаты для IL-2 (слева) и TNF-α (справа). Фиг. 40А относится к исследованию мышей с NemA (N=4), которым вводили дозы FVIII 50 МЕ/кг. Фиг. 40В относится к исследованию мышей с NemA (N=10), которым вводили дозы FVIII 100 МЕ/кг. Фиг. 40С относится к исследованию мышей с NemA (N=4), которым вводили дозы FVIII 250 МЕ/кг;

фиг. 41 демонстрирует результаты внутриклеточного окрашивания цитокинов у CD4/CD25/Foxp3 трижды положительных клеток селезёнки, изолированных у мышей с NemA, которых лечили дозами по 100 МЕ/кг препаратов rFVIII-Fc, УВД-rFVIII (XYNTHA®) или пр-rFVIII (ADVATE®);

фиг. 42А-Н иллюстрирует результаты ПЦР в режиме реального времени для цитокинов, связанных с развитием иммунной толерантности, у получавших лечение дозами 100 МЕ/кг мышей с NemA. Фиг. 42А приводит результаты определения TGF-β, фиг. 42В приводит результаты определения интерлейкина-10, фиг. 42С приводит результаты определения субъединицы IL-12a интерлейкина IL-35, и фиг. 42D приводит результаты определения субъединицы EB1-3 интерлейкина IL-35. Фиг. 42Е приводит результаты определения Foxp3. Фиг. 42F приводит результаты определения IL2ra/CD25. Фиг. 42G приводит результаты определения CTLA4. Фиг. 42Н приводит результаты определения IDO-1;

фиг. 43 - результаты анализа клеток с помощью FACS, которые вовлечены в механизм передачи сигналов PD-L1-PD-1 у мышей, получавших лечение 100 МЕ/кг. У спленоцитов окрашивали поверхностные рецепторы CD11c и PD-L1 (фиг. 43А) или CD4 и PD-1 (фиг. 43В). Столбцы представляют процент превышения аналитического сигнала по сравнению с плацебо (\*p<0,05 против плацебо; +p<0,05 между введениями препаратов; критерий Стьюдента (Т-тест));

фиг. 44 является диаграммой, показывающей схему сравнительного исследования иммуногенности препаратов rFVIII-Fc, XYNTHA® и ADVATE® у мышей с NemA. Препараты FVIII вводили мышам с NemA на 0, 7, 14, 21 и 35-й день. Кровь отбирали на 0, 14, 21, 28 и 42-й день. Лечение препаратами FVIII осуществляли путем введения в дозах 50, 100 и 250 МЕ/кг;

фиг. 45 отображает результаты измерений количества антител к FVIII на 14, 21, 28 и 42-й день после введения доз 50 МЕ/кг препаратов rFVIII-Fc, химерного белка FVIII человека - Fc мыши, УВД-FVIII (XYNTHA®) или полноразмерного белка rFVIII (ADVATE®), а также количества ингибирующих антител на 42-й день;

фиг. 46 - результаты измерений количества антител к FVIII на 14, 21, 28 и 42-й день после введения дозы 100 МЕ/кг препаратов rFVIII-Fc, химерного белка FVIII человека - Fc мыши, УВД-FVIII (XYNTHA®) или полноразмерного белка rFVIII (ADVATE®), а также количества ингибирующих антител на 42-й день;

фиг. 47 - результаты измерений количества антител к FVIII на 14, 21, 28 и 42-й день после введения дозы 250 МЕ/кг препаратов rFVIII-Fc, химерного белка FVIII человека - Fc мыши, УВД-FVIII (XYNTHA®) или полноразмерного белка rFVIII (ADVATE®), а также количества ингибирующих антител на 42-й день;

фиг. 48 иллюстрирует корреляцию между титрами нейтрализующих FVIII антител и общим содержанием связывающих антител после введения препаратов rFVIII и rFVIII-Fc;

фиг. 49 является диаграммой, показывающей компонент профиля ответа Т-клеток при сравнительном изучении иммуногенности препаратов rFVIII-Fc, XYNTHA® и ADVATE® у мышей с NemA, приведённом на фиг. 44. Дополнительные дозы FVIII вводили мышам с NemA на 53 день, а селезёнки изымали на 56 день;

фиг. 50 (справа) демонстрирует результаты внутриклеточного окрашивания цитокинов CD4/CD25/Foxp3 трижды положительных клеток селезёнки, изолированных у мышей с NemA, которых лечили дозами по 100 МЕ/кг препаратов rFVIII-Fc, УВД-rFVIII (XYNTHA®) или пр-rFVIII (ADVATE®). Фиг. 50 (слева) является диаграммой, показывающей механизм действия регуляторных Т-клеток;

фиг. 51 является диаграммой, демонстрирующей схему исследования развития иммунной толерант-

ности к rFVIII<sub>Fc</sub>. Дозы препаратов rFVIII<sub>Fc</sub> 50 МЕ/кг вводили в/в мышам с HemA на 0, 7, 14, 21 и 35-й день. Кровь отбирали на 0, 14, 21, 28 и 42-й день с последующим периодом отдыха в течение 1 недели. Потом мышам повторно вводили дозы rFVIII<sub>Fc</sub> по 250 МЕ/кг на 49 день (0 день повторного введения), 56 день (7 день повторного введения), 63 день (14 день повторного введения) и 70 день (21 день повторного введения). Кровь отобрали при повторных введениях на 63 день (14 день повторного введения), 70 день (21 день повторного введения) и 77 день (28 день повторного введения);

фиг. 52 отображает результаты измерений количества антител к FVIII на 14, 21, 28 и 28-й день после повторного введения дозы 250 МЕ/кг препарата rFVIII<sub>Fc</sub>. Мыши с HemA предварительно получали 50 МЕ/кг препарата rFVIII<sub>Fc</sub> или контрольное плацебо. Результаты показывают, что препарат rFVIII<sub>Fc</sub> индуцирует иммунную толерантность у мышей с HemA;

фиг. 53 является диаграммой, показывающей рециклинг IgG и rFVIII<sub>Fc</sub> с участием рецепторов FcRn;

фиг. 54 - диаграммой, описывающей типы клеток и клеточную архитектуру, окружающую синусоидные капилляры печени;

фиг. 55 - диаграммой, показывающей схему исследования клиренса в которой перед в/в инъекцией препаратов FVIII или rFVIII<sub>Fc</sub> макрофаги и клетки Купфера разрушаются препаратом CLODROSOME® (препарат ENCAPSOME® вводили как контрольный). Использовали три модели мышей с нокаутом генов: HemA, DKO и FcRn-KO. Образцы крови отбирали в определённые промежутки времени (4 образца в одну временную точку);

фиг. 56 демонстрирует репрезентативный окрашенный разрез печени мыши с HemA, с мечеными антителами к Iba-1 - специфическим маркером макрофагов. Снимки А и А' показывают результаты контрольной обработки мышей HemA препаратом ENCAPSOME®. Снимки В и В' показывают результаты контрольной обработки мышей HemA препаратом CLODROSOME®. Снимки А' и В' показывают шаблоны количественного учёта, отмечающие окрашенные клетки Купфера, общую область ткани и пустые области;

фиг. 57 отображает иммуногистохимический (ИHC) количественный анализ положительноокрашенных мечеными антителами к рецепторам клеток F4/80 областей после обработки препаратами CLODROSOME® или ENCAPSOME®, и результаты анализа сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS), определяющие циркуляцию моноцитных клеток среди клеток крови, окрашенных такими же мечеными антителами к рецепторам F4/80;

фиг. 58 иллюстрирует результаты анализа ПЦР в режиме реального времени (RT-PCR) экспрессии маркера макрофагов - фрагмента эпидермального ростового фактора, содержащего муцин-подобный рецептор 1 (Emr1) (F4/80) в печени, селезёнке и лёгких мышей с HemA, получавших препараты ENCAPSOME® и CLODROSOME®;

фиг. 59 отображает клиренс препаратов rFVIII и rFVIII<sub>Fc</sub> у контрольных мышей с HemA и у мышей с HemA и удалёнными макрофагами/клетками Купфера;

фиг. 60 иллюстрирует клиренс препаратов rFVIII и rFVIII<sub>Fc</sub> у контрольных мышей DKO (мышь с недостатком факторов FVIII и VWF) и у мышей DKO с удалёнными макрофагами/клетками Купфера;

фиг. 61 - клиренс препаратов rFVIII и rFVIII<sub>Fc</sub> у контрольных мышей FcRn-KO (мышь с недостатком рецептора рециклинга FcRn) и у мышей FcRn-KO с удалёнными макрофагами/клетками Купфера;

фиг. 62 - титры Бетесда у мышей, рождённых от самок, иммунизированных на 16 день вынашивания указанной лекарственной субстанцией FVIII или в контроле (не получавшие препараты). Часть А фигуры изображает экспериментальную схему, описывающую временные интервалы обработки и дозы препаратов rFVIII<sub>Fc</sub> или XYNTHA® (УВД-FVIII), введённых для беременных мышей и ими рождённых мышат. Части В и С отображают титры Бетесда для rFVIII<sub>Fc</sub> у мышат, рождённых от мышей, получавших препараты rFVIII<sub>Fc</sub>, XYNTHA® или контрольных (не получавших препараты), сгруппированных согласно группе лечения (часть В) или сгруппированных по их индивидуальным самкам-родителям (часть С);

фиг. 63 - титры Бетесда у мышей, рождённых от самок, иммунизированных на 15-17 дни беременности указанной лекарственной субстанцией FVIII или в контроле (не получавшие препараты). Часть А фигуры изображает экспериментальную схему, описывающую временные интервалы обработки и дозы препаратов rFVIII<sub>Fc</sub> или XYNTHA® (УВД-FVIII), введённых для беременных мышей и ими рождённых мышат. Части В и С отображают титры Бетесда для rFVIII<sub>Fc</sub> у мышат, рождённых от мышей, получавших препараты rFVIII<sub>Fc</sub>, XYNTHA® или контрольных (не получавших препараты) мышей, сгруппированных согласно группе лечения (часть В) или сгруппированных по их индивидуальным самкам-родителям (часть С);

фиг. 64А и 64В - соответственно, уровни экспрессии поверхностных рецепторов дендритных клеток CD80 и CD274, определённые окрашиванием спленоцитов мышей, получавших дозы 100 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub>, FVIII с удалённым В-доменом (УВД-FVIII; XYNTHA®) или полноразмерной молекулы FVIII (пр-FVIII; ADVATE®) этими двумя антигенами вместе с рецепторами CD11с и молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) II класса. Эти результаты показывают содержание спленоцитов ± ОСЗ (n=7-

9; \* $p < 0,05$  против плацебо; † $p < 0,05$  против rFVIII<sub>Fc</sub>; T-тест). Фиг. 64C и 64D отображают уровни экспрессии мРНК, соответственно, молекул CD274 и IDO1, определённые методом ПЦР в режиме реального времени у спленоцитов, нормализованных к уровням GAPDH. Столбцы представляют относительные уровни экспрессии ( $2^{-\Delta Ct} \pm \text{OC3}$  ( $n=4-9$ ; \* $p < 0,05$  против плацебо; † $p < 0,05$  против rFVIII<sub>Fc</sub>; T-тест);

фиг. 65 - цветовую карту, изображающую профили экспрессии всех генов, полученных на микрочипах ПЦР в режиме реального времени в трёх тестируемых группах, спленоциты с плацебо, мыши с NemA, получавшие 50 и 250 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub>. кДНК каждого из образцов были использованы для мониторинга экспрессии отдельных генов, использованных при анализе на микрочипах ПЦР в режиме реального времени, содержащих гены, относящиеся к толерантности и связанные с энергией молекул;

фиг. 66 - профиль экспрессии вероятных генов, которые идентифицированы как отвечающие за положительную или отрицательную регуляцию спленоцитов мышей с NemA, получавших 50 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub>, по сравнению с группой, получавшей 250 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub>. Результаты изображают изменение экспрессии генов выше, чем в группе, получавшей плацебо. Граничное значение для кратности изменения в регуляции было принято равным 2, т.е. кратность изменения выше 2 считалась положительной регуляцией, а ниже 0,5 - отрицательной регуляцией. Все вероятные гены, найденные в группе, получавшей дозу препарата 50 МЕ/кг, показанные здесь, были статистически значимо регулирующими ( $p < 0,05$  против плацебо, также как и для группы, получавшей дозу 250 МЕ/кг;  $n=8-11$ );

фиг. 67 - сравнение профилей пролиферации Т-клеток у мышей, которые две недели получали инъекции rFVIII<sub>Fc</sub> в дозе 50 или 250 МЕ/кг. Столбцы отображают снижение средней интенсивности флуоресценции (MFI) карбоксифлуоресцеин-сукцинимидилового эфира (CFSE) по отношению к контрольным Т-клеткам  $\pm$  SEM (\* $p < 0,05$ , T-тест,  $n=3-5$ ) в группах, получавших дозы 250 и 50 МЕ/кг;

фиг. 68 A-D - профили секреции интерферона- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) Т-клетками у мышей с NemA, которые две недели получали инъекции по 250 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub> (фиг. 68A), 50 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub> (фиг. 68B), 250 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub>-N297A (фиг. 68C) или 50 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub>-N297A (фиг. 68D). Столбцы отображают кратность превышения секреции IFN $\gamma$  под действием плацебо  $\pm$  SEM (\* $p < 0,05$ , T-тест,  $n=3-5$ ).

#### Подробное описание

В изобретении предлагается способ лечения гемофилии А с помощью фактора VIII (FVIII) (процессированной молекулы, одноцепочечной молекулы или их комбинации) путём использования более длительного временного интервала введения доз препаратов и/или обеспечением большей площади под фармакокинетической кривой (AUC), чем возможно при помощи известных в данное время препаратов FVIII. В настоящем изобретении также предложены способы индуцирования иммунной толерантности к фактору FVIII. Данное изобретение также предлагает улучшенные химерные пептиды FVIII и способы их получения. Способы индуцирования иммунной толерантности к фактору FVIII и получение улучшенных химерных пептидов FVIII также в основном применимы к одному или многим факторам свёртывания крови, например FVII и FIX. Согласно настоящему изобретению, относящемуся к химерным пептидам FVIII (например, FVIII<sub>Fc</sub>) и их применению, в равной степени применимы к химерным пептидам, содержащим часть фактора свёртывания крови или Fc-часть. В некоторых отдельных примерах фрагмент факторов свёртывания крови химерного полипептида является фактором FVII или FIX. Настоящее изобретение в целом предлагает способ индуцирования иммунной толерантности к фактору свёртывания крови у пациента, нуждающегося в этом факторе, включающий введение пациенту химерного полипептида, содержащего часть фактора свёртывания крови и часть Fc. Настоящее изобретение также предлагает способ предотвращения или ингибирования развития выработки ингибитора фактора свёртывания, включающий введение пациенту, нуждающемуся в иммунной толерантности к химерному полипептиду фактора свёртывания, при котором этот химерный полипептид состоит из части фактора свёртывания и Fc-части. Лечение гемофилии А для предотвращения спонтанных случаев кровотечений достигается путем заместительной терапии целевым восстановлением активности FVIII от 1 до 5% его нормального уровня активности (статья Mannucci P.M. и др., N. Engl. J. Med. 344:1773-9 (2001), содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки). Существуют препараты FVIII, получаемые из плазмы, и рекомбинантные препараты FVIII, доступные для лечения случаев кровотечений по требованию или для предотвращения появления случаев кровотечений профилактическим лечением. На основании величин периода полувыведения таких препаратов (8-12 ч) (White G.C. и др., Thromb. Haemost. 77:660-7 (1997); Morfini M., Haemophilia 9 (suppl 1):94-99; discussion 100 (2003)), схемы лечения требуют частого внутривенного введения препаратов обычно два-три раза в неделю для профилактики и один-три раза в сутки для лечения по требованию (Manco-Johnson M.J. и др., N. Engl. J. Med. 357:535-544 (2007)), содержание каждой из статей полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки). Такое частое применение препаратов является болезненным и неудобным. Другой основной проблемой, связанной с доступными в настоящее время препаратами FVIII, является появление нейтрализующих антител к FVIII у получающих лечение препаратами FVIII пациентов. Ингибирующие FVIII иммунные реакции могут включать антитела к фактору FVIII и/или клеточно-опосредованные иммунные реакции. В настоящем изобретении предлагается способ введения FVIII для нуждающихся в нём людей (например, пациентов), у которых существует риск развития ингибирующего иммунного ответа к FVIII. Указанный

способ включает введение химерного полипептида, содержащего FVIII-часть и часть Fc.

В некоторых вариантах осуществления изобретения такое введение химерного полипептида снижает у пациента количество антител к FVIII по сравнению с этим количеством до введения. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный полипептид вводится пациенту с ингибирующим иммунным ответом к FVIII и такое введение способно снизить ингибирующий иммунный ответ. Ингибирующий активность FVIII иммунный ответ может быть иммунным ответом с ингибирующими антителами и/или клеточно-опосредованным иммунным ответом. Введение химерного полипептида согласно способу, представленному в этой заявке, может снизить или нейтрализовать ингибирующий иммунный ответ. Поэтому, в некоторых вариантах, количество антител к FVIII у субъекта исследования снижается или предотвращается после введения химерного полипептида, содержащего FVIII-часть и часть Fc. Это снижение может составлять, например, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% снижение. В некоторых вариантах осуществления изобретения такое введение данного химерного полипептида снижает у пациента титры антител к FVIII по сравнению с этим титром до введения. В некоторых вариантах титр антител к FVIII у субъекта исследования снижается после введения химерного полипептида, содержащего FVIII-часть и часть Fc. Соответственно введение химерного полипептида, содержащего FVIII-часть и Fc-часть, может снизить количество ингибиторов до менее чем 20, менее чем 10, менее чем 5, менее чем 4, менее чем 3, менее чем 2, менее чем 1 или менее чем 0,6 единиц Бетесды (БЕ).

В некоторых вариантах осуществления изобретения такое введение данного химерного полипептида снижает у субъекта исследования уровень цитокинов по сравнению с этим уровнем до введения. В некоторых вариантах, уровни цитокинов у субъекта исследования снижается после введения химерного полипептида, содержащего FVIII-часть и часть Fc. Цитокинами могут быть, например, IL-12, IL-4 и/или TNF- $\alpha$ . Это снижение может составлять, например, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90% снижение.

В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный полипептид вводится пациенту, у которого ранее развился ингибирующий FVIII иммунный ответ. Введение химерного полипептида для таких пациентов согласно способам, представленным в этой заявке, может снизить иммунный ответ по сравнению с предыдущим ответом. Поэтому в некоторых вариантах меньшее количество антител к FVIII вырабатывается у субъекта исследования после введения химерного полипептида, согласно данным способам, чем вырабатывается после введения полипептида, состоящего из полипептида FVIII. В некоторых вариантах осуществления изобретения такое введение химерного полипептида снижает у пациента количество антител к FVIII по сравнению с этим количеством у пациента после предыдущего лечения полипептидом, состоящим из полипептида FVIII.

В некоторых вариантах осуществления изобретения такое введение химерного полипептида снижает у пациента титр антител к FVIII по сравнению с таким титром у пациента после предыдущего лечения полипептидом, состоящим из полипептида FVIII. В некоторых вариантах титр антител к FVIII у субъекта исследования ниже после введения химерного полипептида, содержащего FVIII-часть и часть Fc, чем вырабатываемый титр после введения полипептида, состоящего из полипептида FVIII. В некоторых вариантах такое введение химерного полипептида снижает у пациента уровень цитокина по сравнению с таким уровнем у пациента после предыдущего лечения полипептидом, состоящим из полипептида FVIII. В некоторых вариантах уровни цитокинов (например, IL-12, IL-4, и/или TNF- $\alpha$ ) у субъекта является ниже после введения химерного полипептида, содержащего части FVIII и часть Fc, чем эти уровни после введения полипептида, состоящего из полипептида FVIII.

В некоторых вариантах осуществления изобретения такое введение химерного полипептида снижает у пациента количество антител к фактору свёртывания крови по сравнению с этим количеством, которое могло вырабатываться у пациента в результате введения полипептида, состоящего из части фактора свёртывания крови или полипептида, состоящего из части фактора свёртывания, но не содержащего Fc-часть. В некоторых вариантах химерный полипептид вводится пациенту, у которого ранее развился ингибирующий FVIII иммунный ответ. Введение химерного полипептида для таких пациентов согласно способам, представленным в этой заявке, может в результате снизить иммунный ответ, который мог бы появиться при введении полипептида, состоящего из полипептида FVIII. Поэтому в некоторых вариантах меньшее количество антител к FVIII вырабатывается у субъекта исследования после введения химерного полипептида согласно данным способам, чем могло бы вырабатываться при введении полипептида, состоящего из полипептида FVIII.

В некоторых вариантах такое введение данного химерного полипептида снижает у пациента титр антител к фактору свёртывания крови по сравнению с этим титром, который мог бы вырабатываться у пациента в результате введения полипептида, состоящего из части фактора свёртывания или полипептида, состоящего из части фактора свёртывания, но не содержащего Fc-часть. В некоторых вариантах этот титр антител к FVIII у субъекта исследования является ниже после введения химерного полипептида, содержащего FVIII-часть и часть Fc, чем мог бы вырабатываться после введения полипептида, состоящего из полипептида FVIII. В некоторых вариантах такое введение данного химерного полипептида снижает у пациента уровень цитокина (например, IL-12, IL-4 и/или TNF- $\alpha$ ) по сравнению с этим уровнем, который мог бы вырабатываться у пациента в результате введения полипептида, состоящего из части фак-

тора свёртывания или полипептида, состоящего из части фактора свёртывания, но не содержащего Fc-часть. В некоторых вариантах уровни цитокинов (например, IL-12, IL-4, и/или TNF- $\alpha$ ) у субъекта исследования является ниже после введения химерного полипептида, содержащего FVIII-часть и часть Fc, чем эти уровни, которые могли бы образовываться после введения полипептида, состоящего из полипептида FVIII.

Варианты данного изобретения могут дополнительно включать перед введением химерного полипептида, идентификацию у пациента одного или нескольких параметров, выбранных из группы, состоящей из: (a) обладание мутацией или делецией в гене, кодирующем фактор свёртывания крови; (b) обладание перестройкой гена, кодирующего фактор свёртывания крови; (c) наличие родственника, у которого ранее развился ингибирующий иммунный ответ к фактору свёртывания крови; (d) получение терапии препаратами интерферонов; (e) получение терапии противовирусными препаратами; (f) обладание генетической мутацией гена, отличного от гена, кодирующего фактор свёртывания крови, которая связана с повышенным риском развития ингибирующего иммунного ответа; и (g) наличие комбинации двух или большим количеством этих факторов. В некоторых вариантах пациент, несущий генетическую мутацию гена, отличного от гена, кодирующего фактор свёртывания крови, включает одну или более мутаций, выбранных из множества: (i) генетический полиморфизм, связанный с повышением уровня TNF- $\alpha$ ; (ii) генетический полиморфизм, связанный с повышением уровня IL10; (iii) генетический полиморфизм, связанный с понижением уровня CTLA-4; (iv) мутация молекул DR15 или DQB0602 молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) II класса; и (v) включает комбинацию двух или больше этих вариантов. В некоторых вариантах полиморфизм, связанный с повышением уровня TNF- $\alpha$  является заменой 308G>A. В некоторых вариантах полиморфизм, связанный с повышением уровня IL10 обусловленного микросателлитным локусом IL10G в аллели 134.

В настоящем изобретении также предлагается способ введения препарата FVIII нуждающимся в нём лицам (например, пациентам), включающий введение такому лицу терапевтической дозы химерного полипептида FVIII, например химерного полипептида FVIII-Fc, или гибрида такого полипептида в интервале дозирования, по меньшей мере, примерно в полтора раза большем, чем интервал дозирования, требуемый для эквивалентной дозы упомянутого препарата FVIII без не-FVIII-части (полипептид, состоящий из упомянутой FVIII-части), например, без Fc-части. Настоящее изобретение также направлено на способ увеличения временного интервала дозирования при введении препаратов FVIII для нуждающихся в них людей, включая введение химерного полипептида FVIII.

Этот временной интервал дозирования может быть по меньшей мере примерно от полутора до шести раз дольше, от полутора до пяти раз дольше, от полутора до четырёх раз дольше, от полутора до трёх раз дольше или полутора до двух раз дольше, чем интервал дозирования, требуемый для эквивалентной дозы упомянутого препарата FVIII без не-FVIII-части (полипептид, состоящий из упомянутой FVIII-части), например без Fc-части. Этот временной интервал дозирования 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 дольше, чем интервал дозирования, требуемый для эквивалентной дозы упомянутого белка FVIII без не-FVIII-фрагмента (полипептид, состоящий из упомянутого FVIII), например, без Fc-части. Этот интервал дозирования может составить примерно каждые 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней или дольше. Этот интервал дозирования может составить по меньшей мере примерно от полутора до 5 дней; полтора, 2, 3, 4 или 5 дней или дольше.

В настоящем изобретении также предлагается способ введения препарата FVIII нуждающимся в нём лицам, включающий введение такому лицу терапевтической дозы химерного полипептида FVIII, например, химерного полипептида FVIII-Fc, или гибрида такого полипептида для получения площади под кривой зависимости концентрации препарата в плазме от времени (AUC) по меньшей мере в один с четвертью раза больше, чем AUC, полученный для эквивалентной дозы упомянутого препарата FVIII без не-FVIII-части (полипептид, состоящий из упомянутой FVIII-части), например без Fc-части. Таким образом, настоящее изобретение включает способ увеличения или продления AUC для активности препаратов FVIII для нуждающихся в них пациентов, включая введение химерного полипептида FVIII.

В настоящем изобретении также предлагается способ введения препарата FVIII нуждающимся в нём лицам, включающий введение такому лицу терапевтической дозы полипептида FVIII, содержащего последовательности FVIII или Fc, или гибрида такого полипептида во временном интервале дозирования около каждые 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней или дольше.

Этот представленный в данной заявке способ может применяться для субъекта с необходимостью в профилактическом лечении или лечении по требованию. Термин "введение" используется в этой заявке в значении "давать" фармацевтически приемлемый полипептид FVIII, предлагаемый в этой заявке, пациенту посредством фармацевтически приемлемого способа введения. Способами введения может быть внутривенный, например внутривенная инъекция или инфузия. Дополнительные способы введения включают, например, подкожное, внутримышечное, оральное, назальное и лёгочное введение. Химерные полипептиды и гибридные белки могут быть введены в виде составляющего фармацевтической композиции, включающей по меньшей мере одно вспомогательное вещество.

"Площадь под кривой зависимости концентрации препарата в плазме от времени (AUC)", как используется в этой заявке, обозначает то же, что и термин из сферы фармакологии, и выводится из скорости и степени абсорбции препарата FVIII после его введения. AUC измеряют через определённый период времени, такой как 12, 18, 24, 36, 48 или 72 ч, или для бесконечного периода времени путём экстраполяции на основе коэффициента наклона кривой. Если в данном описании не указано иное, AUC определяется для бесконечного периода времени. Определение AUC может выполняться на единственном пациенте или на популяции пациентов, для которых рассчитывают среднее значение.

"В-домен" фактора FVIII, используется в этой заявке, в том же значении, что и В-домен, известный в этой сфере знания, что определяет идентичность внутренней последовательности аминокислот и сайтов протеолитического расщепления тромбином, например, остатки Сер741-Арг1648 полноразмерного фактора FVIII человека. Другие домены фактора FVIII человека определяют по следующим остаткам аминокислот: А1 -

остатки Ала1-Арг372; А2 - остатки Сер373-Арг740; А3 - остатки Сер1690-Иле2032; С1 - остатки Арг2033-Асп2172; С2 - остатки Сер2173-Тир2332. Последовательности А3-С1-С2 включают остатки Сер1690-Тир2332. Оставшаяся последовательность, остатки Глю1649-Арг1689, обычно относятся к пептиду активации лёгкой цепи FVIII. Размещение границ для каждого из этих доменов, включая В-домены, для фактора FVIII свиньи, мыши и лошади также известны в этой сфере знаний. В одном варианте осуществления изобретения В-домен фактора FVIII удалён (препарат "FVIII с удалённым В-доменом" или "УВД FVIII").

Примером препарата УВД FVIII является REFACTO® (рекомбинантный УВД FVIII), который обладает такой же последовательностью, как и часть последовательности FVIII в табл. 2А (i)(аминокислоты 1-1457 или 20-1457 SEQ ID № 2). В другом варианте осуществления изобретения В-домен фактора FVIII содержит интактный сайт внутриклеточного процессинга, который соответствует аргинину в остатке 754 удалённого В-домена FVIII, который соответствует аргинину в остатке 773 последовательности SEQ ID № 2 или остатку 1648 полноразмерного FVIII, который соответствует остатку аргинину 1667 SEQ ID № 6. Используемые в этой заявке номера остатков этой последовательности без ссылки на какие-либо идентифицирующие номера SEQ ID соответствуют последовательности FVIII без сигнальной пептидной последовательности (19 аминокислот) если не указано иное. Например, полноразмерный фактор FVIII S743/Q1638 отвечает последовательности S762/Q1657 SEQ ID № 6 благодаря сигнальной пептидной последовательности из 19 аминокислот.

Конструкция "FVIII с удалённым В-доменом" может обладать полными или частичными делециями, раскрытыми в патентах США № 6316226, 6346513, 7041635, 5789203, 6060447, 5595886, 6228620, 5972885, 6048720, 5543502, 5610278, 5171844, 5112950, 4868112 и 6458563, каждый из которых включён в данную заявку посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления изобретения последовательность FVIII с удалённым В-доменом содержит какую-либо одну из делеций, приведённых в колонке 4, строке 4 колонки 5, строке 28 и примерах 1-5 патента США № 6316226 (а также 6346513). В некоторых вариантах последовательность FVIII с удалённым В-доменом содержит делецию, приведённую в колонке 2, строках 26-51 и примерах 5-8 патента США № 5789203 (а также 6060447, 5595886 и 6228620). В некоторых вариантах последовательность FVIII с удалённым В-доменом содержит делецию, описанную в колонке 1, строке 25 колонки 2, строке 40 патента США № 5972885; колонке 6, строках 1-22 и примере 1 патента США № 6048720; колонке 2, строках 17-46 патента США № 5543502; колонки 4, строке 22 колонки 5, строке 36 патента США № 5171844; колонке 2, строках 55-68, фиг. 2 и примере 1 патента США № 5112950; колонке 2, строке 2 колонки 19, строке 21 и табл. 2 патента США № 4868112; колонке 2, строке 1 колонки 3, строке 19, колонке 3, строке 40 колонки 4, строке 67, колонке 7, строке 43 колонки 8, строке 26 и колонке 11, строке 5 колонки 13, строке 39 патента США № 7041635; или колонке 4, строках 25-53, патента США № 6458563. В некоторых вариантах осуществления изобретения FVIII с удалённым В-доменом содержит делецию большей части В-домена, но всё ещё содержащую аминокислотные последовательности В-домена, который является необходимым для протеолитического процессинга *in vivo* в продукте первичной трансляции на две полипептидные цепи (например, сайт внутриклеточного процессинга), как описано в публикации 91/09122, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

В некоторых вариантах FVIII с удалённым В-доменом сконструирован с делецией аминокислот 747-1638, например, практически с полным удалением В-домена. Статья Hoesben R.C. и др. *J. Biol. Chem.* 265 (13): 7318-7323 (1990), содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. FVIII с удалённым В-доменом также может содержать делецию аминокислот 771-1666 или аминокислот 868-1562 фактора FVIII. Статья Meulien P. и др. *Protein Eng.* 2(4): 301-6 (1988), содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. Дополнительные делеции В-домена, которые являются частью данного раскрытия сущности изобретения включают, например: делецию аминокислот 982-1562 или 760-1639 (Toole и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 53:5939-5942 (1986)), 797-1562 (Eaton и др., *Biochemistry* 25:8343-8347 (1986)), 741-1646 (Kaufman (опубликованная заявка согласно РСТ № WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver и др., *DNA* 6:553-564 (1987)), 741-1648 (Pasek (заявка согласно РСТ № 88/00831)), 816-1598 или 741-1689 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988) No 82:16-25, EP

295597)), содержание каждого из этих документов полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. Каждая из вышеупомянутых делеций может быть выполнена в любой последовательности FVIII.

В одном варианте FVIII-часть с удалённым В-доменом в химерном полипептиде процессируется в две цепи, связанные (или соединённые) металл-ионной связью, первая цепь состоит из тяжёлой цепи (A1-A2-частично В), и вторая цепь состоит из лёгкой цепи (A3-C1-C2). В другом варианте осуществления изобретения FVIII-часть с удалённым В-доменом является одноцепочечной молекулой фактора FVIII. Одноцепочечный фактор FVIII может содержать сайт внутриклеточного процессинга, который соответствует аргинину в остатке 754 удалённого В-домена FVIII (остаток 773 последовательности SEQ ID № 2) или в остатке 1648 полноразмерного FVIII (остаток 1657 последовательности SEQ ID № 6).

Металл-ионная связь между тяжёлой и лёгкой цепями может обеспечиваться любым металлом, известным в этой сфере техники. Например, металл может быть бивалентным ионом металла. Эти металлы, которые могут быть использованы для связывания тяжёлой и лёгкой цепи, включают, не ограничиваясь,  $Ca^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  или  $Cu^{2+}$ . Fatouros и др., Intern. J. Pharm. 155(1): 121-131 (1997); Wakabayashi и др., JBC. 279(13): 12677-12684 (2004).

В некоторых вариантах осуществления изобретения FVIII-часть в химерном полипептиде, содержит A1-домен фактора FVIII. В некоторых вариантах FVIII-часть в химерном полипептиде содержит A2-домен фактора FVIII. В некоторых вариантах FVIII-часть в химерном полипептиде, содержит A3-домен фактора FVIII. В некоторых вариантах FVIII-часть в химерном полипептиде содержит C1-домен фактора FVIII. В некоторых вариантах FVIII-часть в химерном полипептиде содержит C2-домен фактора FVIII.

"Химерный полипептид" используется в этой заявке для обозначения полипептида, который содержит в себе один по меньшей мере два полипептида (в виде последовательностей или пептидов) из разных источников. Химерные полипептиды могут содержать, например, два, три, четыре, пять, шесть, семь и более полипептидов из разных источников, таких как разные гены, разные кДНК или разных животных или других видов. Химерные полипептиды могут содержать, например, один и более линкеров, соединяющие разные последовательности. Таким образом, эти последовательности могут быть прямо связаны или могут быть связаны опосредованно через линкеры, обе или в рамках единственного химерного полипептида. Химерные полипептиды могут содержать, например, дополнительные пептиды, такие как сигнальные последовательности и последовательности, такие как 6His и FLAG, которые облегчают очистку белков или их детектирование. Кроме того, химерные полипептиды могут нести аминокислотные или пептидные дополнения к N- и/или C-терминальным сайтам транскрипции. В некоторых вариантах осуществления изобретения химерные полипептиды включают части фактора свёртывания крови (например, фрагмент FVIII) и часть, не относящуюся к фактору свёртывания (например, не-FVIII часть). Иллюстративные части, не относящиеся к фактору свёртывания (например, не-FVIII части), включают, например, Fc. Иллюстративные химерные FVIII-Fc полипептиды включают, например, последовательность SEQ ID № 2 или 6 (табл. 2), с или без их сигнальной последовательности и химерный Fc-полипептид SEQ ID № 4 (табл. 2). Как используется в этом документе термин "часть", когда он применяется к химерному полипептиду, относится к одному из компонентов или составляющих такого химерного полипептида (например, "химерный полипептид, содержащий FVIII-часть и Fc-часть" или "FVIII-часть химерного полипептида"). Другими словами, термин "часть" используется для указания источника различных компонентов в химерном полипептиде, но не используется для указания фрагмента белка FVIII или фрагмента участка Fc. Химерный полипептид может содержать последовательность по меньшей мере на 90 или 95% идентичную аминокислотной последовательности FVIII и Fc, показанную в табл. 2(i) без сигнальной последовательности (аминокислоты 20-1684 SEQ ID № 2) или по меньшей мере на 90 или 95% идентичную аминокислотной последовательности FVIII и Fc, показанной в табл. 2A(i) с сигнальной последовательностью (аминокислоты 1-1684 SEQ ID № 2), с которой эта последовательность обладает активностью фактора FVIII. Активность фактора FVIII может быть измерена анализом времени частичной активации тромбопластина (aPPT), хромогенным анализом или другими известными методами. Химерный полипептид может содержать последовательность идентичную аминокислотной последовательности FVIII и Fc, показанной в табл. 2A(i) без сигнальной последовательности (аминокислоты 20-1684 SEQ ID № 2) или идентичной аминокислотной последовательности FVIII и Fc, показанной в табл. 2A(i) с сигнальной последовательностью (аминокислоты 1-1684 SEQ ID № 2).

В некоторых вариантах осуществления изобретения FVIII-часть включает A3-домен FVIII. В некоторых вариантах часть FVIII содержит FVIII человека. В некоторых вариантах часть FVIII несёт полную или частичную делецию В-домена. В некоторых вариантах FVIII-часть является по меньшей мере на 90 или 95% идентичной аминокислотной последовательности FVIII, показанной в табл. 2, без сигнальной последовательности (аминокислоты 20-1457 SEQ ID № 2; аминокислоты 20-2351 SEQ ID № 6). В некоторых вариантах FVIII-часть является идентичной аминокислотной последовательности FVIII, показанной в табл. 2, без сигнальной последовательности (аминокислоты 20-1457 SEQ ID № 2; аминокислоты 20-2351 SEQ ID № 6). FVIII-часть является по меньшей мере на 90 или 95% идентичной аминокислотной последовательности FVIII, показанной в табл. 2, с сигнальной последовательностью (аминокислоты 1-1457 SEQ ID № 2; аминокислоты 1-2351 SEQ ID № 6). В некоторых вариантах FVIII-часть является иден-

тичной аминокислотной последовательности FVIII, показанной в табл. 2, с сигнальной последовательностью (аминокислоты 1-1457 SEQ ID № 2; аминокислоты 1-2351 SEQ ID № 6). В некоторых вариантах осуществления изобретения FVIII-часть обладает коагулирующей кровью активностью.

В некоторых вариантах часть молекулы Fc является идентичной аминокислотной последовательности Fc, показанной в табл. 2 (аминокислоты 1458-1684 SEQ ID № 2 или аминокислоты 2352-2578 SEQ ID № 6). В некоторых вариантах химерный полипептид представляет собой форму гибридной молекулы, включающей второй полипептид в сочетании с химерным полипептидом, тогда как второй полипептид состоит в основном из молекулы Fc или состоит из Fc-части или участника связывания молекулы FcRn.

В некоторых вариантах часть фактора свёртывания химерного полипептида содержит фактор IX. В некоторых вариантах часть фактора IX (FIX) химерного полипептида является по меньшей мере на 90, 95 или 100% идентична аминокислотной последовательности FIX, показанной в табл. 2, без сигнальной последовательности (аминокислоты 20-1457 SEQ ID № 2; аминокислоты 20-2351 SEQ ID № 6). В некоторых вариантах химерный полипептид представляет собой мономер димера гибридной молекулы, включающей первую цепь, содержащую FIX-часть и Fc-часть, и вторую цепь, в основном состоящую из Fc-части или состоящую из Fc-части.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный химерный полипептид включает часть фактора VII (FVII). В некоторых вариантах химерный полипептид представляет собой мономер димера гибридной молекулы, включающей первую цепь, содержащую FVII-часть и Fc-часть, и вторую цепь, в основном состоящую из Fc-части или состоящую из Fc-части. В некоторых вариантах осуществления изобретения FVII-часть является неактивным FVII, активированным FVII или активирующимся FVII.

В некоторых вариантах химерный полипептид, как раскрывается в данной заявке, содержит фактор свёртывания крови, отличающийся от FVIII, например FVII, FVIIa или FIX. В одном примере FVII представляет собой профермент фактора VII (неактивная форма FVII), активированным FVII или активирующимся FVII. В другом примере FIX является проферментом FIX или активированным FIX. В этой сфере знаний известно множество частей молекул, не относящихся к факторам свёртывания, способных увеличивать период полувыведения полипептидов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения химерный полипептид, содержащий FVIII-часть, обладает увеличенным периодом полувыведения ( $t_{1/2}$ ) превышающий такой для полипептида, содержащего такую же FVIII-часть без не-FVIII части. Под химерным полипептидом с увеличенным  $t_{1/2}$  в этой заявке может подразумеваться как FVIII длительного действия. Химерные полипептиды FVIII длительного действия включают, например, FVIII соединённый с Fc (включая, например, химерные полипептиды FVIII в форме гибридной молекулы, такой как мономер димера гибридной молекулы FVIII<sub>h</sub>Fc: см. пример 1, фиг. 1, табл. 2A и патенты США № 7404956 и 7348004), и FVIII соединённый с альбумином.

"Культура", "культивировать" и "культивирование" используются в этой заявке в значении инкубировать клетки в условиях *in vitro*, которые позволяют клетке расти или делиться или поддерживать клетки в жизнеспособном состоянии. "Культивируемые клетки", как используется в этой заявке, обозначают клетки, которые размножают *in vitro*.

"Фактор VIII" в пределах данной заявки обозначен аббревиатурой "FVIII" и обозначает функциональный полипептид в его обычной роли коагуляции крови, если не указывается иное. Следовательно, термин FVIII охватывает варианты полипептидов, обладающих одной функциональностью. Белки FVIII могут быть белками FVIII человека, свиньи, лошади или мыши. Как описано в разделе "Уровень техники", известными являются полноразмерный полипептид и полинуклеотидные последовательности, а также много функциональных фрагментов, мутантных и модифицированных вариантов этого белка. Примеры последовательностей FVIII человека показаны как подпоследовательности SEQ ID № 2 или 6 (табл. 2). Полипептиды FVIII включают, например, полноразмерный FVIII, полноразмерный FVIII без остатка Met в N-терминальном сайте, зрелый FVIII (без сигнальной последовательности), зрелый FVIII с дополнительным Met в N-терминальном сайте и/или FVIII с полной или частичной делецией В-домена. Варианты FVIII включают делеции В-домена, частичные или полные делеции.

Известно очень много функциональных вариантов, которые обсуждаются в тексте выше и ниже. Кроме того, у пациентов с гемофилией было идентифицировано сотни нефункциональных мутаций фактора FVIII. И было определено, что влияние этих мутаций на функционирование FVIII больше зависит от того, где они находятся в 3-мерной структуре FVIII, чем от природы заместителя (статья Cutler и др., *Hum. Mutat.* 19:274-8 (2002)), содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. К тому же при сравнении между FVIII людей и других видов были обнаружены консервативные остатки, которые вероятно необходимы для функционирования фактора (статья Cameron и др., *Thromb. Haemost.* 79:317-22 (1998); патент США 6251632), содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылок.

Ген FVIII человека был выделен и экспрессирован в клетках млекопитающих (Toole J.I. и др., *Nature* 312:342-347 (1984); Gitschier I. и др., *Nature* 312:326-330 (1984); Wood W.I. и др., *Nature* 312:330-337 (1984); Vehar G.A. и др., *Nature* 312:337-342 (1984); WO 87/04187; WO 88/08035; WO 88/03558; пат. США № 4757006), содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылок, и последовательности аминокислот были определены посредством кДНК. Авторы Caron и др., пат. США №

4965199, содержание которого полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки, раскрывает способ использования рекомбинантной ДНК для получения FVIII в клетках-хозяинах млекопитающих и очистку FVIII человека. Сообщалось об экспрессии FVIII человека в клетках CHO (яичника китайского хомяка) и ВНКС (клетках почки новорождённого хомяка). FVIII человека модифицировали для удаления части или всего В-домена (пат. США № 4994371 и 4868112, содержание каждого из которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылок), выполняли замену В-домена FVIII человека В-доменом фактора V (пат. США № 5004803, содержание которого полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки). Последовательность кДНК, кодирующая FVIII человека и расчётная аминокислотная последовательность показаны в SEQ ID № 1 и 2, соответственно, взяты из опубл. заявки США № 2005/0100990, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

В пат. США № 5859204, содержание которого полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки, автором Lollar J.S. сообщается, что функциональные мутантные варианты FVIII обладают пониженной антигенностью и иммунореактивностью. В пат. США № 6376463, содержание которого полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки, автором Lollar J.S. сообщается также, что мутантные варианты FVIII обладают пониженной иммунореактивностью. В опубл. заявке США № 2005/0100990, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки, автор Saenko и др. сообщает о функциональных мутациях А2-домена FVIII.

Некоторое количество функциональных молекул FVIII, включающих делеции В-домена, представлены в следующих патентах США: 6316226 и 6346513, оба закреплён за компанией Baxter; 7041635 закреплён за In2Gen; 5789203, 6060447, 5595886 и 6228620 закреплены за Chiron; 5972885 и 6048720 закреплены за Biovitrum; 5543502 и 5610278 закреплены за Novo Nordisk; 5171844 закреплён за Immuno Ag; 5112950 закреплён за Transgene S.A.; 4868112 закреплён за Genetics Institute, содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. Опубликована последовательность FVIII свиньи (статья Toole J.J. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53:5939-5942 (1986)), содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки, и сообщалось о полной последовательности кДНК свиньи, полученной ПЦР амплификацией последовательностей FVIII из библиотеки кДНК селезёнки свиньи (статья Healey J.F. и др., Blood 88:4209-4214 (1996), содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки). Гибридные FVIII человека/свиньи несущие замены всех доменов, всех субединиц и специфических аминокислотных последовательностей были предложены в пат. США № 5364771 авторами Lollar и Runge и в заявке WO 93/20093, содержание которых полностью включено в настоящую заявку посредством ссылок. Совсем недавно нуклеотид и соответствующая аминокислотная последовательность А1- и А2-доменов FVIII свиньи и химерного FVIII с доменами А1 и А2 свиньи, замещающие соответствующие человеческие домены, представлены в заявке WO 94/11503, содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. В пат. США 5859204 автор Lollar J.S. также раскрывает кДНА свиньи и производные от неё аминокислотные последовательности. В пат. США № 6458563, содержание которого полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки, закреплённый за автором Emogo, предлагает FVIII свиньи с удалённым В-доменом.

Фактор FVIII (или FVIII-часть химерного полипептида) может быть по меньшей мере на 90 или 95% идентичным аминокислотной последовательности FVIII, показанной в табл. 2, без сигнальной последовательности (аминокислоты 20-1457 последовательности SEQ ID № 2; и аминокислоты 20-2351 последовательности SEQ ID № 6), в котором упомянутая FVIII-часть обладает активностью FVIII. Фактор FVIII (или FVIII-часть химерного полипептида) может быть идентичным аминокислотной последовательности FVIII, показанной в табл. 2, без сигнальной последовательности (аминокислоты 20-1457 SEQ ID № 2; и аминокислоты 20-2351 SEQ ID № 6). Фактор FVIII (или FVIII-часть химерного полипептида) может быть по меньшей мере на 90 или 95% идентичным аминокислотной последовательности FVIII, показанной в табл. 2, с сигнальной последовательностью (аминокислоты 1-1457 SEQ ID № 2; и аминокислоты 1-2351 последовательности SEQ ID № 6), в котором упомянутая FVIII-часть обладает активностью FVIII. Фактор FVIII (или FVIII-часть химерного полипептида) может быть идентичным аминокислотной последовательности FVIII, показанной в табл. 2, с сигнальной последовательностью (аминокислоты 1-1457 SEQ ID № 2; и аминокислоты 1-2351 SEQ ID № 6).

В некоторых вариантах осуществления изобретения фактор свёртывания крови является зрелой формой профермента фактора VII, активированным FVII (FVIIa), способным к активации FVII (FVIIa) или их вариантами. Фактор VII (FVII, F7, также именуемый как фактор 7, фактор коагуляции VII, фактор сыворотки VII, сывороточный ускоритель конверсии протромбина, проконвертин и эптактог- $\alpha$ ) представляет собой сериновую протеазу, которая является частью каскада коагуляции крови. FVII включает Gla-домен, два домена EGF (EGF-1 и EGF-2) и домен сериновой протеазы (или пептидазный S1-домен), который является высококонсервативным среди членов семейства пептидаз S1-сериновых протеаз, например, таких как химотрипсин. FVII встречается как одноцепочный профермент, активированный профермент-подобный двухцепочный полипептид и полностью активированная двухцепочечная форма. Как используется в этой заявке, термин "профермент-подобный" белок или полипептид относится к белку, который активирован путём протеолитического расщепления, но по-прежнему проявляющий свойства, связанные с проферментом такими как, например, низкая или отсутствие активности или конформация,

напоминающая конформацию формы белка зимогена. Например, двухцепочечная активированная форма FVII является профермент-подобным белком, когда она не связана с тканевым фактором, она сохраняет конформацию сходную с нерасщеплённым проферментом, и поэтому проявляющая очень низкую активность. После связывания с тканевым фактором двухцепочечная активированная форма FVII претерпевает конформационное изменение и проявляет свою полную активность как фактор коагуляции. Иллюстративные варианты FVII включают варианты с повышенной удельной активностью, например мутации, повышающие активность FVII путём повышения его ферментной активности (Kcat или Km). Такие варианты были описаны в этой сфере знаний и включают, например, мутантные формы этой молекулы как описано, например, в статьях Persson и др., 2001, PNAS 98:13583; Petrovan and Ruf, 2001, J. Biol. Chem. 276:6616; Persson и др., 2001, J. Biol. Chem. 276:29195; Soejima и др., 2001, J. Biol. Chem. 276:17229; Soejima и др., 2002, J. Biol. Chem. 276:49027. В одном варианте осуществления изобретения форма вариантов включает мутации FVII. Иллюстративные мутации включают замены аминокислот V158D-E296V-M298Q. В другом варианте осуществления изобретения форма варианта FVII включает замещение аминокислот 608-619 (LQQRKVGDSPN, соответствующих 170-й петле) зрелой последовательности FVII аминокислотами EASYPGK из 170-й петли трипсина. Варианты с высокой удельной активностью также известны в этой сфере знаний и для FIX. Например, авторы Simioni и др. (2009 N.E. Journal of Medicine 361:1671) описывают мутацию R338L. Авторы Chang и др. (1988 JBC 273:12089) и Pierri и др. (2009 Human Gene Therapy 20:479) описывают мутацию R338A. Известны в этой сфере и другие мутации, включающие описанные, например, в статьях Zogg and Brandstetter, 2009, Structure 17:1669; Sichler et al., 2003, J. Biol. Chem. 278:4121 и Sturzebecher и др. 1997, FEBS Lett 412:295. Содержание этих статей полностью включено в эту заявку посредством ссылок. Полная активизация, которая происходит при конформационном изменении профермент-подобной формы, происходит после связывания с ней кофакторного тканевого фактора. Мутации могут вводиться также для получения конформационного изменения в отсутствии тканевого фактора. Таким образом, упоминание FVIIa включает профермент-подобную форму, полностью активированную двухцепочечную форму или активируемую форму фактора. "Активируемый фактор VII" является фактором VII в неактивной форме (например, в форме его профермента), которая способна к превращению в активную форму.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фактор свёртывания крови является зрелой формой фактора IX или его вариантом. Фактор IX распространён как одноцепочечный профермент плазмы из 415 аминокислот (A. Vysotchin и др., J. Biol. Chem. 268, 8436 (1993)). Профермент FIX активируется фактором FXIa или комплексом тканевый фактор/FVIIa. Специфическое расщепление связи аминокислот аргинин-аланин 145-146 и аргинин-валин 180-181 приводит к сохранению соединения лёгкой и тяжёлой цепей единственной дисульфидной связью между цистеином 132 и цистеином 289 (S. Vajaj и др., Biochemistry 22, 4047 (1983)).

Структура FIX подобна структуре белков свёртывания крови, зависимых от витамина K, FVII, FX и белка C (B. Furie и V. Furie, см. выше). Приблизительно 45 аминокислот аминотерминального сайта содержат  $\gamma$ -карбоксиглутаминовую кислоту или Gla-домен. За которым следуют два гомологичных эпидермальному фактору роста (EGF) домена, пептид активации и каталитическая "тяжёлая цепь", которая входит в семейство сериновых протеаз (A. Vysotchin и др., J. Biol. Chem. 268, 8436 (1993); S. Spitzer и др., Biochemical Journal 265, 219 (1990); H. Brandstetter и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9796(1995)).

"Эквивалентная доза" используется в этой заявке в значении такой дозы активности FVIII, выраженной в международных единицах, которая не зависит от молекулярной массы взятого полипептида. Одна международная единица (ME) активности FVIII соответствует приблизительно количеству FVIII в одном миллилитре плазмы крови человека в норме. Существует несколько видов анализов для количественного измерения активности FVIII, включая количественное определение с хромогенным субстратом Европейской Фармакопеи и одностадийный анализ коагулирующей активности.

"Fc" в этой заявке обозначает молекулы - участники связывания с функциональным неонатальным Fc-рецептором (FcRn), если не указано иное. Участник связывания FcRn представляет собой какую-либо молекулу, которая может специфически связываться с рецептором FcRn с последующим активным транспортом участника связывания с помощью FcRn-рецептора. Таким образом, обозначение Fc включает какие-либо варианты IgG к Fc обладающие функциональностью. Участок Fc-части IgG, связывающий FcRn-рецептор описан методом рентгеновской кристаллографии (статья Burmeister и др., Nature 372:379 (1994), содержание которой полностью включено в эту заявку посредством ссылки). Основная область контакта молекулы Fc с FcRn находится возле соединения CH2 и CH3 доменов. Все контакты Fc-FcRn находятся в пределах одной тяжёлой цепи Ig. Участники связывания FcRn включают, например, целый IgG, Fc фрагмент IgG и другие фрагменты IgG, которые включают полный участок связывания FcRn. Основные сайты контакта содержат аминокислотные остатки 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 и 314 CH2-домена и аминокислотные остатки 385-387, 428 и 433-436 CH3-домена.

Информация, представленная относительно нумерации иммуноглобулинов и фрагментов иммуноглобулинов или их участков, основана на публикации Kabat и др., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, MD; содержание которой полностью включено в эту заявку посредством ссылки. Рецептор FcRn был изолирован у нескольких видов млекопитаю-

ших, включая человека. Известны последовательности FcRn человека, FcRn крысы и FcRn мыши (статья Story и др., *J. Exp. Med.* 180: 2377 (1994), содержание которой полностью включено в эту заявку посредством ссылки). Рецептор FcRn может содержать домены CH2 и CH3 иммуноглобулина с или без шарнирной области иммуноглобулина. Иллюстративные варианты Fc представлены в заявках WO 2004/101740 и WO 2006/074199, содержание которых полностью включено в эту заявку посредством ссылки.

Пептид Fc (Fc-часть химерного полипептида) может нести одну и более мутаций и комбинации мутаций. Например, пептид Fc (Fc-часть химерного полипептида) может содержать мутации увеличивающие период полувыведения, такие как M252Y, S254T, T256E и их сочетания, как описано в статье Oganesyan и др., *Mol. Immunol.* 46:1750 (2009), содержание которой полностью включено в эту заявку посредством ссылки; H433K, N434F и их сочетания как описано в статье Vassago и др., *Nat. Biotechnol.* 23:1283 (2005), содержание которой полностью включено в эту заявку посредством ссылки; мутантные последовательности, раскрытые на стр. 1-2, в параграфе [0012] и в примере 9 и 10 опубл. заявки США № 2009/0264627 A1, содержание которой полностью включено в эту заявку посредством ссылки; и мутантные последовательности, раскрытые на странице 2, в параграфах [0014]-[0021] опубл. заявки США № 20090163699 A1, содержание которой полностью включено в эту заявку посредством ссылки.

Пептид Fc (Fc-часть химерного полипептида) может также включать следующие мутации: участок Fc IgG может быть модифицирован согласно широко распространённым методикам, таким как сайт-ориентированный мутагенез, и подобным им для того, чтобы обеспечить модификацию IgG или Fc-фрагментов или их частей, которые будут связываться с FcRn. Такие модификации включают, например, модификации, удалённые от сайтов, контактирующих с FcRn, а также модификации в пределах контактирующих сайтов, сохраняющих или даже усиливающих связывание с FcRn. Например, следующие отдельные аминокислотные остатки Fc-части IgG1 (Fc $\gamma$ 1) человека могут быть заменены без значительной потери аффинности связывания 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, например, P238A представляет замену пролина дикого типа аланином в номере положения 238. В дополнении к аланину аминокислоты дикого типа могут замещаться другими аминокислотами в положениях, описанных выше. Мутации в единственном количестве могут вводиться в более чем одну сотню участников связывания FcRn, отличающихся от нативного Fc. Кроме того, могут вместе вводиться комбинации из двух, трёх или более отдельных мутаций, давая увеличение участников связывания FcRn до более нескольких сотен вариантов. Отдельные из этих мутаций могут обладать новыми видами функциональности кроме участника связывания FcRn. Например, один вариант, включающий N297A, удаляет высококонсервативный сайт N-гликозилирования. Влияние этой мутации заключается в снижении иммуногенности, таким образом увеличивается полупериод циркуляции этого участника связывания FcRn и создаётся участник связывания FcRn неспособный связываться с рецепторами Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RIIA, Fc $\gamma$ RIIB и Fc $\gamma$ RIIA без нарушения аффинности к FcRn (статьи Routledge и др. 1995, *Transplantation* 60:847; Friend и др. 1999, *Transplantation* 68:1632; Shields и др. 1995, *J. Biol. Chem.* 276:6591, содержание которых полностью включено в эту заявку посредством ссылок).

Кроме того, по меньшей мере три Fc- $\gamma$ -рецептора человека оказались способными распознавать сайт связывания на IgG с более низкой шарнирной областью, главным образом аминокислоты 234-237. Поэтому другой пример новой функциональности и потенциального снижения иммуногенности может выявиться при мутации в этом участке, например заменой аминокислот 233-236 IgG1 человека "ELLG" на соответствующую последовательность IgG2 "PVA" (с одной делецией аминокислоты). Показано, что рецепторы Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, and Fc $\gamma$ RIII, которые выступают медиаторами различных эффекторных функций, не могут связываться с IgG1, когда в них введены такие мутации (статьи Ward and Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2:77 (1995) содержание которых полностью включено в эту заявку посредством ссылок; и Armour и др., *Eur. J. Immunol.* 29:2613 (1999), содержание которых полностью включено в эту заявку посредством ссылок). В качестве дополнительного примера новой функциональной способности, полученной в результате описанных выше мутаций, аффинность к FcRn в некоторых случаях может быть увеличена выше аффинности молекулы дикого типа. Это увеличенная аффинность может отражать повышение скорости ассоциации, снижение скорости диссоциации или оба варианта повышения скорости ассоциации и снижения скорости диссоциации. Предполагается, что мутации, которые обеспечивают повышенную аффинность к FcRn, включают, к примеру, мутации T256A, T307A, E380A и N434A (статья Shields и др., *J. Biol. Chem.* 276:6591 (2001), содержание которой полностью включено в эту заявку посредством ссылки).

Пептид Fc (или Fc-часть химерного полипептида) может быть по меньшей мере на 90 или 95% идентичный аминокислотной последовательности Fc, показанной в табл. 2 (аминокислоты 1458-1684 последовательности SEQ ID № 2 или аминокислоты 2352-2578 последовательности SEQ ID № 6). Пептид Fc (или Fc-часть химерного полипептида) может быть идентичный аминокислотной последовательности Fc, показанной в табл. 2 (аминокислоты 1458-1684 SEQ ID № 2 или аминокислоты 2352-2578 SEQ ID № 6). "Гибридные" полипептиды или белки, как используется в этой заявке, обозначают комбинирование химерного полипептида с другим полипептидом. Химерный полипептид и второй полипептид в гибридной молекуле могут быть связаны друг с другом белок-белковыми взаимодействиями, такими как взаимодействия электростатических зарядов или гидрофобными взаимодействиями. Химерный полипептид и второй полипептид в гибридной молекуле могут быть связаны друг с другом дисульфидной или другой ковалентной связью (ямы). Гибридные белки описаны в заявках WO 2004/101740 и WO 2006/074199, содержание каждой из которых полностью включено в эту заявку посредством ссылки. См. также патенты США № 7404956 и 7348004, содержание каждого из которых полностью включено в эту заявку посредством ссылки. Второй полипептид может быть второй копией такого же химерного полипептида или может быть неидентичным химерным полипептидом. См., например, фиг. 1, пример 1 и табл. 2.

В одном варианте осуществления изобретения второй полипептид является полипептидом, содержащим Fc. В другом варианте химерный полипептид является химерным полипептидом FVIII-Fc, и второй полипептид содержит главным образом Fc, например, гибридный полипептид примера 1, который представляет собой рекомбинантный белок слияния rFVIII-Fc, состоящий из единой молекулы рекомбинантного FVIII человека с удалённым В-доменом (rFVIII-УВД), соединённой с димерным Fc-доменом IgG1 человека без промежуточной линкерной последовательности. Этот гибридный полипептид, именуемый в этой заявке как FVIII-Fc - белок слияния с мономерным Fc, гибридный мономерного белка FVIII-Fc, мономерный гибридный белок FVIII-Fc и мономер-димер FVIII-Fc. См. пример 1, фиг. 1 и табл. 2А. Доклинические и клинические данные исследования этого гибридного полипептида представлены в примерах.

Второй полипептид в этом гибриде может включать или содержать главным образом последовательность по меньшей мере на 90 или 95% идентичную аминокислотной последовательности, показанной в табл. 2А(ii) без сигнальной последовательности (аминокислоты 21-247 SEQ ID № 4) или по меньшей мере на 90 или 95% идентичную аминокислотной последовательности, показанной в табл. 2А(ii) с сигнальной последовательностью (аминокислоты 1-247 SEQ ID № 4). Второй полипептид может включать или содержать главным образом последовательность идентичную аминокислотной последовательности, показанной в табл. 2А(ii) без сигнальной последовательности (аминокислоты 21-247 SEQ ID № 4) или идентичную аминокислотной последовательности, показанной в табл. 2А(ii) с сигнальной последовательностью (аминокислоты 1-247 SEQ ID № 4).

Фиг. 1 - это схематическое изображение, показывающее структуру В-домена, удалённого у химерного полипептида FVIII-Fc и его соединение со вторым полипептидом, таким как Fc-полипептид. Для того чтобы получить этот гибрид с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ПЦР-ОТ), используя FVIII-специфические праймеры, из поли-А-РНК печени человека (Clontech) синтезировали кодирующую последовательность рекомбинантного FVIII человека с удалённым В-доменом. Последовательность FVIII включает нативную сигнальную последовательность фактора FVIII. Делеция В-домена расположена от остатка серина 743 (S743; 2287 пар оснований) до глутамина 1638 (Q1638; 4969 пар оснований) с общим размером делеции в 2682 пар оснований. Потом кодирующую последовательность человеческого рекомбинантного полипептида Fc получили из кДНК библиотеки лейкоцитов человека (Clontech) с помощью ПЦР-ОТ, используя специфические Fc-праймеры. Праймеры были сконструированы таким образом, чтобы FVIII последовательность с удалённым В-доменом была соединена напрямую с N-терминальным сайтом последовательности Fc без промежуточного линкера. ДНК последовательность FVIII-Fc была клонирована в векторе с двойной экспрессией млекопитающих pBUDCE4.1 (Invitrogen) под контролем промотора CMV. Вторая идентичная последовательность включает сигнальную последовательность IgK мыши, полученной с помощью ПЦР-ОТ и клонированной в обратном направлении от второго промотора - EF1 $\alpha$  в векторе экспрессии pBUDCE4.1.

Вектор экспрессии rFVIII-Fc перенесли в клетки почки эмбриона человека 293 (HEK293N; Invitrogen), используя в качестве агента трансфекции Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Отбором с применением реагента Zeocin (Invitrogen) были получены стабильные линии клонированных клеток. Одна линия клонированных клеток - 3C4-22 была использована для синтеза молекул FVIII-Fc для получения их характеристик *in vivo*. В компании Biogen Idec (Cambridge, MA) был получен и очищен рекомбинантный белок FVIII-Fc (McCue и др., 2009). Описанная выше методика трансфекции, как ожидалось, привела бы к получению трёх продуктов, например мономерных гибридных белков rFVIII-Fc, димерных гибридных белков rFVIII-Fc и димерных полипептидов Fc. Однако в кондиционированной для таких клеток среде практически не было обнаружено димерных молекул rFVIII-Fc. В значительной степени эта кондиционированная среда содержала Fc и мономерные rFVIII-Fc. Возможно, что размер димерного белка rFVIII-Fc был слишком большой и препятствовал эффективной его секреции из этих клеток. Этот результат был успешным, поскольку при нём обеспечивалась менее сложная очистка мономера, чем если бы в получены все три белка. Полученный продукт, использованный в таких исследованиях, имел удельную

активность примерно 9000 МЕ/мг.

"Интервал дозирования" используется в этой заявке для обозначения времени дозирования, которое проходит между многократным приёмом препарата, введенного субъекту. Сравнение интервала дозирования может выполняться на единственном пациенте или на популяции пациентов, после чего рассчитывают среднее значение, полученное в этой популяции.

Интервал дозирования при введении химерного полипептида FVIII, например химерного полипептида FVIII-Fc (полипептида, содержащего FVIII или гибридный белок), в настоящем изобретении может длиться по меньшей мере примерно в полтора раза дольше, чем интервал дозирования, требуемый для эквивалентной дозы упомянутого белка FVIII без не-FVIII-части, например без Fc-части (полипептид, содержащий упомянутый FVIII). Этот временной интервал дозирования может быть по меньшей мере примерно от полутора до шести раз дольше, от полутора до пяти раз дольше, от полутора до четырёх раз дольше, от полутора до трёх раз дольше или полутора до двух раз дольше, чем интервал дозирования, требуемый для эквивалентной дозы упомянутого белка FVIII без не-FVIII-части, например без Fc-части (полипептид, состоящий из упомянутого FVIII). Этот временной интервал дозирования 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 дольше, чем интервал дозирования, требуемый для эквивалентной дозы упомянутого белка FVIII без не-FVIII-фрагмента, например, без Fc-части (полипептид, состоящий из упомянутого FVIII). Этот интервал дозирования может составить примерно каждые 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 дней или дольше. Этот интервал дозирования может составить по меньшей мере примерно от полутора до 5 дней, полтора, 2, 3, 4 или 5 дней или дольше. Для лечения по требованию интервал дозирования указанного химерного полипептида или гибридного белка составляет примерно каждые 24-36, 24-48, 24-72, 24-96, 24-120, 24-144, 24-168, 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 дольше.

В одном варианте осуществления изобретения эффективная доза составляет 25-65 МЕ/кг (25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 62, 64 или 65 МЕ/кг) и интервал дозирования составляет каждые 3-5, 3-6, 3-7, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или более дней или три раза в неделю или не более чем три раза в неделю. В другом варианте эффективная доза составляет 65 МЕ/кг и интервал дозирования составляет раз в неделю или раз в каждые 6-7 дней. Эти дозы могут быть введены повторно так долго, сколько необходимо (например, по меньшей мере 10, 20, 28, 30, 40, 50, 52 или 57 недель, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 лет).

В некоторых вариантах эффективная доза для лечения по требованию составляет 20-50 МЕ/кг (20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 МЕ/кг). Лечение по требованию может проводиться в виде однократного введения дозы или в виде повторных введений. Для повторных дозировок интервал дозирования может составлять каждые 12-24 ч, каждые 24-36 ч, каждые 24-48 ч, каждые 36-48 ч или каждые 48-72 ч.

Соответственно, термин "повторное дозирование" относится к введению более чем одной дозы в течение периода времени. Дозы, вводимые в режиме "повторное дозирование", относятся к "повторным дозам". В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая из повторных доз отделяется от другой по меньшей мере 12 ч, по меньшей мере 24 ч, по меньшей мере 2 днями, по меньшей мере 3 днями, по меньшей мере 4 днями, по меньшей мере 5 днями, по меньшей мере 6 днями, по меньшей мере 7 днями, по меньшей мере 8 днями, по меньшей мере 9 днями, по меньшей мере 10 днями, по меньшей мере 11 днями, по меньшей мере 12 днями, по меньшей мере 13 днями, по меньшей мере 14 днями или по меньшей мере 15 днями. В некоторых вариантах повторные дозы составляют по меньшей мере две дозы, по меньшей мере 5 доз, по меньшей мере 10 доз, по меньшей мере 20 доз, по меньшей мере 25 доз, по меньшей мере 30 доз, по меньшей мере 35 доз, по меньшей мере 40 доз, по меньшей мере 45 доз, по меньшей мере 50 доз, по меньшей мере 55 доз, по меньшей мере 60 доз, по меньшей мере 65 доз или по меньшей мере 70 доз. Повторные дозы составляют от около двух доз до около 100 доз, от около 5 доз до около 80 доз, от около 10 доз до около 70 доз, от около 10 доз до около 60 доз, от около 10 доз до около 50 доз, от около 15 доз до около 40 доз, от около 15 доз до около 30 доз, от около 20 доз до около 30 доз, от около 20 доз до около 40 доз. Повторные дозы составляют около двух доз, около пяти доз, около 10 доз, около 15 доз, около 20 доз, около 25 доз, около 30 доз, около 35 доз, около 40 доз, около 45 доз, около 50 доз, около 55 доз, около 60 доз, около 65 доз, около 70 доз, около 75 доз, около 80 доз, около 90 доз или около 100 доз.

В некоторых вариантах осуществления изобретения пациенту после повторных доз дополнительно вводится фармацевтическая композиция, содержащая белок фактора свёртывания, которая включает фактор свёртывания, но не содержит Fc-часть. Этот фактор свёртывания может быть полноразмерным или зрелым фактором свёртывания. В некоторых вариантах осуществления изобретения таким фактором могли быть препараты: ADVATE®, RECOMBINATE®, KOGENATE FS®, HELIXATE FS®, XYNTHA®/REFACTO AB®, HEMOFIL-M®, MONARC-M®, MONOCLATE-P®, HUMATE-P®, ALPHANATE®, KOATE-DVI® и NYATE:C®.

В этой заявке термины "длительно действующий" и "стойкий" являются взаимозаменяемыми. "Стойкие факторы свёртывания" или "длительно действующие факторы свёртывания" (например, длительно действующий FVII, FVIII и FIX) являются факторы свёртывания, например FVII, FVIII или FIX, обладающие увеличенным периодом полувыведения (также упоминаемым в этой заявке как  $t_{1/2}$ ,  $\beta t_{1/2}$ , полупериод элиминации и ПП) референтного фактора свёртывания, например, FVII, FVIII или FIX. "Более длительная" активность FVIII может измеряться любым из известных в этой сфере методов, например, анализом aPTT, хромогенным анализом, методами ROTEM, TGA и т.д. В одном варианте осуществления изобретения "более длительная" активность FVIII может быть показана определением бета  $T_{1/2}$  (активность). В другом варианте "более длительная" активность FVIII может быть по уровню антигена FVIII в плазме, например  $\beta T_{1/2}$  (антиген). В других вариантах длительно действующий или стойкий FVIII-полипептид дольше участвует в каскаде коагуляции, например, остаётся активным в течение более долгого периода времени по сравнению с FVIII-полипептидом дикого типа, препаратов REFACTO® или ADVATE®.

Увеличенный период полувыведения длительно действующего фактора свёртывания, например длительно действующий FVIII, может быть достигнут благодаря слиянию с одним или большим количеством полипептидов, не связанных с факторами свёртывания, такими как, например, Fc. Увеличенный период полувыведения может быть достигнут благодаря одной или более модификаций, таких как пэггилирование. Иллюстрационные длительно действующие факторы свёртывания (например, длительно действующие полипептиды FVIII) включают, к примеру, химерные факторы свёртывания (например, химерные полипептиды FVIII, содержащие Fc) и химерные факторы свёртывания, содержащие альбумин (например, химерные полипептиды FVIII, содержащие альбумин). Дополнительные иллюстрационные длительно действующие факторы свёртывания (например, длительно действующие полипептиды FVIII) включают, к примеру, пэггилированные факторы свёртывания (например, пэггилированный FVIII). "Референтный" полипептид, например, в отношении длительно действующего химерного фактора свёртывания (к примеру, длительно действующий химерный FVIII-полипептид), представляет собой полипептид, состоящий, главным образом, из части фактора свёртывания химерного полипептида. Например, в отношении длительно действующего FVIII референтный полипептид является частью FVIII химерного полипептида, к примеру, такой же частью FVIII без Fc-части или без альбуминовой части. Аналогичным образом, референтный полипептид в отношении модифицированного FVIII представляет собой такой же FVIII без модификации, например FVIII без пэггилирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения длительно действующий FVIII при введении субъекту имеет одно или больше следующих характеристик:

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

клиренс (CL) (активность) у упомянутого субъекта составляет около 1,22-5,19 мл/ч/кг или меньше;

$t_{1/2} \beta$  у упомянутого субъекта составляет около 11-26,4 ч;

восстановление показателей (значение K) (наблюдаемая активность) у упомянутого субъекта составляет около 1,38-2,88 МЕ/дл на МЕ/кг;

$V_{SS}$  (активность) у упомянутого субъекта составляет около 37,7-79,4 мл/кг; и

соотношение AUC/доза у упомянутого субъекта составляет 19,2-81,7 МЕ·ч/дл на МЕ/кг.

В некоторых вариантах осуществления изобретения длительно действующий FVIII при введении популяции пациентов имеет одну или больше следующих характеристик:

среднее восстановление показателей (значение K) (наблюдаемая активность) больше 1,38 МЕ/дл на МЕ/кг;

среднее восстановление показателей (значение K) (наблюдаемая активность) по меньшей мере 1,5, по меньшей мере 1,85, по меньшей мере 2,46 МЕ/дл на МЕ/кг;

средний клиренс (CL) (активность) у упомянутой популяции пациентов составляет около  $2,33 \pm 1,08$  мл/ч/кг или меньше;

средний клиренс (CL) (активность) у упомянутой популяции пациентов составляет около 1,8-2,69 мл/час/кг;

средний клиренс (CL) (активность) у упомянутой популяции пациентов, который составляет около 65% клиренса полипептида, содержащего указанный FVIII без модификации;

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

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

среднее MRT (активность) у упомянутой популяции пациентов, который составляет примерно в 1,5 большее время, чем среднее MRT полипептида, содержащего указанный FVIII без модификации;

средний  $t_{1/2} \beta$  (активность) у упомянутой популяции пациентов составляет примерно 18,3-5,79 ч;

средний  $t_{1/2} \beta$  (активность) у упомянутой популяции пациентов, который равен примерно 18-18,4 ч;

средний  $t_{1/2} \beta$  (активность) у упомянутой популяции пациентов, который составляет примерно в 1,5 больший период, чем средний  $t_{1/2} \beta$  полипептида, содержащего указанный FVIII без модификации;

среднее восстановление показателей (значение K) (наблюдаемая активность) у упомянутой популяции пациентов составляет около  $2,01 \pm 0,44$  МЕ/дл на МЕ/кг;

среднее восстановление показателей (значение К) (наблюдаемая активность) у упомянутой популяции пациентов составляет около 1,85-2,46 МЕ/дл на МЕ/кг;

среднее восстановление показателей (значение К) (наблюдаемая активность) у упомянутой популяции пациентов, которое составляет около 90% значения клиренса среднего восстановления показателей полипептида, содержащего указанный FVIII без модификации;

среднее значение  $V_{SS}$  (активность) у упомянутой популяции пациентов составляет примерно 55,1±12,3 мл/кг;

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

среднее значение AUC/доза (активность) у упомянутой популяции пациентов составляет примерно 49,9±18,2 МЕ·ч/дл на МЕ/кг;

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

В других вариантах осуществления изобретения длительно действующий FVIII при введении популяции пациентов имеет одно или больше следующих свойств:

Максимальная наблюдаемая концентрация ( $C_{max\_OBS}$ ) у упомянутого субъекта исследования, принявшего химерный полипептид, сравнима с  $C_{max\_OBS}$  у пациента, принявшего такое же количество полипептида, состоящего из полноразмерного, зрелого FVIII, в условиях измерения концентраций одностадийным (аРТТ) анализом или двустадийным (хромогенным) анализом.

$C_{max\_OBS}$  у упомянутого пациента составляет примерно 60,5 МЕ/дл, 60,5±1 МЕ/дл, примерно 60,5±2 МЕ/дл, примерно 60,5±3 МЕ/дл, примерно 60,5±4 МЕ/дл, примерно 60,5±5 МЕ/дл, примерно 60,5±6 МЕ/дл, примерно 60,5±7 МЕ/дл, примерно 60,5±8 МЕ/дл, примерно 60,5±9 МЕ/дл или примерно 60,5±10 МЕ/дл после введения 25 МЕ/кг химерного полипептида при определении одностадийным (аРТТ) анализом.

$C_{max\_OBS}$  у упомянутого пациента составляет примерно 53,1-69 МЕ/дл после введения 25 МЕ/кг химерного полипептида при определении одностадийным (аРТТ) анализом.

$C_{max\_OBS}$  у упомянутого пациента составляет примерно 119 МЕ/дл, 119±1 МЕ/дл, примерно 119±2 МЕ/дл, примерно 119±3 МЕ/дл, примерно 119±4 МЕ/дл, примерно 119±5 МЕ/дл, примерно 119±6 МЕ/дл, примерно 119±7 МЕ/дл, примерно 119±8 МЕ/дл, примерно 119±9 МЕ/дл, примерно 119±10 МЕ/дл, примерно 119±11 МЕ/дл, примерно 119±12 МЕ/дл, примерно 119±13 МЕ/дл, примерно 119±14 МЕ/дл, примерно 119±15 МЕ/дл, примерно 119±16 МЕ/дл, примерно 119±17 МЕ/дл или примерно 119±18 МЕ/дл после введения 65 МЕ/кг химерного полипептида при определении одностадийным (аРТТ) анализом.

$C_{max\_OBS}$  у упомянутого пациента составляет примерно 103-136 МЕ/дл после введения 65 МЕ/кг химерного полипептида при определении одностадийным (аРТТ) анализом.

$C_{max\_OBS}$  у упомянутого пациента составляет примерно 76,5 МЕ/дл, 76,5±1 МЕ/дл, примерно 76,5±2 МЕ/дл, примерно 76,5±3 МЕ/дл, примерно 76,5±4 МЕ/дл, примерно 76,5±5 МЕ/дл, примерно 76,5±6 МЕ/дл, примерно 76,5±7 МЕ/дл, примерно 76,5±8 МЕ/дл, примерно 76,5±9 МЕ/дл, примерно 76,5±10 МЕ/дл, примерно 76,5±11 МЕ/дл, примерно 76,5±12 МЕ/дл, примерно 76,5±13 МЕ/дл, примерно 76,5±14 МЕ/дл или примерно 76,5±15 МЕ/дл после введения 25 МЕ/кг химерного полипептида при определении двустадийным (хромогенным) анализом.

$C_{max\_OBS}$  у упомянутого пациента составляет примерно 64,9-90,1 МЕ/дл после введения 25 МЕ/кг химерного полипептида при определении двустадийным (хромогенным) анализом.

$C_{max\_OBS}$  у упомянутого пациента составляет примерно 182 МЕ/дл, 182±2 МЕ/дл, примерно 182±4 МЕ/дл, примерно 182±6 МЕ/дл, примерно 182±8 МЕ/дл, примерно 182±10 МЕ/дл, примерно 182±12 МЕ/дл, примерно 182±14 МЕ/дл, примерно 182±16 МЕ/дл, примерно 182±18 МЕ/дл или примерно 182±20 МЕ/дл после введения 65 МЕ/кг химерного полипептида при определении двустадийным (хромогенным) анализом.

$C_{max\_OBS}$  у упомянутого пациента составляет примерно 146-227 МЕ/дл, примерно 146±5 МЕ/дл, примерно 146±10 МЕ/дл, примерно 227±5 МЕ/дл или примерно 146±10 МЕ/дл после введения 65 МЕ/кг химерного полипептида при определении двустадийным (хромогенным) анализом.

В других вариантах осуществления изобретения длительно действующий FVIII при введении популяции пациентов имеет одно или больше следующих характеристик:

$t_{1/2-\beta}$  (активность) у упомянутого субъекта исследования, составляет по меньшей мере в 1,48; 1,49; 1,50; 1,51; 1,52; 1,53; 1,54; 1,55; 1,56; 1,57; 1,58; 1,59; 1,60; 1,61; 1,62; 1,63; 1,64; 1,65; 1,66; 1,67; 1,68; 1,69; 1,70; 1,71; 1,72; 1,73; 1,74; 1,75; 1,76; 1,77; 1,78; 1,79; 1,80; 1,81; 1,82; 1,83; 1,84; 1,85; 1,86; 1,87; 1,88; 1,89 или 1,90 раза больший период времени, чем  $t_{1/2\beta}$  (активность) у пациента; принявшего такое же количество полипептида, состоящего из полноразмерного, зрелого FVIII, в условиях измерения концентраций одностадийным (аРТТ) анализом или двустадийным (хромогенным) анализом.

$t_{1/2-\beta}$  (активность) у упомянутого пациента составляет примерно 18,8 ч, 18,8±1 ч, 18,8±1 ч, 18,8±2 ч, 18,8±3 ч, 18,8±4 ч, 18,8±5 ч, 18,8±6 ч, 18,8±7 ч, 18,8±8 ч, 18,8±9 ч, 18,8±10 ч или 18,8±11 ч при определе-

нии полипептида одностадийным (аРТТ) анализом.

$t_{1/2-\beta}$  (активность) у упомянутого пациента составляет примерно 14,3-24,5 МЕ/дл при определении полипептида одностадийным (аРТТ) анализом.

$t_{1/2-\beta}$  (активность) у упомянутого пациента составляет примерно 16,7 ч, 16,7±1 ч, 16,7±2 ч, 16,7±3 ч, 16,7±4 ч, 16,7±5 ч, 16,7±6 ч, 16,7±7 ч, 16,7±8 ч, 16,7±9 ч, 16,7±10 ч или 16,7±11 ч при определении полипептида двустадийным (хромогенным) анализом.

$t_{1/2-\beta}$  (активность) у упомянутого пациента составляет примерно 13,8-20,1 ч при определении полипептида двустадийным (хромогенным) анализом.

$t_{1/2-\beta}$  (активность) у упомянутого пациента составляет примерно 19,8 ч, 19,8±1 ч, 19,8±2 ч, 19,8±3 ч, 19,8±4 ч, 19,8±5 ч, 19,8±6 ч, 19,8±7 ч, 19,8±8 ч, 19,8±9 ч, 19,8±10 ч или 19,8±11 ч при определении полипептида двустадийным (хромогенным) анализом.

Или  $t_{1/2-\beta}$  (активность) у упомянутого пациента составляет примерно 14,3-27,5 ч при определении полипептида двустадийным (хромогенным) анализом. В других вариантах осуществления изобретения длительно действующий FVIII при введении популяции пациентов имеет одно или больше следующих характеристик.

Клиренс (CL) (активность) у упомянутого субъекта исследования составляет в 0,51; 0,52; 0,53; 0,54; 0,55; 0,56; 0,57; 0,58; 0,59; 0,60; 0,61; 0,62; 0,63; 0,64; 0,65; 0,66; 0,67; 0,68; 0,69 или 0,70 раза больший период времени, чем  $t_{1/2-\beta}$  (активность) у пациента; принявшего такое же количество полипептида, состоящего из полноразмерного, зрелого FVIII, в условиях измерения концентраций одностадийным (аРТТ) анализом или двустадийным (хромогенным) анализом.

Клиренс (CL) (активность) у упомянутого пациента составляет примерно 1,68 мл/ч/кг, 1,68±0,1 мл/ч/кг, 1,68±0,2 мл/ч/кг, 1,68±0,3 мл/ч/кг, 1,68±0,4 мл/ч/кг, 1,68±0,5 мл/ч/кг, 1,68±0,6 мл/ч/кг или 1,68±0,7 мл/ч/кг после введения 25 МЕ/кг химерного полипептида при определении одностадийным (аРТТ) анализом.

Клиренс (CL) (активность) у упомянутого пациента составляет примерно 1,31-2,15 мл/ч/кг после введения 25 МЕ/кг химерного полипептида при определении одностадийным (аРТТ) анализом.

Клиренс (CL) (активность) у упомянутого пациента составляет около 2,32 мл/ч/кг, 2,32±0,1 мл/ч/кг, 2,32±0,2 мл/ч/кг, 2,32±0,3 мл/ч/кг, 2,32±0,4 мл/ч/кг, 2,32±0,5 мл/ч/кг, 2,32±0,6 мл/ч/кг или 2,32±0,7 мл/ч/кг после введения 65 МЕ/кг химерного полипептида при определении одностадийным (аРТТ) анализом.

Клиренс (CL) (активность) у упомянутого пациента составляет около 1,64-3,29 мл/ч/кг после введения 65 МЕ/кг химерного полипептида при определении одностадийным (аРТТ) анализом.

Клиренс (CL) (активность) у упомянутого пациента составляет около 1,49 мл/ч/кг, 1,49±0,1 мл/ч/кг, 1,49±0,2 мл/ч/кг, 1,49±0,3 мл/ч/кг, 1,49±0,4 мл/ч/кг, 1,49±0,5 мл/ч/кг, 1,49±0,6 мл/ч/кг или 1,49±0,7 мл/ч/кг после введения 25 МЕ/кг химерного полипептида при определении двустадийным (хромогенным) анализом.

Клиренс (CL) (активность) у упомянутого пациента составляет около 1,16-1,92 мл/ч/кг после введения 25 МЕ/кг химерного полипептида при определении двустадийным (хромогенным) анализом.

Клиренс (CL) (активность) у упомянутого пациента составляет около 1,52 мл/ч/кг, 1,52±0,1 мл/ч/кг, 1,52±0,2 мл/ч/кг, 1,52±0,3 мл/ч/кг, 1,52±0,4 мл/ч/кг, 1,52±0,5 мл/ч/кг, 1,52±0,6 мл/ч/кг или 1,52±0,7 мл/ч/кг, после введения 65 МЕ/кг химерного полипептида при определении двустадийным (хромогенным) анализом.

Или клиренс (CL) (активность) у упомянутого пациента составляет около 1,05-2,20 мл/ч/кг после введения 65 МЕ/кг химерного полипептида при определении двустадийным (хромогенным) анализом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения длительно действующий FVIII при введении популяции пациентов имеет одно или больше следующих характеристик.

MRT у упомянутого субъекта исследования составляет по меньшей мере в 1,46; 1,47; 1,48; 1,49; 1,50; 1,51; 1,52; 1,53; 1,54; 1,55; 1,56; 1,57; 1,58; 1,59; 1,60; 1,61; 1,62; 1,63; 1,64; 1,65; 1,66; 1,67; 1,68; 1,69; 1,70; 1,71; 1,72; 1,73; 1,74; 1,75; 1,76; 1,77; 1,78; 1,79; 1,80; 1,81; 1,82; 1,83; 1,84; 1,85; 1,86; 1,87; 1,88; 1,89; 1,90; 1,91; 1,92 или 1,93 раза больший период времени, чем MRT у пациента; принявшего такое же количество полипептида, состоящего из полноразмерного зрелого FVIII, в условиях измерения одностадийным (аРТТ) анализом или двустадийным (хромогенным) анализом.

MRT (активность) у упомянутого пациента составляет примерно 27 ч, 27±1 ч, 27±2 ч, 27±3 ч, 27±4 ч, 27±5 ч, 27±6 ч, 27±7 ч, 27±8 ч, 27±9 ч или 27±10 ч при определении активности полипептида одностадийным (аРТТ) анализом.

MRT (активность) у упомянутого пациента составляет примерно 20,6-35,3 ч при определении активности полипептида одностадийным (аРТТ) анализом.

MRT (активность) у упомянутого пациента составляет примерно 23,9-28,5 ч при определении активности полипептида двустадийным (хромогенным) анализом.

MRT (активность) у упомянутого пациента составляет примерно 19,8-28,9 ч при определении ак-

тивности полипептида двустадийным (хромогенным) анализом.

MRT (активность) у упомянутого пациента составляет примерно 20,5-39,6 ч при определении активности полипептида двустадийным (хромогенным) анализом. В других вариантах осуществления изобретения длительно действующий FVIII при введении популяции пациентов имеет одно или больше следующих свойств.

Восстановление показателей у упомянутого субъекта исследования сравнимо с восстановлением показателей у пациента, принявшего такое же количество полипептида, состоящего из полноразмерного зрелого FVIII, в условиях измерения одностадийным (аРТТ) анализом или двустадийным (хромогенным) анализом.

Восстановление показателей у упомянутого пациента составляет около 2,44 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,44±0,1 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,44±0,2 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,44±0,3 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,44±0,4 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,44±0,5 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,44±0,6 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,44±0,7 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,44±0,8 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,44±0,9 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,44±1,0 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,44±1,1 МЕ/дл на МЕ/кг или 2,44±1,2 МЕ/дл на МЕ/кг после введения 25 МЕ/кг химерного полипептида при определении одностадийным (аРТТ) анализом.

Восстановление показателей у упомянутого пациента составляет около 2,12-2,81 МЕ/дл на МЕ/кг после введения 25 МЕ/кг химерного полипептида при определении одностадийным (аРТТ) анализом.

Восстановление показателей у упомянутого пациента составляет около 1,83 МЕ/дл на МЕ/кг, 1,83±0,1 МЕ/дл на МЕ/кг, 1,83±0,2 МЕ/дл на МЕ/кг, 1,83±0,3 МЕ/дл на МЕ/кг, 1,83±0,4 МЕ/дл на МЕ/кг, 1,83±0,5 МЕ/дл на МЕ/кг, 1,83±0,6 МЕ/дл на МЕ/кг, 1,83±0,7 МЕ/дл на МЕ/кг, 1,83±0,8 МЕ/дл на МЕ/кг, 1,83±0,9 МЕ/дл на МЕ/кг, 1,83±1,0 МЕ/дл на МЕ/кг или 1,83±1,1 МЕ/дл на МЕ/кг после введения 65 МЕ/кг химерного полипептида при определении одностадийным (аРТТ) анализом.

Восстановление показателей у упомянутого пациента составляет около 1,59-2,10 МЕ/дл на МЕ/кг после введения 65 МЕ/кг химерного полипептида при определении одностадийным (аРТТ) анализом.

Восстановление показателей у упомянутого пациента составляет около 3,09 МЕ/дл на МЕ/кг, 3,09±0,1 МЕ/дл на МЕ/кг, 3,09±0,2 МЕ/дл на МЕ/кг, 3,09±0,3 МЕ/дл на МЕ/кг, 3,09±0,4 МЕ/дл на МЕ/кг, 3,09±0,5 МЕ/дл на МЕ/кг, 3,09±0,6 МЕ/дл на МЕ/кг, 3,09±0,7 МЕ/дл на МЕ/кг, 3,09±0,8 МЕ/дл на МЕ/кг, 3,09±0,9 МЕ/дл на МЕ/кг, 3,09±1,0 МЕ/дл на МЕ/кг, 3,09±1,1 МЕ/дл на МЕ/кг, 3,09±1,2 МЕ/дл на МЕ/кг или 3,09±1,3 МЕ/дл на МЕ/кг после введения 25 МЕ/кг химерного полипептида при определении двустадийным (хромогенным) анализом.

Восстановление показателей у упомянутого пациента составляет около 2,80 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,80±0,1 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,80±0,2 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,80±0,3 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,80±0,4 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,80±0,5 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,80±0,6 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,80±0,7 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,80±0,8 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,80±0,9 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,80±1,0 МЕ/дл на МЕ/кг, 2,80±1,1 МЕ/дл на МЕ/кг или 2,80±1,2 МЕ/дл на МЕ/кг после введения 65 МЕ/кг химерного полипептида при определении двустадийным (хромогенным) анализом.

Восстановление показателей у упомянутого пациента составляет около 2,61-3,66 МЕ/дл на МЕ/кг после введения 25 МЕ/кг химерного полипептида при определении двустадийным (хромогенным) анализом.

Или восстановление показателей у упомянутого пациента составляет около 2,24-3,50 МЕ/дл на МЕ/кг после введения 65 МЕ/кг химерного полипептида при определении двустадийным (хромогенным) анализом.

В остальных других вариантах осуществления изобретения длительно действующий FVIII при введении популяции пациентов имеет одно или больше следующих свойств.

Значение  $V_{SS}$  (активность) у упомянутого субъекта исследования сравнимо со значением  $V_{SS}$  (активность) у пациента, принявшего такое же количество полипептида, состоящего из полноразмерного зрелого FVIII, в условиях измерения одностадийным (аРТТ) анализом или двустадийным (хромогенным) анализом.

Значение  $V_{SS}$  (активность) у упомянутого пациента составляет примерно 45,5 мл/кг, 45,5±1 мл/кг, 45,5±2 мл/кг, 45,5±3 мл/кг, 45,5±4 мл/кг, 45,5±5 мл/кг, 45,5±6 мл/кг, 45,5±7 мл/кг, 45,5±8 мл/кг, 45,5±9 мл/кг, 45,5±10 мл/кг или примерно 45,5±11 мл/кг после введения 25 МЕ/кг химерного полипептида при его определении одностадийным (аРТТ) анализом.

Значение  $V_{SS}$  (активность) у упомянутого пациента составляет около 39,3-52,5 мл/ч/кг после введения 25 МЕ/кг химерного полипептида при его определении одностадийным (аРТТ) анализом.

Значение  $V_{SS}$  (активность) у упомянутого пациента составляет примерно 62,8 мл/кг, 62,8±1 мл/кг, 62,8±2 мл/кг, 62,8±3 мл/кг, 62,8±4 мл/кг, 62,8±5 мл/кг, 62,8±6 мл/кг, 62,8±7 мл/кг, 62,8±8 мл/кг, 62,8±9 мл/кг, 62,8±10 мл/кг, 62,8±11 мл/кг, 62,8±12 мл/кг, 62,8±13 мл/кг, 62,8±14 мл/кг, 62,8±15 мл/кг или примерно 62,8±16 мл/кг после введения 65 МЕ/кг химерного полипептида при его определении одностадийным (аРТТ) анализом.

Значение  $V_{SS}$  (активность) у упомянутого пациента составляет около 55,2-71,5 мл/ч/кг после введения 65 МЕ/кг химерного полипептида при его определении одностадийным (аРТТ) анализом.

Значение  $V_{SS}$  (активность) у упомянутого пациента составляет примерно 35,9 мл/кг, 35,9±1 мл/кг,

35,9±2 мл/кг, 35,9±3 мл/кг, 35,9±4 мл/кг, 35,9±5 мл/кг, 35,9±6 мл/кг, 35,9±7 мл/кг, 35,9±8 мл/кг, 35,9±9 мл/кг, 35,9±10 мл/кг, 35,9±11 мл/кг, 35,9±12 мл/кг или примерно 35,9±13 мл/кг после введения 25 МЕ/кг химерного полипептида при его определении двустадийным (хромогенным) анализом.

Значение VSS (активность) у упомянутого пациента составляет около 30,4-42,3 мл/кг после введения 25 МЕ/кг химерного полипептида при определении двустадийным (хромогенным) анализом.

Значение VSS (активность) у упомянутого пациента составляет примерно 43,4 мл/кг, 43,4±1 мл/кг, 43,4±2 мл/кг, 43,4±3 мл/кг, 43,4±4 мл/кг, 43,4±5 мл/кг, 43,4±6 мл/кг, 43,4±7 мл/кг, 43,4±8 мл/кг, 43,4±9 мл/кг, 43,4±10 мл/кг, 43,4±11 мл/кг, 43,4±12 мл/кг, 43,4±13 мл/кг, 43,4±14 мл/кг, 43,4±15 мл/кг или 43,4±16 мл/кг после введения 65 МЕ/кг химерного полипептида при его определении двустадийным (хромогенным) анализом.

Или значение VSS (активность) у упомянутого пациента составляет около 38,2-49,2 мл/кг после введения 65 МЕ/кг химерного полипептида при определении двустадийным (хромогенным) анализом.

В дополняющих других вариантах осуществления изобретения длительно действующий FVIII при введении популяции пациентов имеет одно или больше следующих свойств:

Значение AUC<sub>INF</sub> (AUC при инфузионном введении) у упомянутого субъекта исследования составляет по меньшей мере в 1,45; 1,46; 1,47; 1,48; 1,49; 1,50; 1,51; 1,52; 1,53; 1,54; 1,55; 1,56; 1,57; 1,58; 1,59; 1,60; 1,61; 1,62; 1,63; 1,64; 1,65; 1,66; 1,67; 1,68; 1,69; 1,70; 1,71; 1,72; 1,73; 1,74; 1,75; 1,76; 1,77; 1,78; 1,79; 1,80; 1,81; 1,82; 1,83; 1,84; 1,85; 1,86; 1,87; 1,88; 1,89; 1,90 раз больший период времени, чем значение AUC<sub>INF</sub> у пациента, принявшего такое же количество полипептида, состоящего из полноразмерного зрелого FVIII, в условиях измерения одностадийным (аРТТ) анализом или двустадийным (хромогенным) анализом.

Значение AUC<sub>INF</sub> упомянутого пациента составляет около 1440±316 ч·МЕ/дл на МЕ/кг после введения 25 МЕ/кг химерного полипептида при определении одностадийным (аРТТ) анализом.

Значение AUC<sub>INF</sub> упомянутого пациента составляет около 1160 - 1880 ч·МЕ/дл на МЕ/кг после введения 25 МЕ/кг химерного полипептида при определении одностадийным (аРТТ) анализом.

Значение AUC<sub>INF</sub> у упомянутого пациента составляет примерно 1480 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 1480±100 час·МЕ/дл на МЕ/кг, 1480±200 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 1480±300 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 1480±400 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 1480±500 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 1480±600 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 1480±700 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 1480±800 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 1480±900 ч·МЕ/дл на МЕ/кг или 1480±1000 ч·МЕ/дл на МЕ/кг после введения 25 МЕ/кг химерного полипептида при определении одностадийным (аРТТ) анализом.

Значение AUC<sub>INF</sub> у упомянутого пациента составляет около 2910±1320 ч·МЕ/дл на МЕ/кг после введения 65 МЕ/кг химерного полипептида при определении одностадийным (аРТТ) анализом.

Значение AUC<sub>INF</sub> у упомянутого пациента составляет примерно 1980±3970 ч·МЕ/дл на МЕ/кг после введения 65 МЕ/кг химерного полипептида при определении одностадийным (аРТТ) анализом.

Значение AUC<sub>INF</sub> у упомянутого пациента составляет примерно 2800 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 2800±100 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 2800±200 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 2800±300 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 2800±400 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 2800±500 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 2800±600 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 2800±700 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 2800±800 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 2800±900 ч·МЕ/дл на МЕ/кг или 2800±1000 ч·МЕ/дл на МЕ/кг после введения 65 МЕ/кг химерного полипептида при определении одностадийным (аРТТ) анализом.

Значение AUC<sub>INF</sub> у упомянутого пациента составляет примерно 1660 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 1660±100 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 1660±200 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 1660±300 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 1660±400 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 1660±500 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 1660±600 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 1660±700 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 1660±800 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 1660±900 ч·МЕ/дл на МЕ/кг или 1660±1000 ч·МЕ/дл на МЕ/кг после введения 25 МЕ/кг химерного полипептида при определении двустадийным (хромогенным) анализом.

Значение AUC<sub>INF</sub> у упомянутого пациента составляет около 1300-2120 ч·МЕ/дл на МЕ/кг после введения 25 МЕ/кг химерного полипептида при определении одностадийным (хромогенным) анализом.

Значение AUC<sub>INF</sub> у упомянутого пациента составляет примерно 4280 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 4280±100 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 4280±200 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 4280±300 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 4280±400 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 4280±500 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 4280±600 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 4280±700 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 4280±800 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 4280±900 ч·МЕ/дл на МЕ/кг, 4280±1000 ч·МЕ/дл, 4280±1100 ч·МЕ/дл, 4280±1200 ч·МЕ/дл, 4280±1300 ч·МЕ/дл, 4280±1400 ч·МЕ/дл, 4280±1500 ч·МЕ/дл или 4280±1600 ч·МЕ/дл на МЕ/кг после введения 65 МЕ/кг химерного полипептида при определении двустадийным (хромогенным) анализом.

Или значение AUC<sub>INF</sub> у упомянутого пациента составляет около 2960-6190 ч·МЕ/дл на МЕ/кг после введения 65 МЕ/кг химерного полипептида при определении одностадийным (хромогенным) анализом.

"Лечение по требованию" используется в этой заявке в значении лечения, которое, как предполагается, осуществляют в течение короткого периода времени и в ответ на существующее состояние, такое как эпизод кровотечения или при возникшей необходимости, такой как запланированное хирургическое вмешательство. Термины "лечение по требованию" и "эпизодическое лечение" используются взаимозаменяемо. Состояния, при которых может потребоваться лечение по требованию (эпизодическое лечение),

к примеру, такие: кровотечение вследствие нарушения коагуляции, гемартроз, кровотечение в мышечной ткани, кровотечение в ротовой полости, кровоизлияние, кровоизлияние в мышечной ткани, кровоизлияние в ротовой полости, последствие травмы, травма головы, гастроинтестинальное кровотечение, внутричерепное кровоизлияние, внутрибрюшное кровоизлияние, внутригрудное кровоизлияние, переломы костей, кровотечение в пределах центральной нервной системы, кровотечение в заглоточной области, кровотечение в забрюшинной области или кровотечение в области окружения мышц иллиопсоас. Пациент может нуждаться в хирургическом профилактическом вмешательстве, периоперативном управлении или лечении перед хирургической операцией. Такие оперативные вмешательства включают, к примеру: малое хирургическое вмешательство, обширное оперативное вмешательство, удаление зубов, удаление миндалин, удаление паховых грыж, синовэктомию, полную замену коленного соединения, трепанацию черепа, остеосинтез, хирургическое лечение травм, внутричерепное хирургическое вмешательство, внутрибрюшное хирургическое вмешательство, внутригрудное хирургическое вмешательство или операции по замене суставов.

В одном варианте осуществления изобретения лечение по требованию (эпизодическое) при однократном введении дозы препарата предотвращается 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% случаев кровотечений. В другом варианте осуществления изобретения 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% эпизодов кровотечений после получения лечения по требованию (эпизодического лечения) оцениваются докторами в отношении результатов лечения как отличные или хорошие. В остальных вариантах 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 после получения лечения по требованию (эпизодического лечения) оцениваются докторами в отношении результатов лечения как удовлетворительные.

"Полипептид", "пептид" и "белок" используются как взаимозаменяемые в отношении полимерного вещества, состоящего из ковалентно-связанных аминокислотных остатков.

"Полинуклеотид" и "нуклеиновая кислота" используются как взаимозаменяемые термины в отношении полимерного вещества, состоящего из ковалентно-связанных нуклеотидных остатков. Полинуклеотидами могут быть ДНК, кДНК, РНК, одноцепочечные или двухцепочечные молекулы, векторы, плазмиды, фаги или вирусы. Полинуклеотиды включают, например, описанные в табл. 1, которые кодируют полипептиды из табл. 2 (см. табл. 1). Полинуклеотиды включают также, например, фрагменты полинуклеотидов табл. 1, которые, например, кодируют фрагменты полипептидов из табл. 2, такие как FVIII, Fc, сигнальную последовательность, 6Гис- и другие фрагменты полипептидов табл. 2.

"Профилактическое лечение" используется в этой заявке для обозначения введения полипептида FVIII для субъекта в многократных дозах в течение периода времени для того, чтобы увеличить уровень активности FVIII в плазме крови субъекта. Увеличение уровня может быть достаточным для снижения случаев спонтанного возникновения кровотечения или предотвращения кровотечения, например, в случае непредвиденного повреждения. Во время профилактического лечения уровень белка в плазме пациента может снизиться ниже исходного значения уровня для этого пациента или быть ниже уровня FVIII, который характерен для тяжёлого заболевания гемофилией (<1 МЕ/дл - наблюдается у 1% больных).

В одном варианте осуществления изобретения схема профилактики "подбирается" для каждого пациента, например, путём определения для каждого пациента данных фармакокинетики (PK) и введения FVIII данного изобретения в таком интервале дозирования, который обеспечит минимальный уровень 1-3% активности FVIII. Могут проводиться корректировки, когда с пациентом происходят неприемлемые случаи возникновения кровотечения, определяемые как  $\geq 2$  спонтанных эпизодов кровотечения в течение непрерывного двухмесячного периода. В этом случае корректировка дозы будет направлена на изменение минимальных уровней активности до 3-5%. В другом варианте профилактическое лечение направлено на предотвращение и контроль возникновения кровотечений, долговременный контроль кровотечений, долговременную защиту против появления кровотечений и/или на долговременную пользу. Профилактика, например долговременная защита, может быть продемонстрирована путём увеличения AUC до последней измеряемой временной точки (AUC-LAST) и пониженного клиренса, что приводит к увеличению  $t_{1/2}$  по сравнению с FVIII с коротким периодом действия. Профилактика может быть продемонстрирована путём улучшения значений  $C_{max}$ , и  $T_{max}$  и/или большим средним временем удержания препарата по сравнению с FVIII быстрого действия. В некоторых вариантах в результате профилактики не было отмечено спонтанных эпизодов кровотечений в пределах 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) после введения препарата (например, последней инъекции). В некоторых вариантах профилактика приводит к повышению более чем на 30% (например, более чем на 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%, например более чем на 50%) среднего снижения среднегодовых эпизодов кровотечения при введении доз препарата раз в неделю (например, при дозе 65 МЕ/кг).

"Субъект" используется в этой заявке в значении человеческого индивидуума. Субъект может быть пациентом, который в данный момент страдает нарушением свёртываемости крови или ожидаемо нуждается в таком лечении. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект ранее никогда не подвергался лечению с помощью фактора свёртывания крови (например, субъект являлся ранее не лечившимся субъектом или ранее не лечившимся пациентом). В некоторых вариантах субъект представлял собой плод, и способы лечения включали введение химерного полипептида матери этого плода, и введение субъекту происходило через плаценту от матери. В некоторых вариантах субъектом является ребёнок или взрослый. В некоторых вариантах пациентом является ребёнок возрастом младше одного года, младше двух лет, младше двух лет, младше трёх лет, младше четырёх лет, младше пяти лет, младше шести лет, младше семи лет, младше восьми лет, младше девяти лет, младше десяти лет, младше одиннадцати лет или младше двенадцати лет. В некоторых вариантах возраст ребёнка был меньше одного года. В некоторых вариантах осуществления изобретения у ребёнка и взрослого развивалось нарушение свёртывания крови, тогда как проявление симптомов нарушения свёртывания крови появилось в возрасте более одного года. В некоторых вариантах химерный полипептид вводится субъекту в количестве, достаточном для предотвращения, ингибирования или снижения развития иммунного ответа, выявляющемся в виде гуморального иммунного ответа, клеточно-опосредованного иммунного ответа или обоих гуморального и клеточно-опосредованного иммунных ответов к фактору свёртывания крови.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанных в этой заявке, у пациента существует риск развития ингибирующего иммунного ответа к FVIII. У субъекта может существовать риск развития ингибирующего иммунного ответа к FVIII, например, из-за того, что у субъекта ранее развился ингибирующий иммунный ответ к FVIII или в данное время существует ингибирующий иммунный ответ к FVIII. В некоторых вариантах у субъекта развился ингибирующий иммунный ответ к FVIII после лечения с помощью препаратов FVIII, полученных из плазмы крови. В некоторых вариантах у субъекта развился ингибирующий иммунный ответ к FVIII после лечения с помощью рекомбинантных препаратов FVIII. В некоторых вариантах у субъекта развился ингибирующий иммунный ответ к FVIII после лечения с помощью полноразмерных белков FVIII. В некоторых вариантах у субъекта развился ингибирующий иммунный ответ к FVIII после лечения с помощью белков FVIII, содержащих делеции последовательности, например, полную или частичную делецию В-домена.

В некоторых вариантах осуществления изобретения у пациента развился ингибирующий иммунный ответ к FVIII после лечения с помощью препаратов FVIII, выбранных из группы: ADVATE®, RECOMBINATE®, KOGENATE FS®, HELIXATE FS®, XYNTHA®/REFACTO AB®, HEMOFIL-M®, MONARC-M®, MONOCLATE-P®, HUMATE-P®, ALPHANATE®, KOATE-DVI® или HYATE:C®.

В некоторых вариантах иммунный ответ после лечения с помощью фактора свёртывания крови, например FVIII, включает выработку ингибирующих антител к этому фактору свёртывания. В некоторых вариантах концентрация ингибирующих антител составляет по меньшей мере 0,6 единицам Бетесды (БЕ). В некоторых вариантах концентрация ингибирующих антител составляет по меньшей мере 5 БЕ. В некоторых вариантах осуществления изобретения концентрация ингибирующих антител составляет по меньшей мере 0,5, по меньшей мере 0,6, по меньшей мере 0,7, по меньшей мере 0,8, по меньшей мере 0,9, по меньшей мере 1,0, по меньшей мере 1,5, по меньшей мере 2,0, по меньшей мере 3,0, по меньшей мере 4,0, по меньшей мере 5,0, по меньшей мере 6,0, по меньшей мере 7,0, по меньшей мере 8,0, по меньшей мере 9,0 или по меньшей мере 10,0 БЕ.

В некоторых вариантах иммунный ответ после лечения с помощью фактора свёртывания крови, например FVIII, включает клеточно-опосредованный иммунный ответ. В некоторых вариантах иммунный ответ включает клеточно-опосредованный иммунный ответ. Клеточно-опосредованный иммунный ответ может включать высвобождение цитокинов, выбранных из группы, состоящей из IL-12, IL-4 и TNF- $\alpha$ . В некоторых вариантах осуществления изобретения иммунный ответ после лечения с помощью фактора свёртывания крови, например FVIII, включает клинический симптом, выбранный из группы, состоящей из увеличения тенденции кровотечений, высокой степени использования фактора свёртывания, недостаточного ответа на терапию с помощью фактора свёртывания, снижения эффективности терапии с помощью фактора свёртывания и/или сокращения периода полувыведения фактора свёртывания. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект несёт мутацию или делецию в гене фактора свёртывания крови. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект несёт перестройку гена фактора свёртывания крови. В некоторых вариантах осуществления изобретения пациенты страдают серьёзной формой гемофилии. В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъектов есть родственники,

у которых ранее развился ингибирующий иммунный ответ к фактору свёртывания крови. В некоторых вариантах пациент получает терапию препаратами интерферонов. В некоторых вариантах пациент получает терапию противовирусными препаратами.

В некоторых вариантах у пациента с риском кровотечений ранее развился ингибирующий иммунный ответ к терапевтическому протеину, отличному от FVIII. В дополнение к этому, у субъекта может также существовать риск развития ингибирующего иммунного ответа к FVIII как результат влияния нескольких факторов внешней среды или генетических факторов, которые увеличивают вероятность развития ингибирующего иммунного ответа. Известны факторы, увеличивающие вероятность того, что у пациента возникнет ингибирующий иммунный ответ. См. к примеру статью Kasper C. "Diagnosis and Management of Inhibitors to Factors VIII and IX - An Introductory Discussion for Physicians," *Treatment of Hemophilia* 34 (2004), содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. Например, ингибиторы чаще образуются в случае серьёзного заболевания гемофилией (например, исходный уровень FVIII менее 1%), чем в случае лёгкого или среднего заболевания. См. отчёт Report of Expert Meeting on FVIII Products and Inhibitor Development, European Medicines Agency (February 28, 2006-March 2, 2006), содержание которого полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Результатом наличия генетических факторов может быть увеличение вероятности того, что у субъекта возникнет ингибирующий иммунный ответ, для пациента по крайней мере с одним членом семьи (например, брат или сестра, родитель, ребёнок, прауродитель, тётя, дядя или двоюродный родственник), у которого развился ингибирующий иммунный ответ к FVIII или другому терапевтическому протеину, может существовать риск развития ингибирующего иммунного ответа к FVIII. Ингибиторы обычно встречаются у пациентов с генетическими мутациями, которые предотвращают экспрессию FVIII, такие как большие генетические делеции, нонсенс-мутации, вызывающие образование стоп-кодонов и большие инверсии гена FVIII. Поэтому в некоторых вариантах субъект с риском развития ингибирующего иммунного ответа к FVIII несёт мутацию, делецию или перестройку в гене FVIII. В некоторых вариантах субъект с риском развития ингибирующего иммунного ответа к FVIII несёт мутацию в последовательности FVIII, которая предотвращает связывание FVIII с Т-клетками. Наблюдалось существование связи появления ингибиторов с большими перестройками генов FVIII. См. статью Astermark и др., *Blood* 107:3167-3172 (2006), содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. Таким образом, в некоторых вариантах белок слияния FVIII-Fc вводится субъекту с большими перестройками гена FVIII, например инверсия интрона 22 или инверсия интрона 1. В некоторых вариантах FVIII-Fc вводится субъекту с двумя большими перестройками гена FVIII. Наблюдалось также существование связи появления ингибиторов с нуль-мутациями. Astermark и др., *Blood* 108:3739-3745 (2006). Таким образом, в некоторых вариантах белок слияния FVIII-Fc вводится субъекту с нуль-мутацией.

Ингибиторы также чаще встречаются после лечения экзогенными факторами свёртывания крови всего лишь после нескольких случаев введения. Поэтому в некоторых вариантах субъекты с риском развития ингибирующего иммунного ответа получали лечение менее чем 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10 или 5 дней. В некоторых вариантах субъекты с риском развития ингибирующего иммунного ответа ранее не получали FVIII.

В некоторых вариантах субъектом является внутриутробный плод. Иммунная толерантность может индуцироваться у плода путем введения матери плода химерного полипептида, содержащего FVIII-часть и часть Fc.

Ингибиторы также чаще появляются у потомков чёрных африканцев. См., к примеру, статью Kasper C. "Diagnosis and Management of Inhibitors to Factors VIII and IX - An Introductory Discussion for Physicians," *Treatment of Hemophilia* 34 (2004), содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. Поэтому в некоторых вариантах осуществления изобретения субъект с риском развития ингибирующего иммунного ответа является чёрным африканцем.

Генетические мутации в генах, отличных от FVIII, также были связаны с повышением риска развития ингибирующего иммунного ответа. Например, полиморфизм TNF- $\alpha$ -308G>A на участке Nap2, который связан с повышением уровня конститутивной и индуцибельной транскрипции фактора TNF и связан с возрастанием риска развития ингибирующего иммунного ответа. См. статью Astermark и др., *Blood* 108: 3739-3745 (2006), содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. Поэтому в некоторых вариантах осуществления изобретения субъект с риском развития ингибирующего иммунного ответа обладает генетическим полиморфизмом с повышенным синтезом TNF- $\alpha$ . В некоторых вариантах полиморфизм является фактором TNF- $\alpha$ -308G>A. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект с риском развития ингибирующего иммунного ответа обладает генетическим полиморфизмом гена IL10, например полиморфизм, связанный с повышенной секрецией IL10. В некоторых вариантах FVIII-Fc вводится для лечения субъекта с микросателлитом IL10G на участке промотора аллели 134 гена IL10. См. статью Astermark и др. *Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Biology* 108: 3739-3745 (2006), содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

Поэтому в некоторых вариантах осуществления изобретения субъект с риском развития ингиби-

рующего иммунного ответа обладает генетическим полиморфизмом, связанным со снижением экспрессии CTLA-4 (цитотоксичным антигеном-4 Т-лимфоцитов). В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект с риском развития ингибирующего иммунного ответа несёт мутацию DR15 (HLA-DR15) или DQB0602 молекул МНС (главного комплекса гистосовместимости) II класса. Другие варианты молекул МНС II класса, связанные с развитием ингибирующего иммунного ответа у пациентов с гемофилией: A3, B7, C7, DQA0102, C2, DQA0103, DQB0603 и DR13 (см. *Inhibitors in Patients with Hemophilia*, E.C. Rodriguez-Merchan & C.A. Lee, Eds., Blackwell Science, Ltd, 2002).

В некоторых вариантах осуществления изобретения пациент с риском развития ингибирующего иммунного ответа ранее не получал факторов свёртывания, к примеру FVIII. В некоторых вариантах пациент с риском развития ингибирующего иммунного ответа к факторам, например FVIII, получал препараты FVIII. В некоторых вариантах пациенты с риском развития ингибирующего иммунного ответа к фактору свёртывания, к примеру FVIII, принимали препараты FVIII менее 150, менее 50 или менее 20 дней лечения. В некоторых вариантах субъект принимал лечение с помощью фактора свёртывания по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 дней. В некоторых вариантах субъект принимал лечение с помощью фактора свёртывания по меньшей мере 25, 30, 35, 40, 45 или 50 дней. В некоторых вариантах субъект принимал лечение с помощью фактора свёртывания по меньшей мере 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 или 150 дней.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибирующий иммунный ответ представлял собой ингибирующий иммунный ответ к FVIII. В некоторых вариантах осуществления изобретения развился ингибирующий иммунный ответ к препарату FVIII, выбранному из группы, состоящей из препаратов: ADVATE®, RECOMBINATE®, KOGENATE FS®, HELIXATE FS®, XYNTHA®/REFACTO AB®, HEMOFIL-M®, MONARC-M®, MONOCLATE-P®, HUMATE-P®, ALPHANATE®, KOATE-DVI® или NYATE:C®. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибирующий иммунный ответ представлял собой ингибирующий иммунный ответ к FVIII, возникший в ответ на введение рекомбинантного препарата FVIII.

В некоторых вариантах субъект с риском развития ингибирующего иммунного ответа получает или недавно получал иммуностимулирующую терапию. Например, сообщали о наличии ингибиторов у ВИЧ-позитивных пациентов с гемофилией А, подвергавшихся лечению препаратами интерферонов, а также у ВИЧ-позитивных пациентов с гемофилией А с воспалительным синдромом восстановления иммунитета, связанного с антиретровирусной терапией. См. отчёт Report of Expert Meeting on FVIII Products and Inhibitor Development, European Medicines Agency (February 28, 2006-March 2, 2006), содержание которого полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. Поэтому в некоторых вариантах осуществления изобретения субъект с риском развития ингибирующего иммунного ответа принимал терапию с помощью препаратов интерферонов. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъект с риском развития ингибирующего иммунного ответа страдал от воспалительного синдрома восстановления иммунитета и принимал антиретровирусную терапию. Ингибирующий иммунный ответ к FVIII определялся по клиническим реакциям при лечении препаратами FVIII. Известны и описаны клинические проявления ингибиторов FVIII, например, см. статью Kasper C. "Diagnosis and Management of Inhibitors to Factors VIII and IX - An Introductory Discussion for Physicians," *Treatment of Hemophilia* 34 (2004), содержание которой полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки. Например, присутствие в крови ингибиторов делает сложным контролирование кровотечений, так как иммунные реакции к FVIII отмечаются по увеличению тенденции кровотечений, высокому уровню использования FVIII, недостаточному ответу на терапию с помощью FVIII, снижению эффективности терапии с помощью FVIII и/или сокращению периода полувыведения FVIII.

Ингибирующие иммунные реакции к FVIII могут также быть определены лабораторными анализами, такими как Бетесда-тест или модификацией Неймеген Бетесда-теста. Величина уровня ингибиторов по крайней мере 0,6 единиц Бетесды (БЕ) может указывать на наличие ингибирующего иммунного ответа. Величина уровня по крайней мере 5 БЕ может указывать на наличие высокого титра ингибитора. Могут также использоваться измерения в условиях *in vivo* восстановления показателей и периода полувыведения при болюсном инфузионном введении препарата FVIII. В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъекта с риском развития ингибирующего иммунного ответа ранее был обнаружен ингибирующий иммунный ответ с пиковым титром, по меньшей мере 0,5, по меньшей мере 0,6, по меньшей мере 0,7, по меньшей мере 0,8, по меньшей мере 0,9, по меньшей мере 1,0, по меньшей мере 1,5, по меньшей мере 2,0, по меньшей мере 3,0, по меньшей мере 4,0, по меньшей мере 5,0, по меньшей мере 6,0, по меньшей мере 7,0, по меньшей мере 8,0, по меньшей мере 9,0 или по меньшей мере 10,0 БЕ.

В некоторых предлагаемых в этой заявке вариантах способы лечения включают определение ингибирующего FVIII иммунного ответа и введение субъекту химерного полипептида, содержащего FVIII-часть и часть Fc, если у субъекта имеется риск развития ингибирующего иммунного ответа. Поэтому в некоторых вариантах способы лечения включают определение того, есть ли у субъекта мутация, делеция или перестройка в гене FVIII, и введение химерного полипептида, если такие изменения есть. В некоторых вариантах способы лечения включают определение того, образуются ли у субъекта белки FVIII, и

введение химерного полипептида, если в организме субъекта не синтезируются такие белки. В некоторых вариантах способы лечения включают определение того, поражён ли субъект лёгкой, умеренной или серьёзной формой гемофилии, и введении химерного полипептида, если субъект болен серьёзной формой. В некоторых вариантах способы лечения включают определение того, проявляется ли у субъекта ингибирующий FVIII иммунный ответ, например, путём оценки клинических проявлений иммунного ответа измерением титров, уровней или активности антител к FVIII или измерением клеточно-опосредованного иммунного ответа (к примеру, измерением уровней цитокинов), и введение химерного полипептида, если у субъекта есть по крайней мере одно из этих показаний.

"Терапевтическая доза" используется в этой заявке для обозначения дозы, введение которой достигает терапевтического эффекта, описанного в этой заявке. Расчёт требуемой дозировки FVIII базируется на эмпирическом результате того, что в среднем 1 МЕ FVIII на килограмм массы тела повышает активность FVIII в плазме крови приблизительно на 2 МЕ/дл. Требуемая дозировка определяется с использованием следующей формулы:

$$\text{Требуемые единицы} = \text{масса тела (кг)} \times \text{желаемое повышение FVIII (МЕ/дл или \% от нормальной активности)} \times 0,5 \text{ (МЕ/кг на МЕ/дл)}$$

Терапевтические дозы, которые могут использоваться в способах лечения настоящего изобретения, составляют примерно 10-100 МЕ/кг, более определённо 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90 или 90-100 МЕ/кг и более определённо 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 использоваться в способах лечения настоящего изобретения составляют от около 10 до около 150 МЕ/кг, более определённо около 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150 МЕ/кг и более определённо 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 или 150 МЕ/кг.

"Вариант" используется в этой заявке относительно обозначения полинуклеотида или полипептида, отличающихся от исходных полинуклеотида или полипептида, но сохраняющих их значимые свойства, например коагулирующую активность FVIII или активность Fc (связывание с рецептором FcRn). Как правило, варианты в основном обладают полным подобием и по многим участкам идентичны исходному полинуклеотиду или полипептиду. Варианты, к примеру, включают полинуклеотидные фрагменты, делеции, инсерции и модифицированные версии исходных полипептидов.

Полинуклеотидные варианты могут содержать или, в другом случае, состоять из нуклеотидной последовательности, которая по меньшей мере на 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична, например, нуклеотидным кодирующим последовательностям SEQ ID № 1, 3 или 5 (FVIII-часть, Fc-часть, по отдельности или вместе) или комплементарным им цепям; нуклеотидным кодирующим последовательностям известных мутантных и рекомбинантных FVIII и Fc, таким как разглашённые в публикациях и патентах, цитируемые в этой заявке, или их комплементарным цепям, нуклеотидным последовательностям, кодирующим полипептиды SEQ ID № 2, 4 или 6 (FVIII-часть, Fc-часть, по отдельности или вместе) и/или полинуклеотидным фрагментам каким-либо из этих молекул нуклеиновых кислот (например, тех фрагментов, которые описаны в этой заявке). Полинуклеотиды, которые гибридизируются с такими молекулами нуклеиновых кислот в строгих условиях гибридизации или менее строгих условиях, также включают как варианты, так и полипептиды, кодируемые такими полинуклеотидами, поскольку они являются функциональными.

Полинуклеотидные варианты могут содержать или, в другом случае, состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична, например, полипептидным кодирующим последовательностям SEQ ID № 2, 4 или 6 (FVIII-часть, Fc-часть, по отдельности или вместе) и/или полинуклеотидным фрагментам каким-либо из этих полипептидов (например, тех фрагментов, которые описаны в этой заявке).

В отношении нуклеиновой кислоты, обладающей нуклеотидной последовательностью по меньшей мере, например, на 95% "идентичной" референтной нуклеотидной последовательности, подразумевается, что эта нуклеотидная последовательность нуклеиновой кислоты является идентичной референтной последовательности за исключением тех случаев, что нуклеотидная последовательность может включать до пяти точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов референтной нуклеотидной последовательности. Другими словами, для получения нуклеиновой кислоты, обладающей нуклеотидной последовательностью по крайней мере на 95% идентичной референтной нуклеотидной последовательности до 5% нуклеотидов этой референтной последовательности может быть заменено или удалено другими нуклеотидами или количество нуклеотидов до 5% от общего количества нуклеотидов референтной последовательности должно быть введено в эту референтную последовательность. Запрашиваемая последовательность может быть, к примеру, полной последовательностью, показанной как SEQ ID № 1 или 3, открытой рамкой считывания (ORF) или каким-либо определённым фрагментом, описанным в этой заявке. С практической точки зрения то, что какая-то определённая молекула нуклеиновой кислоты или полипептид по меньшей мере на 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична нуклеотидной последовательности или полипептиду настоящего изобретения может быть определено обычным способом с использованием известных компьютерных программ. В одном варианте изобретения способ определения наилучшего полного

соответствия между запрашиваемой последовательностью (референтной или исходной последовательностью) и исследуемой последовательностью, также известное как полное выравнивание последовательностей, может быть определено с использованием компьютерной программы FASTDB, основанной на работе алгоритма авторов статьи Brutlag и др., *Comp. App. Biosci.* 6:237-245 (1990), содержание которой полностью включено в эту заявку посредством ссылки. При выравнивании последовательностей обе последовательности запрашиваемая и исследуемая являются ДНК-последовательностями. РНК-последовательность можно сравнивать, заменяя нуклеотиды У на Т. Результат полного выравнивания последовательностей представляют в процентах идентичности. В другом варианте изобретения параметры, используемые при ДНК-выравнивании последовательностей в программе FASTDB для расчёта процента идентичности такие: Матрица=Унитарная, k-мерность=4, Ошибка несовпадения=1, Ошибка связывания=30, Длина группы рандомизации=0, Счёт отсекаания=1, Ошибка промежутка=5, Ошибка размера промежутка 0,05, Размер окна=500 или длина исследуемой нуклеотидной последовательности, которая может быть короче.

Если исследуемая последовательность короче, чем запрашиваемая последовательность из-за 5'- или 3'-делеций, но не из-за внутренних делеций, то для получения результатов необходимо провести коррекцию в ручном режиме. Это необходимо потому, что программа FASTDB не учитывает 5'- и 3'-усечения исследуемой последовательности при расчёте процента идентичности. Для исследуемой последовательности, усечённой с 5'- и 3'-концов, подобной запрашиваемой последовательности, процент идентичности корректируется путём расчёта количества оснований запрашиваемой последовательности, что находятся в пределах 5'- и 3'-концов исследуемой последовательности, которые не совпадают/не выравниваются, как процент общего количества оснований запрашиваемой последовательности. Если же нуклеотидная последовательность совпадает/выравнивается, то это определяется по результатам выравнивания последовательности в программе FASTDB. Это процентное значение потом отнимается от процента идентичности, рассчитанного выше программой FASTDB, используя специальные параметры для получения финального значения процента идентичности. Это скорректированное значение является тем, что используется в целях настоящего изобретения. В целях корректировки значения процента идентичности в ручном режиме рассчитываются только основания за пределами 5'- и 3'-концов исследуемой последовательности, что отображаются при выравнивании в программе FASTDB, которые не совпадают/не выравниваются с запрашиваемой последовательностью.

Например, исследуемая последовательность длиной 90 оснований для определения процента идентичности выравнивается с запрашиваемой последовательностью длиной 100 оснований. Делеции встречаются на 5'-конце исследуемой последовательности и поэтому при выравнивании программой FASTDB не будет отмечаться совпадение/выравнивание первых 10 оснований 5'-конца. 10 неспаренных оснований представляют 10% последовательности (количество оснований на 5'- и 3'-концах не совпадают/не равны общему числу оснований запрашиваемой последовательности), таким образом, 10% отнимается от значения процента идентичности, рассчитанного программой FASTDB. Если оставшиеся 90 оснований совершенно совпали, то финального значения процента идентичности было бы 90%. В другом примере, исследуемая последовательность длиной 90 оснований сравнивается с запрашиваемой последовательностью длиной 100 оснований. В этот раз делеции являются внутренними так, что нет оснований на 5'- или 3'-концах исследуемой последовательности, которые не совпадают/не выравниваются с запрашиваемой последовательностью. В этом случае процент идентичности, рассчитанный программой FASTDB не корректируется вручную. И ещё раз, только основания 5'- и 3'-концов исследуемой последовательности, которые не совпадают/не выравниваются с запрашиваемой последовательностью, учитываются для ручной корректировки. В целях настоящего изобретения никакие другие корректировки в ручном режиме не производятся.

В полипептиде, обладающем аминокислотной последовательностью, по меньшей мере, например, на 95% "идентичной" запрашиваемой аминокислотной последовательности настоящего изобретения, подразумевается, что аминокислотная последовательность рассматриваемого полипептида является идентичной запрашиваемой последовательности за исключением того, что рассматриваемая последовательность может включать до пяти аминокислотных изменений на каждые 100 аминокислот запрашиваемой аминокислотной последовательности. Другими словами, для получения полипептида, обладающего аминокислотной последовательностью по крайней мере на 95% идентичной запрашиваемой аминокислотной последовательности до 5% аминокислотных остатков этой запрашиваемой последовательности может быть изменено (вставками), удалено или замещено другими аминокислотами. Эти изменения референтной последовательности могут происходить в амино- или карбокси-терминальных положениях референтной аминокислотной последовательности или где-либо между этими терминальными последовательностями, рассеяно или размещено по отдельности среди остатков референтной последовательности или в одной или более непрерывных групп референтной последовательности.

С практической точки зрения, какой-либо определённый полипептид по меньшей мере на 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичный, например, аминокислотным последовательностям SEQ ID № 2 (FVIII-части, Fc-части, по отдельности и вместе) или № 4 или известные полипептидные последовательности FVIII или Fc, может быть определён обычным способом с использованием известных компьютерных

программ. В одном варианте изобретения способ определения наилучшего полного соответствия между запрашиваемой последовательностью (референтной или исходной последовательностью) и исследуемой последовательностью, также известное как полное выравнивание последовательностей, может быть определено с использованием компьютерной программы FASTDB, основанной на работе алгоритма авторов статью Brutlag и др., *Comp. App. Biosci.* 6:237-245 (1990), содержание которой полностью включено в эту заявку посредством ссылки. При выравнивании последовательностей обе запрашиваемая и исследуемая последовательности обе являются ДНК-последовательностями или обе - аминокислотными последовательностями. Результат указанного полного выравнивания последовательностей представляют в процентах идентичности. В другом варианте изобретения параметры, используемые при выравнивании аминокислотных последовательностей в программе FASTDB, такие: Матрица=Унитарная 0, k-мерность=2, Ошибка несовпадения=1, Ошибка связывания=20, Длина группы рандомизации=0, Счёт отсекаания=1, Размер окна=длине последовательности, Ошибка промежутка=5, Ошибка размера промежутка=0,05, Размер окна=500 или длине исследуемой аминокислотной последовательности, которая может быть коротче.

Если исследуемая последовательность короче, чем запрашиваемая последовательность из-за N- или C-терминальных делеций, но не из-за внутренних делеций, то для получения результатов необходимо провести коррекцию в ручном режиме. Это необходимо потому, что программа FASTDB не учитывает N- или C-терминальные усечения исследуемой последовательности при расчёте общего процента идентичности. Для исследуемых последовательностей, усечённых с N- и C-терминальных концов, подобных запрашиваемой последовательности, процент идентичности корректируется путём расчёта количества оснований запрашиваемой последовательности, что находятся в пределах N- и C-терминальных концов исследуемой последовательности, которые не совпадают/не выравниваются с соответствующей исследуемой последовательностью, как процент общего количества остатков запрашиваемой последовательности. Если же остатки не совпадают/не выравниваются, то это определяется по результатам выравнивания последовательности в программе FASTDB. Это процентное значение потом отнимается от процента идентичности, рассчитанного выше программой FASTDB, используя специальные параметры для получения финального значения процента идентичности. Это значение финального процента идентичности является тем, что используется в целях настоящего изобретения. В целях корректировки значения процента идентичности в ручном режиме учитываются только остатки около N- и C-терминальных концов исследуемой последовательности, которые не совпадают/не выравниваются с запрашиваемой последовательностью. Это только те запрашиваемые положения остатков, которые находятся за пределами самих удалённых N- и C-терминальных остатков исследуемой последовательности.

Например, исследуемая последовательность длиной 90 остатков для определения процента идентичности выравнивается с запрашиваемой последовательностью длиной 100 остатков. Делеции встречаются на N-терминальном конце исследуемой последовательности и поэтому при выравнивании программой FASTDB не будет отмечаться совпадение/выравнивание первых 10 остатков N-терминального конца. 10 несоответствующих остатков представляют 10% последовательности (количество остатков на N- и C-терминальных концах не совпадают/не равны общему числу остатков запрашиваемой последовательности), таким образом, 10% отнимается от значения процента идентичности, рассчитанного программой FASTDB. Если оставшиеся 90 остатков совершенно совпали, то финальное значение процента идентичности было бы 90%. В другом примере, исследуемая последовательность длиной 90 остатков сравнивается с запрашиваемой последовательностью длиной 100 остатков. В этот раз делеции являются внутренними, так что нет остатков на N- и C-терминальных концах исследуемой последовательности, которые не совпадают/не выравниваются с запрашиваемой последовательностью. В этом случае процент идентичности, рассчитанный программой FASTDB, не корректируется вручную. И ещё раз, только положения остатков N- и C-терминальных концов исследуемой последовательности, как отмечается при выравнивании программой FASTDB, которые не совпадают/не выравниваются с запрашиваемой последовательностью, корректируются вручную. В целях настоящего изобретения никакие другие корректировки в ручном режиме не производятся.

Полинуклеотидные варианты могут содержать изменения в кодирующих участках, некодирующих участках или в них обоих. В одном варианте осуществления изобретения полинуклеотидные варианты содержат изменения, которые приводят к "молчащим" заменам, добавлениям или удалениям, но не изменяют свойств или активности кодируемых полипептидов. В другом варианте изобретения нуклеотидные варианты приводят к "молчащим" заменам из-за вырождения генетического кода. В других вариантах изобретения предложены варианты последовательностей, у которых 5-10, 1-5 или 1-2 аминокислоты замещены, удалены или добавлены в любых комбинациях. Полинуклеотидные варианты могут быть созданы по разнообразным причинам, например, для оптимизации экспрессии кодонов особого хозяина (изменение кодонов мРНК человека на другие, к примеру, хозяина-бактерии, такого как *E.coli*).

Естественно встречающиеся варианты называются "аллельными вариантами" и относятся к одной из нескольких альтернативных форм гена, несущего данный локус на хромосоме организма (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). Эти аллельные варианты могут изменяться на уровне полинуклеотида и/или полипептида и включены в настоящее изобретение. В другом случае не встре-

чающиеся естественно варианты могут создаваться методами мутагенеза или прямым синтезом. Используя известные методы белковой инженерии и технологии рекомбинантных ДНК, варианты могут быть созданы для улучшения и изменения характеристик полипептидов. К примеру, одна или более аминокислот могут быть удалены из N-терминального или C-терминального конца секретируемого белка без значительной потери его биологической функции. В статье Ron и др., *J. Biol. Chem.* 268: 2984-2988 (1993), содержание которой полностью включено в эту заявку посредством ссылки, сообщается о вариантах белков-факторов роста кератиноцитов (KGF), обладающих гепарин-связывающей активностью после удаления 3, 8 или 27 аминокислотных остатков. Сходным образом, для интерферона- $\gamma$  показано до десяти раз большая активность после удаления 8-10 аминокислотных остатков от карбокси-терминального конца этого белка. (Статья Dobeli и др., *J. Biotechnology* 7:199-216 (1988), содержание которой полностью включено в эту заявку посредством ссылки).

Более того, достаточно доказательств иллюстрирует, что варианты часто сохраняют биологическую активность подобную той, которая отмечается для естественно встречающегося белка. Например, в работе Gayle с соавторами (*J. Biol. Chem.* 268:22105-22111 (1993), содержание которой полностью включено в эту заявку посредством ссылки) проведён расширенный анализ мутаций цитокина IL-1 $\alpha$  человека. Авторы применили случайный мутагенез для получения более 3500 отдельных IL-1 $\alpha$  мутаций, составляющих в среднем 2,5 изменения аминокислот на вариант по всей длине молекулы. Наличие множественных мутаций проверялось в каждом возможном положении аминокислот. Исследователи обнаружили, что: "в большинстве случаев эта молекула может быть изменена с небольшим влиянием на (её связывающую или биологическую активность)". Фактически только 23 уникальные аминокислотные последовательности из более чем 3500 проверенных нуклеотидных последовательностей приводили к получению белка со значительными отличиями активности от дикого типа.

Как указано выше, варианты полипептидов включают, например, модифицированные полипептиды. Модификации включают, к примеру, ацетилирование, ацилирование, АДФ-рибозилирование, амидирование, ковалентное присоединение флавина, ковалентное присоединение функциональной группы гема, ковалентное присоединение нуклеотида или производного нуклеотида, ковалентное присоединение липида или липидного производного, ковалентное присоединение фосфатидилинозита, перекрёстное сшивание, циклизацию, образование дисульфидных связей, деметилирование, образование ковалентных сшивков, образование цистеина, образование пироглутамата, формилирование,  $\gamma$ -карбоксилирование, гликозилирование, прикрепление гликозилфосфатидилинозитола (GPI), гидрокселирование, йодирование, метилирование, присоединение остатка миристиловой кислоты, окисление, пэгилирование (статья Mei и др., *Blood* 116:270-79 (2010), содержание которой полностью включено в эту заявку посредством ссылки), протеолитический процессинг, фосфорилирование, пренилирование, рацемизацию, присоединение остатка селеновой кислоты, сульфатация, РНК-опосредованный перенос аминокислот на белки, такой как аргинилирование и убихитинация. В некоторых вариантах осуществления изобретения фактор FVIII модифицирован, например, путём пэгилирования в любом подходящем положении. В некоторых вариантах FVIII пэгилирован по обращенным к поверхности аминокислотам FVIII, например, на расположенном на поверхности цистеине, который может быть технически присоединённым цистеином. Там же. В некоторых вариантах модифицированный FVIII, например, пэгилированный FVIII является длительно действующим фактором FVIII.

"Объем распределения в равновесном состоянии ( $V_{SS}$ )", как используется в этой заявке, имеет то же значение, что и термин, используемый в фармакологии, который обозначает кажущееся пространство (объём), в котором распределяется лекарственное вещество.  $V_{SS}$  равен количеству лекарственного вещества в организме, делённому на его концентрацию в плазме в равновесном состоянии.

"Около", "примерно" используется в этой заявке для обозначения диапазона и изменяет обе границы диапазона. Таким образом, фраза "около 10-20" значит "около 10 - около 20".

"Химерный полипептид", как используется в этой заявке, может включать процессированный FVIII, одноцепочечный FVIII или их комбинацию. "Процессированный FVIII" используется в этой заявке для обозначения FVIII, который расщеплён по остатку аргинина 1648 (полноразмерного FVIII) или аргинина 754 (FVIII с удалённым В-доменом), например, в сайте внутриклеточного процессинга. Благодаря расщеплению в сайте внутриклеточного процессинга процессированный FVIII образует две полипептидные цепи: первая цепь является тяжёлой цепью, а вторая - лёгкой. Например, процессированный белок слияния FVIII-Fc (например, тяжёлая и лёгкая цепи соединены с частью Fc) соответствует белкам 90 и 130 кДа при электрофорезе в ПААГ с ДДС в невосстанавливающих условиях (SDS-PAGE), соответственно, и 90 и 105 кДа при электрофорезе в ПААГ с ДДС в восстанавливающих условиях, соответственно. Поэтому в одном варианте изобретения по меньшей мере примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или примерно 100% FVIII -части химерного полипептида является процессированным FVIII.

В другом варианте изобретения около 50%, около 60%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% FVIII-части

химерного полипептида является процессированным FVIII. В отдельном варианте изобретения химерный полипептид, содержащий процессированный FVIII очищается (или изолируется) от химерного полипептида, содержащего одноцепочечный FVIII, и по крайней мере примерно 90%, примерно 95%, примерно 96%, примерно 97%, примерно 98%, примерно 99% или примерно 100% FVIII-части химерного полипептида является процессированным FVIII.

Термин "одноцепочечный FVIII" используется в этой заявке для обозначения FVIII, который не был расщеплен по сайту аргинина - остатку 1648 полноразмерного FVIII (например, остаток 1667 SEQ ID № 6) или остатку 774 FVIII с удалённым В-доменом (например, остаток 773 SEQ ID № 2). Поэтому, одноцепочечный FVIII в химерном полипептиде, используемый в этой заявке, состоит из одной цепи. В одном варианте осуществления изобретения одноцепочечный FVIII содержит интактный сайт внутриклеточного процессинга. Одноцепочечный белок слияния FVIII-Fc соответствует белку приблизительно 220 кДа при электрофорезе в ПААГ с ДДС в невосстанавливающих условиях и приблизительно 195 кДа при электрофорезе в ПААГ с ДДС в восстанавливающих условиях.

В одном варианте изобретения химерный полипептид, содержащий одноцепочечный FVIII, очищен (или отделён) от химерного полипептида, содержащего процессированный FVIII, и по крайней мере около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 75%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 99% или около 100% FVIII-части химерного полипептида, использованного в этой заявке, является одноцепочечным FVIII. В другом варианте изобретения по крайней мере около 1%, около 5%, около 10%, около 15%, около 20% или около 25% FVIII-части химерного полипептида являются одноцепочечным FVIII. В остальных вариантах около 1% - около 10%, около 5% - около 15%, около 10% - около 20%, около 15% - около 25%, около 20% - около 30%, около 25% - около 35%, около 30% - около 40% FVIII-части химерного полипептида, использованного в этой заявке, является одноцепочечным FVIII. В отдельном варианте около 1%, около 5%, около 10%, около 15%, около 20% или около 25% FVIII-части химерного полипептида является одноцепочечным FVIII. В других вариантах около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98%, около 99% или около 100% FVIII-части химерного полипептида, использованного в этой заявке, является одноцепочечным FVIII. В некоторых вариантах соотношение одноцепочечного FVIII к процессированному FVIII химерного полипептида составляет: (a) около 25% одноцепочечного FVIII и около 75% процессированного FVIII; (b) около 20% одноцепочечного FVIII и около 80% процессированного FVIII; (c) около 15% одноцепочечного FVIII и около 85% процессированного FVIII; (d) около 10% одноцепочечного FVIII и около 90% процессированного FVIII; (e) около 5% одноцепочечного FVIII и около 95% процессированного FVIII; (f) около 1% одноцепочечного FVIII и около 99% процессированного FVIII; или (g) около 100% процессированного FVIII.

В других вариантах соотношение одноцепочечного FVIII к процессированному FVIII химерного полипептида составляет: (a) около 30% одноцепочечного FVIII и около 70% процессированного FVIII; (b) около 40% одноцепочечного FVIII и около 60% процессированного FVIII; (c) около 50% одноцепочечного FVIII и около 50% процессированного FVIII; (d) около 60% одноцепочечного FVIII и около 40% процессированного FVIII; (e) около 70% одноцепочечного FVIII и около 30% процессированного FVIII; (f) около 80% одноцепочечного FVIII и около 20% процессированного FVIII; (g) около 90% одноцепочечного FVIII и около 10% процессированного FVIII; (h) около 95% одноцепочечного FVIII и около 5% процессированного FVIII; (i) около 99% одноцепочечного FVIII и около 1% процессированного FVIII; или (j) около 100% одноцепочечного FVIII. FVIII-часть в химерном полипептиде, используемом в этой заявке, обладает активностью фактора FVIII. Активность FVIII измеряется любым из известных методов в этой сфере знаний. Например, одним из таких методов может быть хромогенный количественный анализ. Механизм хромогенного анализа основан на закономерностях каскада коагуляции крови, при котором активированный FVIII ускоряет конверсию фактора X в фактор Xa в присутствии активированного фактора IX, фосфолипидов и ионов кальция. Активность фактора Xa оценивают по степени гидролиза п-нитроанилидного (pNA) субстрата, специфичного для фактора Xa. Начальная скорость освобождения п-нитроанилина, измеряемая при 405 нм, прямопропорциональна активности фактора Xa и, таким образом, активности FVIII.

Хромогенный анализ рекомендован Подкомитетом по FVIII и фактору IX Комитета по научным исследованиям и стандартизации (SSC) Международного сообщества по вопросам тромбоза и гемостаза (ISTH). С 1994 года хромогенного анализа также является стандартным методом Европейской Фармакопеи для установления активности концентратов FVIII. Поэтому в одном варианте химерный полипептид, содержащий одноцепочечный FVIII, обладал активностью FVIII сравнимой с активностью химерного полипептида, содержащего процессированный FVIII (например, химерный полипептид, состоящий в основном, или состоящий из двух частей Fc и процессированного FVIII, тогда как упомянутый процессированный FVIII присоединён к одной из двух частей Fc), когда активность FVIII измеряется в условиях *in vitro* хромогенным анализом.

В другом варианте химерный полипептид, содержащий одноцепочечный FVIII настоящего изобретения, обладает скоростью образования фактора Xa, сравнимой с активностью химерного полипептида, содержащего процессированный FVIII (например, химерный полипептид, состоящий в основном, или

состоящий из двух частей Fc и процессированного FVIII, тогда как упомянутый процессированный FVIII присоединён к одной из двух частей Fc).

Для того чтобы превратить фактор X в фактор Xa, активированный фактор IX (фактор IXa) в присутствии  $Ca^{2+}$ , мембранных фосфолипидов и кофактора FVIII гидролизует одну аргинин-изолейциновую связь фактора X для образования фактора Xa. Поэтому взаимодействие FVIII с фактором IX является критичным для механизма коагуляции. В определённых вариантах химерный полипептид, содержащий одноцепочечный FVIII настоящего изобретения, может взаимодействовать с фактором IXa со скоростью, сравнимой с такой для химерного полипептида, содержащего процессированный FVIII (например, химерный полипептид, состоящий в основном или состоящий из двух частей Fc и процессированного FVIII, тогда как упомянутый процессированный FVIII присоединён к одной из двух частей Fc).

Кроме того, FVIII при циркуляции в неактивном состоянии связывается с фактором фон Виллебранда (vWF). Когда FVIII не связан с vWF, он быстро деградирует и освобождается от vWF под действием тромбина. В некоторых вариантах химерный полипептид, содержащий одноцепочечный FVIII, связывает фактор фон Виллебранда на уровне, сравнимом с таким для химерного полипептида, содержащего процессированный FVIII (например, химерный полипептид, состоящий в основном, или состоящий из двух частей Fc и процессированного FVIII, тогда как упомянутый процессированный FVIII присоединён к одной из двух частей Fc).

FVIII может быть инактивирован в присутствии кальция и фосфолипидов активированным протеином C. Активированный протеин C расщепляет тяжёлую цепь после аргинина 336 A1-домена, что разрушает сайт взаимодействия с субстратом фактора X, и расщепляет связь после аргинина 562 A2-домена, что усиливает диссоциацию A2-домена, а также разрушает сайт взаимодействия с фактором IXa. Это расщепление также разрезает A2-домен (43 кДа) и образует домены A2-N (18 кДа) и A2-C (25 кДа). Таким образом, активированный протеин C может катализировать множественные расщепления сайтов тяжёлой цепи. В одном варианте изобретения химерный полипептид, содержащий одноцепочечный FVIII, инактивируется активированным протеином C на уровне, сравнимом с таким для химерного полипептида, содержащего процессированный FVIII (например, химерный полипептид, состоящий в основном, или состоящий из двух частей Fc и процессированного FVIII, тогда как упомянутый процессированный FVIII присоединён к одной из двух частей Fc).

В других вариантах химерный полипептид, содержащий одноцепочечный FVIII настоящего изобретения, обладает активностью FVIII *in vivo*, сравнимой с активностью химерного полипептида, содержащего процессированный FVIII (например, химерный полипептид, состоящий в основном, или состоящий из двух частей Fc и процессированного FVIII, тогда как упомянутый процессированный FVIII присоединён к одной из двух частей Fc). В отдельном варианте химерный полипептид, содержащий одноцепочечный FVIII, способен защищать мышей с гемофилией A (HemA) в степени, сравнимой с такой для химерного полипептида, содержащего процессированный FVIII (например, химерный полипептид, состоящий в основном, или состоящий из двух частей Fc и процессированного FVIII, тогда как упомянутый процессированный FVIII присоединён к одной из двух частей Fc) в модели рассечения хвостовой вены мышей с HemA.

Термин "сравнимый" используется в этой заявке в значении сравнимой степени или уровня, получаемых при использовании химерного полипептида, являющихся равными или практически равными или сходными с референтной степенью или уровнем. Термин "сходный", "подобный" используется в этой заявке в значении сравнимой степени или уровня, обладающими разницей не более 10% или не более 15% от референтной степени или уровня (например, скорость образования FXa химерным полипептидом, состоящим в основном, или состоящим из двух частей Fc и процессированного FVIII, тогда как упомянутый процессированный FVIII присоединён к одной из двух частей Fc). Термин "практически равный" обозначает сравнимую степень или уровень, обладающие отличием от референтной степени или уровня не более чем 0,01, 0,5 или 1%.

Настоящее изобретения далее включает композицию, содержащую химерный полипептид, обладающий активностью FVIII, по меньшей мере примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, или примерно 99% активности химерного полипептида, включающего FVIII-часть, которая является одноцепочечным FVIII, и вторую часть. В другом варианте изобретения около 30%, около 40%, около 50%, около 60%, около 70%, около 80%, около 85%, около 90%, около 95%, около 96%, около 97%, около 98% или около 99% химерного полипептида в композиции являются одноцепочечным FVIII. В остальных вариантах вторую часть представляет фрагмент Fc. В дополнительных других вариантах химерный полипептид включает другой функциональный фрагмент, обеспечивающий продолжительный период полувыведения, например альбумин. В оставшихся других вариантах композиция настоящего изобретения включает комбинацию химерного полипептида, содержащего процессированный FVIII, и химерного полипептида, содержащего одноцепочечный FVIII: (a) в которой около 30% части химерного полипептида является одноцепочечным FVIII и около 70% FVIII-части химерного полипептида является процессированным FVIII; (b) в которой около 40% части химерного полипептида является одноцепочечным FVIII и около 60% FVIII-части химерного полипептида является процессированным FVIII; (c) в которой около 50% части химер-

ного полипептида является одноцепочечным FVIII и около 50% FVIII-части химерного полипептида является процессированным FVIII; (d) в которой около 60% части химерного полипептида является одноцепочечным FVIII и около 40% FVIII-части химерного полипептида является процессированным FVIII; (e) в которой около 70% части химерного полипептида является одноцепочечным FVIII и около 30% FVIII-части химерного полипептида является процессированным FVIII; (f) в которой около 80% части химерного полипептида является одноцепочечным FVIII и около 20% FVIII-части химерного полипептида является процессированным FVIII; (g) в которой около 90% части химерного полипептида является одноцепочечным FVIII и около 10% FVIII-части химерного полипептида является процессированным FVIII; (h) в которой около 95% части химерного полипептида является одноцепочечным FVIII и около 5% FVIII-части химерного полипептида является процессированным FVIII; (i) в которой около 99% части химерного полипептида является одноцепочечным FVIII и около 1% FVIII-части химерного полипептида является процессированным FVIII; или (j) в которой около 100% части химерного полипептида является одноцепочечным FVIII.

В определенных вариантах композиция настоящего изобретения обладает активностью FVIII, сравнимой с композицией, содержащей процессированный FVIII (например, композиция, содержащая химерный полипептид, состоящий в основном, или состоящий из двух частей Fc и процессированного FVIII, тогда как процессированный FVIII соединён с одной из двух частей Fc), когда активность FVIII измеряется в условиях *in vitro* хромогенным анализом.

В других вариантах композиция настоящего изобретения обладает скоростью образования фактора Ха, сравнимой с композицией, содержащей процессированный FVIII (например, композиция, содержащая химерный полипептид, состоящий в основном, или состоящий из двух частей Fc и процессированного FVIII, тогда как упомянутый процессированный FVIII соединён с одной Fc из двух частей Fc). В оставшихся других вариантах композиция, содержащая одноцепочечный FVIII, может взаимодействовать с фактором IXa со скоростью, сравнимой с композицией, содержащей процессированный FVIII (например, композиция, содержащая химерный полипептид, состоящий в основном, или состоящий из двух частей Fc и процессированного FVIII, тогда как процессированный FVIII соединён с одной частью Fc).

В дополнительных вариантах изобретения одноцепочечный FVIII в химерном полипептиде настоящей композиции инактивируется активированным протеином С на уровне, сравнимом с процессированным FVIII в химерном полипептиде композиции (например, композиция, содержащая химерный полипептид, состоящий в основном или состоящий из двух частей Fc и процессированного FVIII, тогда как процессированный FVIII соединён с одной Fc из двух частей Fc). В особом варианте композиция, содержащая одноцепочечный FVIII, обладает активностью FVIII *in vivo*, сравнимой с активностью композиции, содержащей процессированный FVIII (например, композиция, содержащая химерный полипептид, состоящий в основном, или состоящий из двух частей Fc и процессированного FVIII, тогда как процессированный FVIII соединён с одной Fc из двух частей Fc). В некоторых вариантах композиции, содержащая одноцепочечный FVIII настоящего изобретения, способен защищать мышей с гемофилией А (HemA) в степени, сравнимой с такой для композиции, содержащей процессированный FVIII (например, композиция, содержащая химерный полипептид, состоящий в основном, или состоящий из двух частей Fc и процессированного FVIII, тогда как упомянутый процессированный FVIII присоединён к одной Fc из двух частей Fc) в модели рассечения хвостовой вены мышей с HemA.

Настоящее изобретение далее представляет способ лечения, используя предлагаемые в этой заявке композиции состояния кровотечений у людей. Иллюстративный способ включает введение пациенту необходимого для терапевтического эффекта количества фармацевтической композиции/состава, содержащего химерный полипептид, обладающий активностью FVIII, по меньшей мере примерно 30%, примерно 40%, примерно 50%, примерно 60%, примерно 70%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95%, или примерно 99% активности химерного полипептида, включающего FVIII-часть, которая является одноцепочечным FVIII, и вторую часть.

Состояние кровотечения может быть обусловлено нарушением коагуляции крови. Нарушением коагуляции крови может также рассматриваться как коагулопатия. В одном варианте нарушением коагуляции крови, которое может лечиться фармацевтической композицией настоящего изобретения, является гемофилия или заболевание фон Виллебранда (vWD). В другом варианте нарушением коагуляции крови, которое может лечиться фармацевтической композицией настоящего изобретения, является гемофилия А.

В некоторых вариантах тип кровотечения, связанный с состоянием кровотечения, выбирается из гемартроза, кровотечения в мышечной ткани, кровотечения в ротовой полости, кровоизлияния, кровоизлияния в мышечной ткани, кровоизлияния в ротовой полости, последствия травмы, травмы головы, гастроинтестинального кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома костей, кровотечения в пределах центральной нервной системы, кровотечения в глоточной области, кровотечения в брюшинной области или кровотечения в области окружения мышц иллиопсаас.

В других вариантах изобретения пациент, страдающий от состояний кровотечения, нуждается в лечении для осуществления хирургического вмешательства, например профилактического хирургического лечения или периоперационного управления. В одном примере хирургическое вмешательство выбирает-

ся из малой или обширной операции. Иллюстративные оперативные вмешательства включают: удаление зубов, удаление миндалин, удаление паховых грыж, синовэктомию, трепанацию черепа, остеосинтез, хирургическое лечение травм, внутричерепное хирургическое вмешательство, внутрибрюшинное хирургическое вмешательство, внутригрудное хирургическое вмешательство, операции по замене суставов (например, полная замена коленного соединения, замещение тазобедренного сустава и подобные операции), хирургию сердца и кесарево сечение.

В другом примере субъект в сопутствующем режиме лечится с помощью FIX. Из-за того, что вещества настоящего изобретения способны активировать FIXа, то перед введением FIXа пациенту они могут использоваться для предварительной активации полипептида FIXа.

Этот представленный в данной заявке способ может применяться для пациента с необходимостью в профилактическом лечении или лечении по требованию. Фармацевтические композиции, содержащие по крайней мере 30% одноцепочечного FVIII, могут быть составлены для любого приемлемого способа введения, включающего, например, местное (например, трансдермальное или глазное), оральное, буккальное, назальное, вагинальное, ректальное или парентеральное введение. Термин "парентеральное", как используется в этой заявке, включает подкожное, внутрикожное, внутрисосудистое (например, интравенозное), внутримышечное, спинальное, внутричерепное, интратекальное, периокулярное, интраорбитальное, внутрисуставное и интраперитонеальное инъекции, а также любую методику подобной инъекции или инфузии. Эта композиция может также быть, к примеру, суспензией, эмульсией, составом с замедленным высвобождением, кремом, гелем или порошком. Эта композиция может быть составлена как суппозиторий с традиционными связующими и носителями, такими как триглицериды. В одном примере фармацевтический состав является жидкой лекарственной формой, к примеру забуференным изотоническим водным раствором. В другом примере фармацевтический состав имеет значение pH, которое является физиологическим или близким к физиологическому. В других примерах водный состав имеет физиологические или близкие к физиологическим осмолярность и солёность. Он может содержать хлорид натрия и/или ацетат натрия. В некоторых примерах композиция настоящего изобретения является лиофилизованной. В некоторых вариантах осуществления изобретения эта фармацевтическая композиция не содержит иммунных клеток. В некоторых вариантах эта фармацевтическая композиция не содержит клеток.

Настоящее изобретение также предлагает набор, включающий: (a) фармацевтическую композицию, состоящую из химерного полипептида, содержащего часть фактора свёртывания крови, Fc-часть и фармацевтически приемлемый носитель, и (b) инструкцию по введению этой композиции пациенту, нуждающемуся в иммунной толерантности к фактору свёртывания крови. В некоторых вариантах осуществления изобретения этот химерный полипептид набора включает FVIII-часть, FVII-часть или FIX-часть. В других вариантах этот химерный полипептид набора является мономер-димерным гибридным фактором FVIII, мономер-димерным гибридным фактором FVII или мономер-димерным гибридным фактором FIX. В некоторых вариантах эти инструкции дополнительно включают по меньшей мере одну стадию определения того, что пациент нуждается в приобретении иммунной толерантности к фактору свёртывания крови. В некоторых вариантах эта стадия определения того, что пациент нуждается в приобретении иммунной толерантности, включает один или больше этапов из группы, состоящей из:

- (i) идентификации субъекта, несущего мутацию или делецию в гене фактора свёртывания крови;
- (ii) идентификации субъекта, обладающего перестройкой гена фактора свёртывания крови;
- (iii) идентификации субъекта, у которого есть родственник, с ранее возникшим ингибирующим иммунным ответом к фактору свёртывания крови;
- (iv) идентификации субъекта, получающего лечение интерферонами;
- (v) идентификации субъекта, получающего противовирусное лечение;
- (vi) идентификации субъекта, несущего генетическую мутацию в генах, отличных от гена, кодирующего фактор свёртывания, связанных с повышением риска развития ингибирующего иммунного ответа; и
- (vii) комбинации двух или больше этих этапов.

В некоторых вариантах указанная генетическая мутация гена, отличного от гена, кодирующего фактор свёртывания крови, включает одну или более мутаций, выбранных из множества:

- (i) генетический полиморфизм, связанный с повышением уровня TNF- $\alpha$ ;
- (ii) генетический полиморфизм, связанный с повышением уровня IL10;
- (iii) генетический полиморфизм, связанный с понижением уровня CTLA-4;
- (iv) мутация молекул DR15 или DQB0602 главного комплекса гистосовместимости (МНС) II класса; и
- (v) комбинации двух или больше этих мутаций.

Дополнительно на конейтене(ах) может быть уведомление в форме предписания государственного органа, регулирующего производство, применение или продажу фармацевтических или биологических препаратов, уведомление которого отражает разрешение этого органа на производство, применение и продажу данного набора для введения людям.

#### **Осуществление изобретения**

E1. Способ индуцирования иммунной толерантности к фактору свёртывания крови у субъекта, нуждающегося в этом факторе, включающий введение пациенту химерного полипептида, отличающийся

тем, что химерный полипептид содержит часть фактора свёртывания крови и часть молекулы Fc.

E2. Способ предотвращения или ингибирования ингибитора фактора свёртывания, включающего введение пациенту, нуждающемуся в иммунной толерантности к химерному полипептиду фактора свёртывания, отличающийся тем, что этот химерный полипептид содержит часть фактора свёртывания и Fc-часть.

E3. Способ осуществления изобретения E1 или E2, отличающийся тем, что у субъекта может развиваться ингибирующий иммунный ответ к фактору свёртывания, если вводится эквивалентная доза полипептида, содержащего фактор свёртывания.

E4. Способ осуществления изобретения E1 или E3, отличающийся тем, что у субъекта возник ингибирующий иммунный ответ к фактору свёртывания.

E5. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E4, отличающийся тем, что субъект никогда ранее не подвергался лечению фактором свёртывания.

E6. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1 - E5, отличающийся тем, что часть фактора свёртывания крови включает фактор VIII, фактор IX, фактор VII, фактор фон Виллебранда или их фрагменты.

E7. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E5, отличающийся тем, что субъект представляет собой плод, и этот способ лечения дополнительно включает введение химерного полипептида для матери этого плода, и указанное введение субъекту происходит через плаценту матери.

E8. Способ осуществления изобретения E7, отличающийся тем, что функциональная группа фактора свёртывания включает фактор VIII, фактор IX, фактор VII, фактор фон Виллебранда или их фрагменты.

E9. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E6, отличающийся тем, что субъект является ребёнком или взрослым.

E10. Способ осуществления изобретения E9, отличающийся тем, что субъектом является ребёнок возрастом младше одного года, младше двух лет, младше двух лет, младше трёх лет, младше четырёх лет, младше пяти лет, младше шести лет, младше семи лет, младше восьми лет, младше девяти лет, младше десяти лет, младше одиннадцати лет или младше двенадцати лет.

E11. Способ осуществления изобретения E10, отличающийся тем, что возраст ребёнка меньше одного года.

E12. Способ осуществления изобретения E11, отличающийся тем, что у ребёнка и взрослого развивается нарушение свёртывания крови, при этом проявление симптомов нарушения свёртывания крови появилось в возрасте более одного года.

E13. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E12, отличающийся тем, что введение композиции происходит в количестве, достаточном для предотвращения, ингибирования или снижения развития иммунного ответа, выявляющемся в гуморальном иммунном ответе, клеточно-опосредованном иммунном ответе или в обоих гуморальном и клеточно-опосредованном иммунных ответах к фактору свёртывания крови.

E14. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E13, отличающийся тем, что композиция вводится в повторных дозах.

E15. Способ осуществления изобретения E14, отличающийся тем, что каждая из повторных доз разделяется от другой по меньшей мере 12 ч, по меньшей мере 24 ч, по меньшей мере 2 днями, по меньшей мере 3 днями, по меньшей мере 4 днями, по меньшей мере 5 днями, по меньшей мере 6 днями, по меньшей мере 7 днями, по меньшей мере 8 днями, по меньшей мере 9 днями, по меньшей мере 10 днями, по меньшей мере 11 днями, по меньшей мере 12 днями, по меньшей мере 13 днями, по меньшей мере 14 днями или по меньшей мере 15 днями.

E16. Способ осуществления изобретения E14 или E15, отличающийся тем, что повторные дозы составляют по меньшей мере две дозы, по меньшей мере 5 доз, по меньшей мере 10 доз, по меньшей мере 25 доз, по меньшей мере 30 доз, по меньшей мере 35 доз, по меньшей мере 40 доз, по меньшей мере 45 доз, по меньшей мере 50 доз, по меньшей мере 55 доз, по меньшей мере 60 доз, по меньшей мере 65 доз или по меньшей мере 70 доз.

E17. Способ осуществления изобретения E16, отличающийся тем, что повторные дозы составляют от около 2 доз до около 100 доз, от около 5 доз до около 80 доз, от около 10 доз до около 70 доз, от около 10 доз до около 60 доз, от около 10 доз до около 50 доз, от около 15 доз до около 40 доз, от около 15 доз до около 30 доз, от около 20 доз до около 30 доз или от около 20 доз до около 40 доз.

E18. Способ осуществления изобретения E16 или E17, отличающийся тем, что повторные дозы составляют около 2 доз, около 5 доз, около 10 доз, около 15 доз, около 20 доз, около 25 доз, около 30 доз, около 35 доз, около 40 доз, около 45 доз, около 50 доз, около 55 доз, около 60 доз, около 65 доз, около 70 доз, около 75 доз, около 80 доз, около 90 доз или около 100 доз.

E19. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E14-E18, отличающийся тем, что пациенту после повторных доз дополнительно вводится фармацевтическая композиция, содержащая белок фактора свёртывания, которая включает фактор свёртывания, но не содержит Fc-часть.

E20. Способ осуществления изобретения E19, отличающийся тем, что белок фактора свёртывания может быть полноразмерным или зрелым фактором свёртывания.

E21. Способ осуществления изобретения E19, отличающийся тем, что белок фактора свёртывания содержит одну или более функциональных групп, обеспечивающих продление периода полувыведения препарата, отличающихся от Fc-части.

E22. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E21, отличающийся тем, что указанное введение обеспечивает лечение одного или более эпизодов кровотечения.

E23. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E22, отличающийся тем, что указанное введение обеспечивает предотвращение одного или более эпизодов кровотечения.

E24. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E23, отличающийся тем, что указанное введение является эпизодическим лечением одного или более эпизодов кровотечения.

E25. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E23, отличающийся тем, что субъект нуждается в профилактическом хирургическом вмешательстве, периоперационном управлении или оперативном лечении.

E26. Способ осуществления изобретения E25, отличающийся тем, что оперативные вмешательства представляют собой: малое хирургическое вмешательство, обширное оперативное вмешательство, удаление зубов, удаление миндалин, удаление паховых грыж, синовэктомию, полную замену коленного соединения, трепанацию черепа, остеосинтез, хирургическое лечение травм, внутричерепное хирургическое вмешательство, внутрибрюшинное хирургическое вмешательство, внутригрудное хирургическое вмешательство, или операции по замене суставов.

E27. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E13-E26, отличающийся тем, что ингибирующий иммунный ответ включает синтез ингибирующих антител к фактору свёртывания крови.

E28. Способ осуществления изобретения E27, отличающийся тем, что концентрация таких антител составляет по меньшей мере 0,6 единицам Бетесды (БЕ).

E29. Способ осуществления изобретения E28, отличающийся тем, что концентрация таких антител составляет по меньшей мере 5 БЕ.

E30. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E13-E26, отличающийся тем, что такой иммунный ответ включает клеточно-опосредованный иммунный ответ.

E31. Способ осуществления изобретения E30, отличающийся тем, что клеточно-опосредованный иммунный ответ может включать высвобождение цитокинов, выбранных из группы, состоящей из IL-12, IL-4 и TNF- $\alpha$ .

E32. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E13-E31, отличающийся тем, что этот иммунный ответ включает клинический симптом, выбранный из группы, состоящей из: увеличения тенденции кровотечений, высокого уровня использования фактора свёртывания, недостаточного ответа на терапию с помощью фактора свёртывания, снижения эффективности терапии с помощью фактора свёртывания и/или сокращения периода полувыведения фактора свёртывания.

E33. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E32, отличающийся тем, что субъект несёт мутацию или делецию в гене фактора свёртывания крови.

E34. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E32, отличающийся тем, что субъект несёт перестройку гена фактора свёртывания крови.

E35. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E34, отличающийся тем, что субъект страдает серьёзной гемофилией.

E36. Способ осуществления изобретения E1-E34, отличающийся тем, что у субъекта есть родственник, у которого ранее возник ингибирующий иммунный ответ к фактору свёртывания.

E37. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E36, отличающийся тем, что субъект получает лечение препаратами интерферонов.

E38. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E37, отличающийся тем, что субъект получает противовирусное лечение.

E39. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E38, отличающийся тем, что субъект обладает генетическим полиморфизмом, связанным с повышенным уровнем TNF- $\alpha$ .

E40. Способ осуществления изобретения E39, отличающийся тем, что полиморфизм является полиморфизмом TNF- $\alpha$  308G>A.

E41. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E40, отличающийся тем, что субъект обладает генетическим полиморфизмом, связанным с повышенным уровнем IL10.

E42. Способ осуществления изобретения E41, отличающийся тем, что полиморфизм находится в виде микросателлита IL10G в аллели I34.

E43. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E42, отличающийся тем, что субъект обладает генетическим полиморфизмом, связанным с пониженной экспрессией CTLA-4.

E44. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E43, отличающийся тем, что субъект несёт мутацию в молекулах DR15 или DQB0602 главного комплекса гистосовместимости (МНС) II класса.

E45. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E44, отличающийся тем, что субъект получает фактор свёртывания крови менее чем 150 дней лечения (ДЛ).

E46. Способ осуществления изобретения E45, отличающийся тем, что субъект получает лечения

менее чем 50 ДЛ.

E47. Способ осуществления изобретения E46, отличающийся тем, что субъект получает лечения менее чем 20 ДЛ.

E48. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E3-E47, отличающийся тем, что ингибирующий иммунный ответ к FVIII развился в ответ на введение полноразмерного или зрелого фактора свёртывания FVIII.

E49. Способ осуществления изобретения E3-E48, отличающийся тем, что ингибирующий иммунный ответ представлял собой ингибирующий иммунный ответ к FVIII, возникший в ответ на введение рекомбинантного препарата FVIII.

E50. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E49, отличающийся тем, что указанное введение снижает у пациента количество антител к FVIII по сравнению с таким количеством до введения.

E51. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E50, отличающийся тем, что указанное введение снижает у пациента титр антител к FVIII по сравнению с таким титром до введения.

E52. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E51, отличающийся тем, что указанное введение снижает у пациента уровень цитокина по сравнению с таким уровнем до введения.

E53. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E52, отличающийся тем, что указанное введение снижает у субъекта количество антител к FVIII по сравнению с таким количеством у субъекта после предыдущего лечения полипептидом, содержащим полипептид FVIII.

E54. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E53, отличающийся тем, что указанное введение снижает у субъекта титр антител к FVIII по сравнению с таким титром у субъекта после предыдущего лечения полипептидом, содержащим полипептид FVIII.

E55. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E54, отличающийся тем, что указанное введение снижает у субъекта уровень цитокина по сравнению с таким уровнем у субъекта после предыдущего лечения полипептидом, содержащим полипептид FVIII.

E56. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E55, отличающийся тем, что указанное введение снижает у пациента количество антител к фактору свёртывания по сравнению с таким количеством, которое могло бы образоваться у пациента при введении полипептида, состоящего из части фактора свёртывания.

E57. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E56, отличающийся тем, что указанное введение снижает у пациента титр антител к фактору свёртывания по сравнению с таким титром, который мог бы образоваться у пациента при введении полипептида, состоящего из части фактора свёртывания.

E58. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E57, отличающийся тем, что указанное введение снижает у пациента уровень цитокина по сравнению с таким уровнем, который мог бы образоваться у пациента при введении полипептида, состоящего из части фактора свёртывания.

E59. Способ осуществления изобретения E52, E55 или E58, отличающийся тем, что цитокин является выбранным из группы, состоящей из IL-12, IL-4 и TNF- $\alpha$ .

E60. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E59, который перед введением химерного полипептида дополнительно включает определение того, что субъект обладает одной или более особенностями, выбранными из множества:

- (a) несёт мутацию или делецию в гене, кодирующем фактор свёртывания крови;
- (b) несёт перестройку гена, кодирующего фактор свёртывания крови;
- (c) имеет родственника, у которого ранее развился ингибирующий иммунный ответ к фактору свёртывания крови;
- (d) получает терапию препаратами интерферонов; (d) получает противовирусную терапию;
- (f) несёт генетическую мутацию в гене, отличном от гена, кодирующего фактор свёртывания, связанную с повышением риска развития ингибирующего иммунного ответа; и
- (g) комбинация двух или больше этих особенностей.

E61. Способ осуществления изобретения E60, отличающийся тем, что генетическая мутация гена, отличного от гена, кодирующего фактор свёртывания крови, включает одну или более мутаций, выбранных из множества:

- (i) генетический полиморфизм, связанный с повышением уровня TNF- $\alpha$ ;
- (ii) генетический полиморфизм, связанный с повышением уровня IL10;
- (iii) генетический полиморфизм, связанный с понижением уровня CTLA-4;
- (iv) мутация молекул DR15 или DQB0602 главного комплекса гистосовместимости (МНС) II класса; и
- (v) комбинация двух или больше этих мутаций.

E62. Способ осуществления изобретения E61, отличающийся тем, что такой полиморфизм, связанный с повышенным уровнем TNF- $\alpha$ , является полиморфизмом 308G>A.

E63. Способ осуществления изобретения E61, отличающийся тем, что полиморфизм, связанный с повышенным уровнем IL10, присутствует в виде микросателлита IL10G в аллели 134.

E64. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E6 и E8-E62, отличающийся тем, что FVIII-часть включает A3-домен FVIII.

Е65. Способ какого-либо из осуществлений изобретения Е6 и Е8-Е63, отличающийся тем, что FVIII-часть включает FVIII человека.

Е66. Способ какого-либо из осуществлений изобретения Е6 и Е8-Е64, отличающийся тем, что FVIII-часть несёт полную или частичную делецию В-домена.

Е67. Способ какого-либо из осуществлений изобретения Е6 и Е8-Е66, отличающийся тем, что FVIII-часть является по меньшей мере на 90% или 95% идентичной аминокислотной последовательности FVIII, показанной в табл. 2, без сигнальной последовательности (аминокислоты 20-1457 SEQ ID № 2; аминокислоты 20-2351 SEQ ID № 6).

Е68. Способ какого-либо из осуществлений изобретения Е6 и Е8-Е66, отличающийся тем, что FVIII-часть является идентичной аминокислотной последовательности FVIII, показанной в табл. 2, без сигнальной последовательности (аминокислоты 20-1457 SEQ ID № 2; аминокислоты 20-2351 SEQ ID № 6).

Е69. Способ какого-либо из осуществлений изобретения Е6 и Е8-Е66, отличающийся тем, что FVIII-часть является по меньшей мере на 90 или 95% идентичной аминокислотной последовательности FVIII, показанной в табл. 2, с сигнальной последовательностью (аминокислоты 1-1457 SEQ ID № 2; аминокислоты 1-2351 SEQ ID № 6).

Е70. Способ какого-либо из осуществлений изобретения Е6 и Е8-Е66, отличающийся тем, что FVIII-часть является идентичной аминокислотной последовательности FVIII, показанной в табл. 2, с сигнальной последовательностью (аминокислоты 1-1457 SEQ ID № 2; аминокислоты 1-2351 SEQ ID № 6).

Е71. Способ какого-либо из осуществлений изобретения Е6 и Е8-Е70, отличающийся тем, что FVIII-часть обладает коагулирующей активностью.

Е72. Способ какого-либо из осуществлений изобретения Е1-Е71, отличающийся тем, что Fc-часть является идентичной аминокислотной последовательности Fc, показанной в табл. 2 (аминокислоты 1458-1684 SEQ ID № 2 или аминокислоты 2352-2578 SEQ ID № 6).

Е73. Способ какого-либо из осуществлений изобретения Е1-Е72, отличающийся тем, что химерный полипептид представляет собой форму гибридной молекулы, включающую второй полипептид в сочетании с химерным полипептидом, отличающимся тем, что второй полипептид состоит в основном из Fc или содержит Fc-часть или молекулы связывающейся с FcRn.

Е74. Способ какого-либо из осуществлений изобретения Е1-Е73, отличающийся тем, что химерный полипептид вводится в любой дозе из диапазона 10-100 МЕ/кг.

Е75. Способ осуществления изобретения Е74, отличающийся тем, что эта доза составляет 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90 или 90-100 МЕ/кг.

Е76. Способ осуществления изобретения Е75, отличающийся тем, что эта доза составляет 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 МЕ/кг.

Е77. Способ какого-либо из осуществлений изобретения Е1-Е76, отличающийся тем, что субъект находится в состоянии появления кровотечения, выбранном из множества: кровотечение вследствие нарушения коагуляции, гемартроз, кровотечение в мышечной ткани, кровотечение в ротовой полости, кровоизлияние, кровоизлияние в мышечной ткани, кровоизлияние в ротовой полости, последствие травмы, травма головы, гастроинтеральное кровотечение, внутричерепное кровоизлияние, внутрибрюшное кровоизлияние, внутригрудное кровоизлияние, перелом костей, кровотечение в пределах центральной нервной системы, кровотечение в заглоточной области, кровотечение в забрюшинной области или кровотечение в области окружения мышц илилюпсоас.

Е78. Способ осуществления изобретения Е77, отличающийся тем, что нарушением коагуляции является гемофилия А.

Е79. Способ какого-либо из осуществлений изобретения Е6 и Е8-Е63, отличающийся тем, что часть фактора свёртывания включает фактор IX.

Е80. Способ осуществления изобретения Е79, отличающийся тем, что часть фактора IX является по меньшей мере на 90, 95 или 100% идентичной аминокислотной последовательности FVIII, показанной в табл. 2, без сигнальной последовательности (аминокислоты 20-1457 SEQ ID № 2; аминокислоты 20-2351 SEQ ID № 6).

Е81. Способ какого-либо из осуществлений изобретения Е6 и Е8-Е63, отличающийся тем, что химерный полипептид представляет собой мономер димера гибридной молекулы, включающей первую цепь, содержащую FIX-часть и Fc-часть или связывающую FcRn молекулу, и вторую цепь, состоящую в основном из Fc или содержащую Fc-часть.

Е82. Способ какого-либо из осуществлений изобретения Е6 и Е8-Е63, отличающийся тем, что химерный полипептид содержит часть фактора FVII.

Е83. Способ осуществления изобретения Е62, отличающийся тем, что химерный полипептид представляет собой мономер димера гибридной молекулы, включающей первую цепь, содержащую FVII-часть и Fc-часть, и вторую цепь, в основном состоящую из Fc или состоящую из Fc-части.

Е84. Способ осуществления изобретения Е82 или Е83, отличающийся тем, что FVII-часть является неактивным FVII, активированным FVII или активирующимся FVII.

Е85. Набор, включающий: (а) фармацевтическую композицию, состоящую из химерного полипептида, состоящего из части фактора свёртывания крови и Fc-части или части молекулы связывания с FcRn

и фармацевтически приемлемого носителя, и (b) инструкцию по введению этой композиции пациенту, нуждающемуся в иммунной толерантности к фактору свёртывания крови.

E86. Набор осуществления изобретения E85, отличающийся тем, что этот химерный полипептид включает FVIII-часть, FVII-часть или FIX-часть.

E87. Набор осуществления изобретения E86, отличающийся тем, что этот химерный полипептид является мономер-димерным гибридным фактором FVIII, мономер-димерным гибридным фактором FVII или мономер-димерным гибридным фактором FIX.

E88. Набор какого-либо из осуществлений изобретения E85-E87, отличающийся тем, что такие инструкции дополнительно включают по меньшей мере одну стадию определения того, что пациент нуждается в создании иммунной толерантности к фактору свёртывания крови.

E89. Набор осуществления изобретения E88, отличающийся тем, что эта стадия определения того, что пациент нуждается в создании иммунной толерантности, включает один или больше вариантов из группы, состоящей из:

- (a) идентификации субъекта, несущего мутацию или делецию в гене фактора свёртывания крови;
- (b) идентификации субъекта, обладающего перестройкой гена фактора свёртывания крови;
- (c) идентификации субъекта, у которого есть родственник, с ранее возникшим ингибирующим иммунным ответом к фактору свёртывания крови;
- (d) идентификации субъекта, получающего лечение интерферонами;
- (e) идентификации субъекта, получающего противовирусное лечение;
- (f) идентификации субъекта, несущего генетическую мутацию в генах, отличных от гена, кодирующего фактор свёртывания, связанных с повышением риска развития ингибирующего иммунного ответа; и
- (g) комбинации двух или больше этих вариантов.

E90. Способ осуществления изобретения E89, отличающийся тем, что указанная генетическая мутация гена, отличного от гена, кодирующего фактор свёртывания крови, включает одну или более мутаций, выбранных из множества:

- (i) генетический полиморфизм, связанный с повышением уровня TNF- $\alpha$ ;
- (ii) генетический полиморфизм, связанный с повышением уровня IL10;
- (iii) генетический полиморфизм, связанный с понижением уровня CTLA-4;
- (iv) мутация молекул DR15 или DQB0602 главного комплекса гистосовместимости (МНС) II класса; и
- (v) комбинация двух или больше этих мутаций.

E91. Способ какого-либо из осуществлений изобретения E1-E84, отличающийся тем, что дополнительно включены измерения уровня ингибирующего иммунного ответа после указанного введения.

E92. Способ осуществления изобретения E91, отличающийся тем, что дополнительно включено сравнение уровня ингибирующего иммунного ответа после указанного введения с уровнем ингибирующего иммунного ответа перед указанным введением.

E93. Способ осуществления изобретения E91 или E92, отличающийся тем, что ингибирующий иммунный ответ проявляется в синтезе антител к FVIII.

E94. Способ осуществления изобретения E91 или E92, отличающийся тем, что ингибирующий иммунный ответ проявляется в секреции цитокинов.

Теперь, с получением детально описанного изобретения, то же содержание будет более понятным при рассмотрении следующих примеров, которые при этом включены только с целью иллюстрации и не приведены для ограничения этого изобретения. Все патенты и публикации, указанные в этой заявке, намеренно включены посредством ссылки.

### Примеры

Пример 1. Клонирование, экспрессия и очистка белка rFVIII<sub>Fc</sub>.

Все методики молекулярной биологии выполняли соответственно следующим стандартным методам. Кодированная последовательность FVIII человека (номер доступа Genbank NM\_000132), включает свою нативную сигнальную последовательность, полученную с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ПЦР-ОТ) из поли-А-РНК печени человека. Из-за большого размера FVIII кодирующая последовательность была получена в виде нескольких фрагментов с помощью отдельных реакций ПЦР-ОТ и собранных при участии серии ПЦР-реакций, заданных расщеплений и реакций лигирования с получением промежуточного вектора для клонирования, содержащий кодирующий участок FVIII с удалённым В-доменом (УВД) с соединением от серина 743 (S743) до глутамина 1638 (Q1638), с удалением 2682 оснований из В-домена полноразмерного FVIII. Последовательность участка Fc IgG1 человека (например, номер доступа Genbank Y14735) был получен методом ПЦР из библиотеки кДНК лейкоцитов, и конечная кассета экспрессии была создана таким образом, чтобы последовательность УВД FVIII была непосредственно соединена с N-терминальным концом последовательности Fc (шарнирная область, СН2- и СН3-домены, начало с D221 последовательности IgG1, нумерация EU) без промежуточного линкера. Для экспрессии только одной Fc-цепи из синтетических олигонуклеотидов создали сигнальную последовательность I $\kappa$ к (каппа) мыши и добавили её, используя ПЦР, к кодирующей последовательности Fc для обеспечения секреции этого белкового препарата. Кодированные последовательности FVIII<sub>Fc</sub> и цепи

Fc были клонированы в векторе двойной экспрессии pBudCE4.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Клеткам HEK 293H (Invitrogen, Carlsbad, CA) с помощью агента для трансфекции Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA) трансфекцией была введена плазида pSYN-FVIII-013. И стабильная клеточная линия была отобрана с помощью зеоцина. Клетки выращивали в бессывороточной суспензионной культуре и белок rFVIII<sub>Fc</sub> очистили от осветлённой среды накопления при использовании процесса очистки на четырёх колонках, включающем стадию аффинной очистки, специфической для FVIII (McCue J. и др., *J. Chromatogr. A.*, 1216(45): 7824-30 (2009)), с последующей комбинацией анион-обменных колонок и колонки для разделения при помощи гидрофобных взаимодействий.

Пример 2. Определение параметров белка rFVIII<sub>Fc</sub>.

(а) Биохимические параметры.

Процессированный рекомбинантный белок FVIII-Fc (rFVIII<sub>Fc</sub>) был синтезирован в виде двух полипептидных цепей, одна цепь состоит из УВД FVIII (соединение S743-Q1638, 1438 аминокислоты), соединённым с Fc-доменом (шарнирная область, домены CH2 и CH3) IgG1 (226 аминокислоты, простирающаяся от остатка D221 до остатка G456, нумерация EU) общей длиной 1664 аминокислоты, вторая цепь состоит из того же единственного Fc-участка (226 аминокислот). Хотя клетки, изменённые трансфекцией с помощью плазмиды двойной экспрессии FVIII<sub>Fc</sub>/Fc, ожидаемо могли секретировать три продукта (димер FVIII<sub>Fc</sub>, мономер FVIII<sub>Fc</sub> и димер Fc), в кондиционированной среде были обнаружены только мономер FVIII<sub>Fc</sub> и димер Fc. Очищенный белок FVIII<sub>Fc</sub> был проанализирован в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях с помощью электрофореза в ПААГ с ДДС (SDS-PAGE) (фиг. 2А и 2В). При электрофорезе в ПААГ с ДДС в невосстанавливающих условиях были обнаружены полосы, мигрирующие с массами приблизительно 90 и 130 кДа, состоявшие из белков прогнозируемых молекулярных масс: тяжёлой цепи (НС) FVIII<sub>Fc</sub> и лёгкой цепи - димерного соединения Fc (LCFc<sub>2</sub>) (фиг. 2А, дорожка 3). Третья полоса также была обнаружена с массой приблизительно 220 кДа, состоявшая из прогнозируемой молекулярной массы одноцепочечного FVIII<sub>Fc</sub> (SC FVIII<sub>Fc</sub>; НС+LCFc<sub>2</sub>), в котором остаток аргинина в положении 754 (1648 в соответствии с полной длиной последовательности) не был расщеплён во время секреции. При электрофорезе в ПААГ с ДДС в восстанавливающих условиях были видны основные полосы, мигрирующие с массами приблизительно 25, 90, 105 и 195 кДа, состоявшие из белков прогнозируемых молекулярных масс: одноцепочечного Fc, тяжёлой цепи НС, лёгкой цепи LCFc и SC FVIII<sub>Fc</sub> (фиг. 2В, дорожка 3). Котрансфекция с РС5 человека, представителя типа протеаз пропротеинконвертазы субтилизин/кексина (PCSK), привела к полному процессингу препарата rFVIII<sub>Fc</sub> (фиг. 2А, 2В, дорожка 2).

Денсиметрический анализ нескольких серий rFVIII<sub>Fc</sub> при анализе в ПААГ с ДДС показал более чем 98% чистоты ожидаемых полос белков. Эксклюзионная хроматография (SEC) также использовалась для оценки степени имеющейся агрегации, и было обнаружено, что все серии имеют степени агрегации на уровне 0,5% или менее. Структура молекулы rFVIII<sub>Fc</sub> была дополнительно проанализирована расщеплением тромбином, восстановлением и анализом методами ЖХ/УФ и ЖХ/МС. Четыре фрагмента FVIII образовались после обработки тромбином (расщеплением трёх аргининовых остатков в положениях 372, 740 и 795; остаток 795 отвечает остатку 1689 соответствующей полноразмерной последовательности FVIII), которые обнаруживались по УФ-поглощению (фиг. 2С), соответствовали следующим сегментам белка: Fc (пик 1), одноцепочечный Fc (пик 2), А1-домен тяжёлой цепи (пик 3) и А2-домен тяжёлой цепи (пик 4). Линкер В-домена из 14 аминокислот и α3-связанные пептиды массой ~ 6 кДа не обнаруживались по УФ-поглощению из-за их малых размеров.

Полипептид rFVIII<sub>Fc</sub>, полученный без котрансфектированных ферментов процессинга, оказался содержащим 15-25% одноцепочечного FVIII<sub>Fc</sub> (SC FVIII<sub>Fc</sub>), который отличался от процессированного белка rFVIII<sub>Fc</sub> единственной пептидной связью между остатками R754 и E755 (R1648/E1649 в соответствии с полноразмерной молекулой FVIII). Эта изоформа была очищена и охарактеризована всеми описанными выше биохимическими методами исследования, и было обнаружено, что она сравнима с белком rFVIII<sub>Fc</sub>, как показано ниже. Найдено, что активность очищенного одноцепочечного белка FVIII<sub>Fc</sub> сходна с активностью rFVIII<sub>Fc</sub> в хромогенном анализе, а также при проведении различных функциональных анализов, описанных ниже.

(b) Измерение активности FVIII хромогенным и одностадийным aPTT анализами.

Активность FVIII измерялась хромогенным анализом. Средняя удельная активность четырёх различных серий rFVIII<sub>Fc</sub> найдена равной 9762±449 МЕ/мг при определении хромогенным анализом, что соответствует концентрации 2148±99 МЕ/нмоль. Активность FVIII одноцепочечного белка FVIII:Fc также измерялась хромогенным анализом и сравнивалась с активностью полностью процессированных молекул rFVIII<sub>Fc</sub> или rFVIII<sub>Fc</sub> DS (двухцепочечный белок, содержащий около 25% одноцепочечного rFVIII<sub>Fc</sub>). Как показано в табл. 3А, одноцепочечный rFVIII<sub>Fc</sub> не выявил значительного отличия активности FVIII по сравнению с активностью FVIII полностью процессированного FVIII<sub>Fc</sub> или rFVIII<sub>Fc</sub> DS при определении хромогенным анализом в присутствии и в отсутствии фактора фон Виллебранда (VWF). В табл. 3В показано, что полная активность SC rFVIII<sub>Fc</sub> наблюдалась в отсутствии VWF при измерении одностадийным анализом времени частичной активации тромбопластина (aPTT).

Таблица 3А. Активность FVIII хромогенным анализом

Среда	Образец	Удельная активность хромогенным анализом (МЕ/мг)	КВ*, %
Плазма с удалённым FVIII	гFVIIIcDS (25% чистого белка) (RECD-19189-09-013)	9066	2,49
	Одноцепочечный гFVIIIc (очищенный от RECD 19189-09-013)	8194	2,72
	Полностью процессированный гFVIIIc (очищенный, генноинженерная клеточная линия)	9577	8,34
Плазма с удалёнными FVIII и VWF	гFVIIIcDS (25% чистого белка) (RECD-19189-09-013)	10801	8,92
	Одноцепочечный гFVIIIc (очищенный от RECD 19189-09-013)	9498	4,70
	Полностью процессированный гFVIIIc (очищенный, генноинженерная клеточная линия)	9569	4,54

\*КВ - коэффициент вариации.

Таблица 3В. Активность FVIII aPTT анализом

Среда	Образец	Коагуляционная (aPTT) удельная активность (МЕ/мг)	КВ, %
Плазма с удалённым FVIII	гFVIIIcDS (25% чистого белка) (RECD-19189-09-013)	8210	5,88
	Одноцепочечный гFVIIIc (очищенный от RECD 19189-09-013)	3108	6,57
	Полностью процессированный гFVIIIc (очищенный, генноинженерная клеточная линия)	8683	3,57
Плазма с удалёнными FVIII и VWF	гFVIIIcDS (25% чистого белка) (RECD-19189-09-013)	15621	6,47
	Одноцепочечный гFVIIIc (очищенный от RECD 19189-09-013)	13572	2,41
	Полностью процессированный гFVIIIc (очищенный, генноинженерная клеточная линия)	15170	10,42

(с) Активность в комплексе X-азы.

Активность FVIII была также измерена в окружении комплекса X-азы путём инкубации активированного FIX и тромбин-активированного препарата REFACTO® или белка гFVIIIc на фосфолипидной поверхности в присутствии кальция и наблюдении за конверсией факторов FX в FXa с измерением расщепления хромогенным или флуорогенным субстратом, при этом определялись скорости образования FXa. Потом этот анализ был модифицирован варьированием одного компонента анализа с сохранением всех остальных на постоянном уровне для того, чтобы проверить взаимодействия с каждым отдельным компонентом.

Скорость образования FXa была определена в виде функции разных концентраций фосфолипидов для белков гFVIIIc DS, гBDD FVIII и одноцепочечного гFVIIIc (фиг. 3А), используя синтетические фосфолипидные везикулы (25% фосфатидилсерина/75% фосфатидилхолина). Было обнаружено, что оба белка обладали схожим профилем активности с пиком активности при примерной концентрации фосфолипидов 156 мкМ.

Скорость образования FXa далее была определена в виде функций разных концентраций FX и рассчитаны значения  $K_m$  и  $V_{max}$  (фиг. 3В). Было найдено, что профили активности гFVIIIc DS, гУВД FVIII и одноцепочечного гFVIIIc сходны, с подобными значениями  $K_m$  и  $V_{max}$  (табл. 4). Наконец, скорость образования FXa была определена в виде функций разных концентраций FIX (фиг. 3С). Их профили активности выявились сходными с подобными значениями  $K_m$  и  $V_{max}$  (табл. 5). Сходные результаты были получены с использованием тромбоцитов как источника фосфолипидов (неопубликованные данные, июнь

2009).

Таблица 4. Параметры образования FXa для белков FVIII в зависимости от содержания фосфолипидов

Источник липидов	Молекула	Km (нМ)	Vmax (нМ/мин)
25% PS-75% PC	rFVIIIc DS	55,0 ± 5,9	65,6 ± 8,6
	гУВД FVIII	51,0 ± 8,7	73,5 ± 10,1
	NP rFVIIIc	53,2 ± 7,5	56,0 ± 13,8

Таблица 5. Взаимодействие FIXa с белками FVIII

Источник липидов	Молекула	Km (нМ)	Vmax (нМ/мин)
25% PS-75% PC	rFVIIIc DS	2,8 ± 0,4	4,5 ± 0,3
	гУВД FVIII	2,5 ± 0,3	4,0 ± 1,0
	NP rFVIIIc	2,3 ± 0,2	3,8 ± 0,4

## (d) Инактивация APC.

После активации FVIII инактивируется при расщеплении активированным белком C (APC), а также при диссоциации домена A2. Препараты rFVIIIc и гУВД FVIII были активированы тромбином, после чего их инкубировали с APC разное время и определяли активность анализом образования FXa (фиг. 4). Без активации тромбином было обнаружено небольшое образование FXa и его образование значительно возрастало после расщепления тромбином. Обработка APC в течение 90 мин вела к значительному уменьшению скоростей образования FXa, сходному с неактивированными образцами, и эти результаты были подобны для белков rFVIIIc DS, гУВД FVIII и одноцепочечного rFVIIIc.

## (e) Аффинность к vWF.

Взаимодействия FVIII с фактором фон Виллебранда (vWF) измеряли анализом биомолекулярных взаимодействий в масштабе реального времени (BIAcore), основанного на технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR), для определения кинетики связывания rFVIIIc и гУВД FVIII к vWF (табл. 6). Кинетические параметры  $K_a$  (ассоциации),  $K_d$  (диссоциации) и аффинности  $K_D$  ( $K_d/K_a$ ) были определены для каждого взаимодействия FVIII в идентичных условиях. Найдено, что белки rFVIIIc и гУВД FVIII обладают аффинностью связывания ( $K_D$ ) к vWF при низкой концентрации в нМ, соответственно,  $1,64 \pm 0,37$  и  $0,846 \pm 0,181$  нМ. Эти белки обладают схожими скоростями диссоциации с двухкратным отличием в скорости ассоциации, приводящим к двухкратному отличию в аффинности.

Таблица 6. Анализ связывания белков FVIII с vWF методом BIAcore

Аналит	Лиганд	N	Кинетические параметры		Диссоциация/ассоциация
			Ассоциация (M-1s-1)	Диссоциация (s-1)	KD(M)
rFVIIIc DS	hvWF	5	$7,92 \pm 1,51 \times 10^5$	$1,25 \pm 1,12 \times 10^{-3}$	$1,64 \pm 0,37 \times 10^{-9}$
NP rFVIIIc	hvWF	5	$8,66 \pm 1,10 \times 10^5$	$1,09 \pm 0,09 \times 10^{-3}$	$1,28 \pm 0,22 \times 10^{-9}$
гУВД FVIII	hvWF	5	$13,7 \pm 1,50 \times 10^5$	$1,14 \pm 0,12 \times 10^{-3}$	$0,846 \pm 0,181 \times 10^{-9}$

Как показано в табл. 6, была обнаружена аффинность rFVIIIc DS или одноцепочечного rFVIIIc к vWF в диапазоне низких значений концентраций нМ, приблизительно в два раза больше чем самого белка УВД FVIII. В физиологических концентрациях это явление может привести к небольшому увеличению процентного количества rFVIIIc (процессированный или одноцепочечный), образующего комплекс с vWF, по сравнению со свободным FVIII. Однако исследования *in vivo* показали, что период полувыведения rFVIIIc значительно пролонгирован по сравнению с полноразмерным или УВД FVIII, несмотря на его немного меньшую аффинность. Поэтому этот показатель не повлияет на период полувыведения данной молекулы. Свободный белок rFVIIIc может более эффективно рециркулировать посредством механизма с участием рецепторов FcRn и, следовательно, это приведёт к большему пролонгированию периода полувыведения.

## Пример 3. Клинические испытания белка rFVIIIc, фазы I/IIa.

Открытое, многоцентровое, перекрёстное исследование фаз I/IIa с повышением дозы, впервые проводимое на человеке, было разработано для оценки безопасности, переносимости и фармакинетики разовой дозы белка rFVIIIc у пациентов с серьёзной (определена как  $<1$  МЕ/дл [1%] эндогенного FVIII [FVIII]) гемофилией А. Приблизительно 12 ранее лечившихся пациентов было вовлечено в исследование, они получали дозы rFVIIIc по 25 или 65 МЕ/кг. После проведения скрининга (проводился в течение 28 суток перед получением первой дозы препарата ADVATE® [rFVIII], референтный препарат сравнения) и при минимум 4-суточном (96 ч) проществе времени без лечения FVIII перед первой инъекцией, приблизительно 6 пациентов получили однократную дозу в 25 МЕ/кг препарата ADVATE® с последующим получением профиля фармакинетики (PK) с последующей заменой препарата и введением разовой дозы rFVIIIc без использования плацебо для получения PK-профиля в течении 7 суток (168 ч). Первые три пациента получали дозы последовательно. Первым трём (3) пациентам вводили rFVIIIc в дозах 25 МЕ/кг, каждый пациент проходил проверку на наличие ингибиторов в течение 14 суток (336 ч) после инъекции препарата rFVIIIc. Введение дозы следующему пациенту (только касательно первых трёх пациентов) проводилось сразу, как только завершалось исследование на наличие ингибиторов. После того

как третий пациент прошёл 14-суточную оценку на наличие ингибиторов, оставшиеся три пациента принимали 25 МЕ/кг препарата, а другие 6 пациентов - 65 МЕ/кг препарата, началось последовательное вовлечение каждой группы дозирования, по крайней мере, с 1-суточной отсрочкой.

Через одну неделю после того как последний пациент получил дозу rFVIII<sub>IFc</sub> 25 МЕ/кг, приблизительно 6 отдельных пациентов были вовлечены в группу, принимавшую дозу 65 МЕ/кг. Каждый субъект в группе, получавшей 65 МЕ/кг препарата, получил разовую дозу 65 МЕ/кг препарата Advate® с последующей оценкой РК-профиля в течение 4 суток (96 ч), потом проведена замена препарата и введение однократной дозы 65 МЕ/кг rFVIII<sub>IFc</sub> без использования плацебо для оценки профиля в течение 10 суток (240 ч). Если случай кровотечения происходил перед первой инъекцией rFVIII<sub>IFc</sub> в какой-либо группе, то для лечения использовали препарат FVIII, применявшийся для пациента перед исследованием, и перед получением первой инъекции белка rFVIII<sub>IFc</sub> для оценки РК-профиля должен был пройти период времени, составляющий по крайней мере 4 суток. Все пациенты проходили последующий 14-суточный период (336 ч) и 28-суточный период оценки безопасности препарата после введения доз rFVIII<sub>IFc</sub> 25 и 65 МЕ/кг для оценки безопасности. У всех субъектов исследования в введенные временные точки отбирали образцы крови для оценки фармакокинетики препарата перед и после получения ими доз препаратов вместе с анализами проб крови на активность FVIII. Для белка FVIII<sub>IFc</sub> были продемонстрированы следующие результаты оценки фармакокинетических данных фазы I/IIa клинического испытания. Препарат FVIII<sub>IFc</sub> показал около 50% увеличение системного воздействия ( $AUC_{INF}$ ), около 50% снижение клиренса (Cl) и около 50-70% повышение периода полувыведения и среднего времени удержания (MRT) препарата по сравнению с препаратом ADVATE® (полноразмерным белком rFVIII). Кроме того, белок FVIII<sub>IFc</sub> повысил уровни показателей C168, TBLP1, TBLP3 и TBLP5 по сравнению с препаратом ADVATE®. Измененные параметры РК были такие:

$AUC_{INF}$  - площадь под кривой концентрация-время в интервале времени от нуля до бесконечности;

$\beta$ -HL - фаза периода полувыведения, также обозначаемая как  $t_{1/2\beta}$ ;

C168 - оценочная активность FVIII<sub>IFc</sub> выше базового уровня приблизительно через 168 ч после дозирования;

Cl - клиренс;

MRT - среднее время удержания;

TBLP1 - прогнозируемое моделированное время после получения дозы препарата, когда активность FVIII<sub>IFc</sub> снизилась до приблизительно значения на 1 МЕ/дл больше исходного значения;

TBLP3 - прогнозируемое моделированное время после получения дозы препарата, когда активность FVIII<sub>IFc</sub> снизилась до приблизительно значения на 3 МЕ/дл больше исходного значения;

TBLP5 - прогнозируемое моделированное время после получения дозы препарата, когда активность FVIII<sub>IFc</sub> снизилась до приблизительно значения на 5 МЕ/дл больше исходного значения.

Пример 4. Фармакокинетические (PK) испытания белка rFVIII<sub>IFc</sub>.

Рекомбинантный белок слияния с удалённым В-доменом (rFVIII<sub>IFc</sub>) был создан как реализация способа продления периода полувыведения фактора FVIII. Параметры фармакокинетики rFVIII<sub>IFc</sub> сравнили с препаратом rFVIII у мышей с гемофилией А. Конечный период полувыведения для белка rFVIII<sub>IFc</sub> был в два раза большим по сравнению с периодом для rFVIII. С целью подтверждения того, что лежащий в основе механизм продолжения периода полувыведения был связан с защитой rFVIII<sub>IFc</sub> рецепторами FcRn, PK-исследование было проведено при нокауте генов FcRn и на трансгенных мышках с FcRn человека (hFcRn).

Вводили однократную внутривенную дозу (125 МЕ/кг) и измеряли концентрации в плазме с использованием хромогенного анализа. Для препаратов rFVIII<sub>IFc</sub> и rFVIII (XYNTHA®)  $C_{max}$  были сходными для обеих линий мышей. Однако если период полувыведения для rFVIII<sub>IFc</sub> был сравнимым с таким для rFVIII у мышей с нокаутом генов FcRn, то период полувыведения для rFVIII<sub>IFc</sub> был определён приблизительно в два раза большим, чем такой период для rFVIII у трансгенных мышей с генами hFcRn. Эти результаты подтвердили, что рецепторы FcRn выступают посредниками или отвечают за пролонгированный период полувыведения rFVIII<sub>IFc</sub> по сравнению с препаратом rFVIII. Поскольку гемостаз цельной крови измерялся с помощью ротационной тромбоэластометрии (ROTEM®), то была показана корреляция с эффективностью факторов коагуляции на моделях кровотечений мышей с гемофилией, а также клинические применения, которые мы искали для оценки эффективности *ex vivo* rFVIII<sub>IFc</sub> у мышей с гемофилией А, используя метод ROTEM®.

Мышам с гемофилией А вводили однократные внутривенные дозы по 50 МЕ/кг препаратов rFVIII<sub>IFc</sub>, XYNTHA® (FVIII) или ADVATE® (FVIII). Через 5 мин после получения дозы образование сгустка было подобным в отношении времени свёртывания крови (СТ), времени образования сгустка (CFT) и  $\alpha$ -угла. Тем не менее, препарат rFVIII<sub>IFc</sub> показал значительное улучшение СТ через 72 и 96 ч после получения дозы. Показатели CFT и  $\alpha$ -угла были также улучшены по сравнению с обоими препаратами XYNTHA® (FVIII) и ADVATE® (FVIII), что согласуется с пролонгированной РК препарата rFVIII<sub>IFc</sub>. Эти результаты указывают на то, что rFVIII<sub>IFc</sub> обладает определённым механизмом действия, который приводит к повышению периода полувыведения и обеспечивает пролонгированную защиту от кровотечений.

Пример 5. Результаты клинических испытаний фаз I/IIa белка rFVIII<sub>IFc</sub>.

В этом примере представлены финальные результаты анализа активности FVIII, опеределённой у 16 пациентов, получавших лечение препаратами FVIII в дозах 25 и 65 МЕ/кг. См. пример 3. rFVIII-Fc представляет собой рекомбинантный белок слияния, состоящий из единой молекулы рекомбинантного FVIII человека с удалённым В-доменом (rFVIII-УВД), соединённой с димерным Fc-доменом IgG1 человека без промежуточной линкерной последовательности. Этот гибридный полипептид, также именуемый в этой заявке как гетеродимерный гибридный белок FVIII-Fc, белок слияния FVIII-Fc с мономерным Fc, гибридный мономерного белка FVIII-Fc, мономерный гибридный белок FVIII-Fc и мономер-димер FVIII-Fc. См. пример 1, фиг. 1 и табл. 2А.

Доклинические исследования белка rFVIII-Fc показали примерно 2-кратное пролонгирование периода полувыведения активности rFVIII по сравнению с коммерчески доступными препаратами rFVIII. Рациональным объяснением этого исследования была оценка безопасности и переносимости однократной дозы rFVIII-Fc в виде замороженного жидкого препарата и получение данных РК у пациентов, страдающих серьёзной гемофилией. В этом исследовании 16 пригодных для оценивания пациентов были привлечены для определения РК. Однократное введение двух доз обоих препаратов rFVIII-Fc и ADVATE® в номинальных дозах 25 (n=6) и 65 МЕ/кг массы тела (n=10) проводилось внутривенной инфузией в течение приблизительно 10 мин. Образцы крови для оценки РК препаратов в плазме отбирали перед инфузией, а также после 10 дней после введения доз. Показатели РК активности FVIII для обоих препаратов ADVATE® и rFVIII-Fc были охарактеризованы в этом исследовании с использованием зависимого модельного исследования.

#### Цели исследования.

Первоначальной целью этого исследования была оценка безопасности и переносимости однократного введения обеих доз препарата rFVIII-Fc (25 и 65 МЕ/кг) у предварительно лечившихся пациентов (ПВП) в возрасте 12 лет и выше с серьёзной гемофилией А. Второстепенной целью исследования было определение параметров фармакокинетики (РК), измеряемых по фармакодинамической (PD) активности FVIII в течение периода времени после однократного введения 25-65 МЕ/кг rFVIII-Fc по сравнению с препаратом ADVATE® при одностадийном анализе образования сгустка и хромогенном анализе.

План исследования (см. пример 3).

Образцы крови отбирали для оценки РК параметров активности FVIII при посещении пациента в ходе проведения скрининга (в интервале 28 дней перед введением дозы ADVATE®); на 0 день (введение ADVATE®) перед инъекцией и через 10 и 30 мин и 1, 3, 6 и 9 ч после инъекции; на 1 день через 24 ч после инъекции ADVATE®; на 2 день через 48 ч после инъекции ADVATE®; на 3 день через 72 ч после инъекции ADVATE®; и на 4 день через 96 ч после инъекции высокой дозы ADVATE® (только группа В).

Образцы крови отбирали для оценки РК параметров активности FVIII в день введения rFVIII-Fc перед введением препарата rFVIII-Fc через 10 и 30 мин и 1, 3, 6 и 9 ч после инъекции rFVIII-Fc; на 1 день через 24 ч после инъекции rFVIII-Fc; с 2 по 5 дни через 48, 72, 96 и 120 ч после инъекции ADVATE®; на 7 день через 168 ч после инъекции rFVIII-Fc; и на 8,9 и 10 дни через 192, 216 и 240 ч после инъекции высокой дозы rFVIII-Fc (только группа В). Активность FVIII была также измерена при последнем посещении в ходе исследования (28 дней после инъекции rFVIII-Fc) через 672 ч после введения rFVIII-Fc.

Фармакокинетическое моделирование.

Аббревиатуры.

TBLP1 - прогнозируемое моделированное время после получения дозы препарата, когда активность FVIII снизилась до приблизительно значения на 1 МЕ/дл больше исходного значения;

TBLP3 - прогнозируемое моделированное время после получения дозы препарата, когда активность FVIII снизилась до приблизительно значения на 3 МЕ/дл больше исходного значения.

Расчёты.

$KV\_M = C_{max\_M} / \text{Действительная доза (МЕ/кг)}$ ;

$KV\_OB = C_{max\_OB} / \text{Действительная доза (МЕ/кг)}$ ;

$IVR\_M = 100 \times C_{max\_M} \times \text{Объём плазмы (дл)} / \text{Общая доза в МЕ}$ ; где объём плазмы в мл =  $(23,7 \times \text{Рост в см}) + (9,0 \times \text{Вес в кг}) - 1709$ ;

$IVR\_OB = 100 \times C_{max\_OB} \times \text{Объём плазмы (дл)} / \text{Общая доза в МЕ}$ ; где объём плазмы в мл =  $(23,7 \times \text{Рост в см}) + (9,0 \times \text{Вес в кг}) - 1709$ .

Результаты.

(а) Фармакокинетика однократного введения (одностадийный анализ).

Наблюдаемая активность FVIII резко возрасла вскоре после в/в инфузии препаратов ADVATE® или rFVIII-Fc со средними значениями  $C_{max}$ , предсказанными в модели ( $\pm CO$ ), равными  $56,6 \pm 4,74$  и  $121 \pm 28,2$  МЕ/дл, для препарата ADVATE® и  $55,6 \pm 8,18$  и  $108 \pm 16,9$  МЕ/дл для rFVIII-Fc для групп, соответственно, получавших дозы 25 и 65 МЕ/кг. У всех пациентов, лечившихся препаратами ADVATE® и rFVIII-Fc, были дозозависимые увеличения активности FVIII. Наблюдаемое увеличение значений  $C_{max}$  и  $AUC_{INF}$  было немного меньше, чем пропорциональные дозе значения в пределах оцененного диапазона доз.

После завершения инфузии снижение наблюдаемой активности выявило моноэкспоненциальные характеристики снижения активности до достижения исходного уровня. Скорость снижения активности

FVIII была меньше для гFVIIIФс, чем для препарата ADVATE® со средними прогнозируемыми модельными значениями периода полувыведения ( $\pm$ CO), равными 11,9 $\pm$ 2,98 и 10,4 $\pm$ 3,03 ч, для препарата ADVATE® и 18,0 $\pm$ 3,88 и 18,4 $\pm$ 6,99 ч для гFVIIIФс для групп, соответственно, получавших дозы 25 и 65 МЕ/кг. Значения периодов полувыведения оказались дозозависимыми в диапазоне доз, оценённом для обоих препаратов FVIII.

Общее системное воздействие (оценивалось по  $AUC_{INF}$ ) было на ~ 48 и 61% больше после введения препарата гFVIIIФс, чем ADVATE®, соответственно, для уровней доз 25 и 65 МЕ/кг. Средние прогнозируемые модельные значения  $AUC_{INF}$  ( $\pm$ CO) составили 974 $\pm$ 259 и 1810 $\pm$ 606 ч·МЕ/дл для препарата ADVATE® и 1440 $\pm$ 316 и 2910 $\pm$ 1320 ч·МЕ/дл для гFVIIIФс, соответственно, для групп, получавших дозы 25 и 65 МЕ/кг. Подобно значениям периода полувыведения значения MRT для гFVIIIФс также были пролонгированы по сравнению с препаратом ADVATE®. Средние прогнозируемые модельные значения MRT ( $\pm$ CO) были равны 17,1 $\pm$ 4,29 и 14,9 $\pm$ 4,38 ч для препарата ADVATE® и 25,9 $\pm$ 5,60 и 26,5 $\pm$ 10,1 ч для гFVIIIФс для групп, соответственно, получавших дозы 25 и 65 МЕ/кг. Значения MRT оказались дозозависимыми в диапазоне доз, оценённом для обоих препаратов FVIII.

Дополнительно были определены первичные параметры PK значений CL и V. Значения CL для белка гFVIIIФс составили только ~66% от таких значений, наблюдаемых для эквивалентных доз ADVATE®. Средние прогнозируемые модельные значения CL ( $\pm$ CO) были равны 2,70 $\pm$ 0,729 и 4,08 $\pm$ 1,69 мл/ч/кг для препарата ADVATE® и 1,80 $\pm$ 0,409 и 2,69 $\pm$ 1,25 мл/ч/кг для гFVIIIФс для групп, соответственно, получавших дозы 25 и 65 МЕ/кг. Значения V сравнивали для препаратов ADVATE® и гFVIIIФс со средними прогнозируемыми модельными значениями V ( $\pm$ CO), равными 43,9 $\pm$ 4,27 и 56,1 $\pm$ 13,4 мл/кг для препарата ADVATE® и 45,3 $\pm$ 7,23 и 61,6 $\pm$ 10,6 мл/кг для гFVIIIФс для групп, соответственно, получавших дозы 25 и 65 МЕ/кг. С возрастанием дозы ADVATE® и гFVIIIФс были отмечены небольшие увеличения значений CL и V. Однако возрастание стандартных отклонений (CO) для дозы 65 МЕ/кг сочеталось с ограниченными уровнями доз, помешавшими оценить дозозависимый характер этих параметров. Например, KV в % среднего геометрического значения CL для группы, лечившейся препаратом гFVIIIФс, возрос с 23,0% (25 МЕ/кг) до 48,6% (65 МЕ/кг).

Кроме первичных параметров PK для оценки продолжительности действия FVIII были определены вторичные параметры PK (например, K-значения, снижение объёма инфузии (IVR) и т.д.). Наблюдали также доказательство отличия PK для гFVIIIФс, продемонстрированное увеличенными значениями TBLP1 и TBLP3 по сравнению с препаратом ADVATE®, введённом в эквивалентных дозах. IVR и K-значения для препаратов ADVATE® и гFVIIIФс оказались сравнимыми. Небольшое увеличение значений TBLP1 и TBLP3 наблюдалось с увеличением доз препаратов ADVATE® и гFVIIIФс. Напротив, с увеличением доз препаратов ADVATE® и гFVIIIФс было отмечено небольшое увеличение средних значений IVR и K-значений. Как указано ранее, оценивание дозозависимости этих параметров осложнено ограниченными уровнями доз.

Средние наблюдаемые значения TBLP1 ( $\pm$ CO) были равны 2,88 $\pm$ 0,733 и 2,93 $\pm$ 0,848 МЕ/дл на МЕ/кг для препарата ADVATE® и 4,28 $\pm$ 0,873 и 5,16 $\pm$ 2,02 МЕ/дл на МЕ/кг для гFVIIIФс для групп, соответственно, получавших дозы 25 и 65 МЕ/кг. Средние наблюдаемые значения TBLP3 ( $\pm$ CO) были равны 2,06 $\pm$ 0,527 и 2,26 $\pm$ 0,666 МЕ/дл на МЕ/кг для препарата ADVATE® и 3,09 $\pm$ 0,623 и 3,93 $\pm$ 1,59 МЕ/дл на МЕ/кг для гFVIIIФс для групп, соответственно, получавших дозы 25 и 65 МЕ/кг.

Средние значения IVR и K-значений рассчитаны с помощью значений  $C_{max}$  (с вычитанием значений исходного уровня и остаточной активности лекарств в рамках модели) в основном были больше значений, определённых с помощью прогнозируемых модельных значений  $C_{max}$ ; что согласуется с небольшой недооценкой наблюдаемой пиковой активности, определяемой с помощью однокамерной модели. Средние наблюдаемые K-значения ( $\pm$ CO) были равны 2,57 $\pm$ 0,198 и 2,13 $\pm$ 0,598 МЕ/дл на МЕ/кг для препарата ADVATE® и 2,46 $\pm$ 0,330 и 1,85 $\pm$ 0,332 МЕ/дл на МЕ/кг для гFVIIIФс для групп, соответственно, получавших дозы 25 и 65 МЕ/кг. Средние наблюдаемые значения IVR ( $\pm$ CO) были равны 94,1 $\pm$ 15,6 и 85,8 $\pm$ 16,5% для препарата ADVATE® и 89,5 $\pm$ 11,9 и 74,8 $\pm$ 6,72% для гFVIIIФс для групп, соответственно, получавших дозы 25 и 65 МЕ/кг.

(b) Фармакокинетика однократного введения (хромогенный анализ).

Наблюдаемая активность FVIII резко возросла вскоре после в/в инфузии препаратов ADVATE® или гFVIIIФс со средними значениями  $C_{max}$ , предсказанными в модели ( $\pm$ CO), равными 70,2 $\pm$ 9,60 и 157 $\pm$ 38,6 МЕ/дл, для препарата ADVATE® и 70,3 $\pm$ 10,0 и 158 $\pm$ 34,7 МЕ/дл для гFVIIIФс для групп, соответственно, получавших дозы 25 и 65 МЕ/кг.

У всех пациентов, лечившихся препаратами ADVATE® и гFVIIIФс, были дозозависимые увеличения активности FVIII. Наблюдаемое увеличение значений  $C_{max}$  и  $AUC_{INF}$  были немного меньше чем пропорциональные дозе значения в пределах оценённого диапазона доз.

После завершения инфузии снижения наблюдаемой активности выявило моноэкспоненциальные характеристики снижения до достижения исходного уровня. Скорость снижения активности FVIII была меньше для гFVIIIФс, чем для препарата ADVATE® со средними прогнозируемыми модельными значе-

ниями периода полувыведения ( $\pm CO$ ), равными  $10,7 \pm 1,98$  и  $10,3 \pm 3,27$  ч для препарата ADVATE® и  $16,2 \pm 2,92$  и  $19,0 \pm 7,94$  ч для гFVIIIФс для групп, соответственно, получавших дозы 25 и 65 МЕ/кг. Значения периодов полувыведения оказались дозозависимыми в диапазоне доз, оценённом для обоих препаратов FVIII.

Общее системное воздействие (оценивалось по  $AUC_{INF}$ ) было на  $\sim 53$  и  $84\%$  больше после введения препарата гFVIIIФс, чем ADVATE®, соответственно, для уровней доз 25 и 65 МЕ/кг. Средние прогнозируемые модельные значения  $AUC_{INF}$  ( $\pm CO$ ) составили  $1080 \pm 236$  и  $2320 \pm 784$  ч·МЕ/дл для препарата ADVATE® и  $1650 \pm 408$  и  $4280 \pm 1860$  ч·МЕ/дл для гFVIIIФс, соответственно, для групп, получавших дозы 25 и 65 МЕ/кг. Подобно значениям периода полувыведения значения MRT для гFVIIIФс также были пролонгированы по сравнению с препаратом ADVATE®. Средние прогнозируемые модельные значения MRT ( $\pm CO$ ) были равны  $15,3 \pm 2,86$  и  $14,8 \pm 4,72$  ч для препарата ADVATE® и  $23,4 \pm 4,22$  и  $27,3 \pm 11,4$  ч для гFVIIIФс для групп, соответственно, получавших дозы 25 и 65 МЕ/кг. Значения MRT оказались дозозависимыми в диапазоне доз, оценённом для обоих препаратов FVIII.

Дополнительно были определены первичные параметры PK значений CL и V. Значения CL для белка гFVIIIФс составили только  $\sim 58$ - $66\%$  от таких значений, наблюдаемых для эквивалентных доз ADVATE®. Средние прогнозируемые модельные значения CL ( $\pm CO$ ) были равны  $2,39 \pm 0,527$  и  $3,21 \pm 1,40$  мл/ч/кг для препарата ADVATE® и  $1,57 \pm 0,349$  и  $1,86 \pm 0,970$  мл/ч/кг для гFVIIIФс для групп, соответственно, получавших дозы 25 и 65 МЕ/кг. Значения V сравнивали для препаратов ADVATE® и гFVIIIФс со средними прогнозируемыми модельными значениями V ( $\pm CO$ ), равными  $35,8 \pm 5,52$  и  $43,6 \pm 11,2$  мл/кг, для препарата ADVATE® и  $35,9 \pm 6,65$  и  $42,7 \pm 8,91$  мл/кг для гFVIIIФс для групп, соответственно, получавших дозы 25 и 65 МЕ/кг. С возрастанием дозы для препаратов ADVATE® и гFVIIIФс были отмечены увеличения значений CL и V. Однако возрастание стандартных отклонений (CO) для дозы 65 МЕ/кг сочеталось с ограниченными уровнями доз, помешавшими оценить дозозависимый характер этих параметров.

Кроме первичных параметров PK для оценки продолжительности действия FVIII были определены вторичные параметры PK (например, K-значения, снижение объёма инфузии (IVR) и т.д.). Наблюдали также свидетельство отличия PK для гFVIIIФс, продемонстрированное увеличенными значениями TBLP1 и TBLP3, от препарата ADVATE®, введённого в эквивалентных дозах. IVR и K-значения для препаратов ADVATE® и гFVIIIФс оказались сравнимыми.

Небольшое увеличение значений TBLP1 и TBLP3 наблюдалось с увеличением доз препаратов ADVATE® и гFVIIIФс. Напротив, с увеличением доз препаратов ADVATE® и гFVIIIФс было отмечено небольшое увеличение средних значений IVR и K-значений. Как указывалось ранее, оценивание дозозависимости этих параметров осложнено ограниченным уровнем доз.

Средние наблюдаемые значения TBLP1 ( $\pm CO$ ) были равны  $2,70 \pm 0,511$  и  $3,09 \pm 0,978$  МЕ/дл на МЕ/кг для препарата ADVATE® и  $4,06 \pm 0,798$  и  $5,66 \pm 2,38$  МЕ/дл на МЕ/кг для гFVIIIФс для групп, соответственно, получавших дозы 25 и 65 МЕ/кг. Средние наблюдаемые значения TBLP3 ( $\pm CO$ ) были равны  $1,98 \pm 0,377$  и  $2,39 \pm 0,718$  МЕ/дл на МЕ/кг для препарата ADVATE® и  $3,04 \pm 0,598$  и  $4,44 \pm 1,84$  МЕ/дл на МЕ/кг для гFVIIIФс для групп, соответственно, получавших дозы 25 и 65 МЕ/кг.

Средние значения IVR и K-значений рассчитаны с помощью значений  $C_{max}$  (с вычитанием значений исходного уровня и остаточной активности лекарств в рамках модели) в основном были больше значений, определённых с помощью прогнозируемых модельных значений  $C_{max}$ ; что согласуется с небольшой недооценкой наблюдаемой пиковой активности, определяемой с помощью однокамерной модели. Средние наблюдаемые K-значения ( $\pm CO$ ) были равны  $3,08 \pm 0,429$  и  $2,85 \pm 0,721$  МЕ/дл на МЕ/кг для препарата ADVATE® и  $3,12 \pm 0,451$  и  $2,92 \pm 0,985$  МЕ/дл на МЕ/кг для гFVIIIФс для групп, соответственно, получавших дозы 25 и 65 МЕ/кг. Средние наблюдаемые значения IVR ( $\pm CO$ ) были равны  $112 \pm 14,5$  и  $116 \pm 26,9\%$  для препарата ADVATE® и  $113 \pm 16,3$  и  $117 \pm 33,6\%$  для гFVIIIФс для групп, соответственно, получавших дозы 25 и 65 МЕ/кг.

#### Выводы.

У всех пациентов, лечившихся препаратами ADVATE® и гFVIIIФс, были дозозависимые увеличения значений  $C_{max}$  и  $AUC_{INF}$  в диапазоне оценённых доз. Пиковые уровни в плазме препаратов ADVATE® и гFVIIIФс обычно наблюдались в пределах первого часа после завершения инфузии и оставались обнаруживаемые в течение нескольких дней после введения дозы. После завершения инфузии снижение активности FVIII скорректированной к исходному уровню выявило моноэкспоненциальное снижение до достижения исходного уровня активности для обоих препаратов. Значения параметров периодов полувыведения и MRT оказались дозозависимыми в диапазоне доз, оценённом для обоих препаратов FVIII. С возрастанием дозы ADVATE® и гFVIIIФс были отмечены небольшие увеличения значений CL и V. Однако возрастание вариабельности среди пациентов для дозы 65 МЕ/кг сочеталось с ограниченными уровнями дозами, помешавшими оценить дозозависимый характер этих параметров.

Сравнение активности параметров PK препаратов гFVIIIФс и ADVATE® выявило приблизительно 48-61% (одностадийный анализ) или 53-84% (хромогенный анализ) возрастание системного воздействия, примерно 30-40% снижение клиренса и приблизительно 50-80% возрастание обоих значений периода

полувыведения и MRT для препарата rFVIII Fc по сравнению с ADVATE® в сравнимых дозах. Наблюдали также свидетельство отличия PK для rFVIII Fc, продемонстрированное увеличенными значениями TBLP1 и TBLP3 по сравнению с препаратом ADVATE®, введённом в эквивалентных дозах. IVR и K-значения для препаратов ADVATE® и rFVIII Fc оказались сравнимыми.

Параметры PK полученные в результате хромогенного анализа обычно согласовывались с такими результатами для одностадийного анализа, за исключением того, что при хромогенном анализе получали более высокие значения параметров экспозиции (например,  $C_{max}$ ,  $AUC_{INF}$  и т.д.).

Наблюдавшиеся улучшенные параметры PK указывают на то, что препарат rFVIII Fc способен обеспечить продолжительную защиту от кровотечений, допуская менее частые инъекции пациентам с гемофилией А.

Пример 6. Клиническое испытание белка rFVIII Fc A-LONG фазы 3.

На основе предварительного анализа данных PK, полученных при первом исследовании белка rFVIII Fc на людях (см. пример 3), было разработано испытание A-LONG. Испытание A-LONG представляет собой открытое, масштабное, многоцентровое испытание фазы 3 оценивания безопасности, фармакокинетики и эффективности рекомбинантного белка слияния FVIII Fc (FVIII:Fc) для предотвращения и лечения кровотечений у ранее лечившихся пациентов с серьёзной гемофилией А (определяемой как <1 МЕ/дл [ $<1\%$ ] эндогенного FVIII).

Первоначальными целями исследования A-LONG были: (i) оценка безопасности и переносимости препарата rFVIII Fc, вводимого для профилактики, еженедельного введения, лечения по требованию и в режимах хирургического лечения, и (ii) оценка безопасности и переносимости препарата rFVIII Fc, вводимого для подбираемого режима профилактики, режимах лечения по требованию и в режимах хирургического лечения. Второстепенной целью исследования A-LONG были: (i) определение параметров PK-профиля препарата rFVIII Fc и сравнение PK rFVIII Fc с присутствующими в данный момент на рынке препаратами ADVATE®, (ii) оценка индивидуальных откликов на приём rFVIII Fc, (iii) определение диапазона доз и графиков, необходимых для удовлетворительного предотвращения кровотечений, для режима профилактики, поддержания гомеостаза при хирургическом вмешательстве или лечении эпизодов кровотечения при лечении по требованию, еженедельном лечении или профилактическом лечении и (iv) оценки расходования rFVIII Fc (например, общее ежегодное использование rFVIII Fc на пациента).

165 пациентов были вовлечены в один из трёх режимов: подбираемый режим профилактики (группа 1), режим еженедельного дозирования (группа 2) и режим лечения по требованию (группа 3). Дополнительно препарат rFVIII Fc оценивали в подгруппе периоперационного управления.

Ключевые критерии приёма в группы: (i) мужчины, (ii)  $\geq 12$  лет и по меньшей мере 40 кг, (iii) диагнозы - серьёзное заболевание гемофилией А, определённое как <1% (<1МЕ/мл) эндогенной активности FVIII, и (iv) история болезни  $\geq 150$  задокументированных дней предварительного воздействия каких-либо коммерческих препаратов FVIII, распространяемых в настоящее время.

Группа 1. Подбираемый режим профилактики.

Группа 1 включала всю группу и подгруппу изучения PK. В начальном режиме дважды в неделю вводили дозу 25 МЕ/кг в первый день с последующим введением 50 МЕ/кг на четвёртый день недели (день 4). Субъектам исследования вводили препарат rFVIII Fc в этом режиме еженедельной профилактики до получения результатов PK для белка rFVIII Fc. На основании этих результатов для каждого человека назначали подбираемый режим профилактики, при котором доза и интервал введения были определены для поддержания минимальных уровней 1-3% активности FVIII. Потом каждому пациенту производили введение согласно его индивидуально подобранному режиму профилактики в течение всего периода исследования.

За пациентами наблюдали в течение всего лечения и проводили текущие коррекции дозы и интервалов введения препаратов. Могут проводиться корректировки, только когда с пациентом происходят неприемлемые случаи возникновения кровотечений, определяемые как  $\geq 2$  спонтанных эпизодов кровотечения в течение непрерывного двухмесячного периода. В этом случае корректировка дозы была направлена на изменение минимальных уровней активности до 3-5%.

Группа 2. Режим еженедельного дозирования.

Субъекты исследования проходили сокращённые исследования профилей PK препарата rFVIII Fc согласно следующим параметрам: период вымывания препарата по меньшей мере 96 ч; одноразовая доза rFVIII Fc 65 МЕ/кг; сокращённый отбор проб, начинавшийся с 0-го дня введения rFVIII Fc, включая момент перед инъекцией и через 10 ( $\pm 2$ ) мин, 3 ч ( $\pm 15$  мин), 72 ( $\pm 2$ ) ч [3 день] и 96 ( $\pm 2$ ) ч [4 день] с начала введения препарата. После сокращённого исследования PK профиля пациентам далее вводили фиксированную дозу rFVIII Fc 65 МЕ/кг каждые 7 дней по меньшей мере 28 недель вплоть до 52 недель.

Группа 3. Эпизодическое лечение (по требованию).

Субъекты исследования получали эпизодическое лечение препаратом rFVIII Fc по мере необходимости при возникновении кровотечений. Пациенты вовлекались в исследование, рандомизированно распределялись и проходили сокращённые исследования профилей PK препарата rFVIII Fc согласно следующим параметрам:

- (i) период вымывания: по меньшей мере 96 ч;
- (ii) дозирование rFVIII Fc на 0-й день: однократная доза rFVIII Fc 50 МЕ/кг, вводимая под медицинским наблюдением;
- (iii) сокращённый отбор проб, начинавшийся с 0-го дня введения rFVIII Fc: перед инъекцией и через 30 ( $\pm 3$ ) мин, 3 ч ( $\pm 15$  мин), 72 ( $\pm 2$ ) ч [3 день] и 96 ( $\pm 2$ ) ч [4 день] после начала инъекции.

В выбранных местах проводился отбор образцов одновременно для TGA во всех временных точках определения профиля PL. Выборка пациентов, сдававших пробы для исследования методами RO-TEM/TEG, отбор образцов происходил в следующие временные точки: перед инъекцией и через 3 ч ( $\pm 15$  мин), 72 ( $\pm 2$ ) ч [3 день] и 96 ( $\pm 2$ ) ч [4 день] после начала инъекции.

В промежутке между запланированными визитами пациенты получали лечение при эпизодах кровотечений дозами препарата rFVIII Fc в пределах 10-50 МЕ/кг в зависимости от тяжести кровотечения.

Подгруппа периоперационного управления.

В этом исследовании препарат rFVIII Fc вводили перед последующей хирургической операцией в выборке пациентов, требующих обширное хирургическое вмешательство. Обширное хирургическое вмешательство определяется как хирургическая операция (рекомендованная или неотложная), в которой используется общая анестезия и/или искусственное дыхание, при которой происходит проникновение или воздействие на основные полости организма или в ходе которой возникает значительное ухудшение физических или физиологических функций (например, лапаротомия, торакотомия, краниотомия, замена сустава и ампутация конечностей).

Для получения профилактики во время хирургической операции субъекты исследования получали лечение дозами rFVIII Fc 20-50 МЕ/кг каждые 12-24 ч. Перед операцией доктор пересматривал PK-профиль пациента в отношении rFVIII Fc и оценивал режим дозирования замещения активности FVIII, обычно требуемого для этого типа запланированной хирургической операции и клинического статуса данного пациента. Рекомендации по выбору необходимой дозы rFVIII Fc на период хирургического лечения, включая какой-либо период реабилитации, принимали во внимание эти факторы.

Оценка фармакокинетики (PK). Все пациенты во всех группах проходили начальное оценивание после получения первой дозы препарата rFVIII Fc. Выборке пациентов из группы 1 была определена в подгруппу протокол-определённого последовательного изучения PK для сравнения PK rFVIII Fc с PK рекомбинантного фактора VIII (rFVIII, ADVATE® [метод определения антигемофильного фактора (рекомбинантный), способ получения без плазмы и альбумина]) согласно следующим условиям:

- (i) перед проведением лечения в группе 1 PK оценивалась после введения однократной дозы 50 МЕ/кг препарата ADVATE®. Потом среди тех же пациентов оценивалась PK после введения однократной дозы 50 МЕ/кг rFVIII Fc;
- (ii) оценка PK повторялась через 12-24 ч.

Ключевые результаты определения эффективности (включая начальные данные): (i) Ежегодный показатель возникновения кровотечений (ABR) в группе 1 против группы 3 (группа с индивидуальной профилактикой по сравнению с группой эпизодического лечения), (ii) число инъекций, требуемых для прекращения эпизода кровотечения, (iii) оценивание лечащими врачами отклика пациентов на хирургическое вмешательство при применении rFVIII Fc, используя 4-балльную шкалу.

Результирующие измерения PK. PK препаратов rFVIII Fc и ADVATE®.

Ключевые результаты определения эффективности: (i) Частота развития ингибирующего эффекта; и (ii) частота возникновения неблагоприятных явлений (НЯ), происходящих за пределами периода периоперационного управления.

Результаты.

Субъекты исследования. Всего в этом исследовании было задействовано 165 пациентов. Группа 1 (индивидуальная профилактика), n=118; группа 2 (еженедельная профилактика), n=24; группа 3 (эпизодическое лечение), n=23; подгруппа периоперационного управления, n=9, 9 операций (8 пациентов из группы 1, и 1 - из группы 2). Это исследование прошли 92,7% пациентов.

Эффективность препарата. Медианное значение ABR (группа индивидуальной профилактики: 1,6; группа еженедельной профилактики: 3,6; группа эпизодического лечения: 33,6). В группе индивидуальной профилактики медиана для интервала дозирования составила 3,5 суток во время последних 3 месяцев исследования. 30% пациентов в группе индивидуальной профилактики достигли среднего значения интервала дозирования по меньшей мере 5 дней. 98% эпизодов кровотечений контролировались одной или двумя инъекциями rFVIII Fc. При периоперационном управлении лечащие врачи оценили гемостатическую эффективность препарата rFVIII Fc как отличную или хорошую в 100% случаев хирургических операций.

PK. Среднее геометрическое значение конечного периода полувыведения белка rFVIII Fc составил приблизительно 19,0 ч, что оказалось в 1,53 раза дольше, чем у препарата ADVATE® (приблизительно 12,4 ч).

Безопасность. Не сообщалось об обнаружении ингибиторов к rFVIII Fc и о случаях анафилактических реакций. Обычно препарат rFVIII Fc переносился хорошо. Наиболее частые НЯ вне зависимости от

причин (частота возникновения  $\geq 5\%$ ) случались за пределами периода периоперационного управления и включали назофарингит, боль в суставах и инфекции верхних дыхательных путей. У 12 пациентов (7.3%) за пределами периода периоперационного управления возникли серьёзные НЯ (СНЯ). Исследователем не было определено СНЯ, связанных с приёмом препарата.

Резюме.

Исследование режимов индивидуальной и еженедельной профилактики в результате привели к однозначному медианному значению ежегодной частоты возникновения кровотечений. В группе индивидуальной профилактики медиана для интервала дозирования составила 3,5 суток. В течение последних 3 месяцев исследования 30% пациентов в группе индивидуальной профилактики достигли среднего значения интервала дозирования по меньшей мере 5 дней. 98% эпизодов кровотечений контролировались одной или двумя инъекциями rFVIIIc. Гемостатическая эффективность препарата rFVIIIc была оценена лечащими врачами как отличная или хорошая в 100% случаев хирургических операций. Период полувыведения rFVIIIc составил приблизительно 19,0 ч по сравнению с 12,4 ч для препарата ADVATE®. Ни у одного пациента не появился ингибитор или не возникло анафилактической реакции на препарат rFVIIIc. Рекомбинантный препарат FVIIIc обычно хорошо переносился.

Пример 7. Клиническая оценка с помощью метода ROTEM®.

В дополнение к измерению активности FVIII в плазме методом измерения времени одностадийной частичной активации тромбопластина (aPTT) также был использован метод ротационной тромбоэластометрии крови (ROTEM®) для оценки улучшения общего гемостаза при применении препаратов rFVIIIc и ADVATE® у 2 пациентов, в частности у 1 пациента из группы, получавшей низкую дозу, и 1 - из группы, получавшей высокую дозу.

Оказалось, что препараты rFVIIIc и ADVATE® активны в сравнимой степени относительно формирования сгустка, при добавлении препаратов к образцам крови пациентов до лечения препаратом rFVIIIc. Время образования сгустка (СТ) было линейным в отношении дозы препаратов rFVIIIc и ADVATE® в диапазоне приблизительно 1-100% от нормы. И у одного и того же пациента этот эффект дозы был сравним у обоих препаратов rFVIIIc и ADVATE®.

После введения дозы ADVATE® с последующим введением rFVIIIc были отобраны образцы цельной цитратной крови в разные временные точки и методом ROTEM® оценивали образование сгустка после рекальцификации крови. Несмотря на варьирование исходных значений СТ из-за остаточных уровней активности FVIII перед введением доз ADVATE® или rFVIIIc, оба препарата эффективно корректировали СТ до получения сравнимых значений в 30 мин после инъекций. Кроме того, улучшение показателей СТ дольше сохранялось и после 3 ч после инъекции 25 МЕ/кг rFVIIIc по сравнению с введением этому пациенту ADVATE® в низкой дозе. Однако отличие в улучшении показателей под действием rFVIIIc против ADVATE® было намного менее ощутимым при дозировке 65 МЕ/кг.

Пример 8. Определение эффективности препарата rFVIIIc и одноцепочечного (SC) rFVIII in vivo на мышцах с гемофилией (HemA) A.

Рекомбинантный фактор VIIIc (rFVIIIc) содержит белок rFVIII с удалённым В-доменом (УВД - BDD) генетически гибридный с Fc-доменом иммуноглобулина человека (IgG1). Перед секрецией клетками НЕК 293 основное количество белка rFVIIIc процессируется в виде тяжёлой цепи (HC) FVIII и лёгкой цепи (LC+Fc). В процессе циркуляции молекула rFVIIIc образует комплекс с фактором фон Виллебранда (vWF) и высвобождается при активации способом, неотличимым от природного FVIII. Предполагается, что спонтанная диссоциация HC и LC вносит свой вклад в потерю активности FVIII в плазме и во время хранения лекарственных препаратов FVIII. В этом примере изобретателями описывается одноцепочечная непротессированная изоформа rFVIIIc (SC rFVIIIc), которая может обеспечить лучшую технологичность и повышенную стабильность по сравнению с препаратом природного FVIII. Белок SC rFVIIIc был отделён от rFVIIIc, который содержал фракцию непротессированной изоформы. По сравнению с rFVIIIc белок SC rFVIIIc показал эквивалентную хромогенную активность, но приблизительно на 60% меньшую активность при определении одностадийным (aPTT) анализом (табл. 3А и 3В). Анализ определения образования тромбина (TGA) выполнялся с использованием калиброванного автоматизированного устройства получения тромбограмм (Thrombinoscope®). При проведении анализа TGA белок SC rFVIIIc также показал пониженный потенциал образования тромбина (фиг. 13А) и пиковой концентрации тромбина (фиг. 13В) по сравнению с rFVIIIc. Однако, как показано в табл. 3В, вся активность SC rFVIIIc при определении методом aPTT наблюдалась в отсутствие vWF, что предполагает возможное замедленное высвобождение vWF из-за ковалентной связи аз-кислотного участка с HC после расщепления связи Arg 1680 в молекуле SC rFVIIIc, в противоположность высвобождению и диссоциации участка аз от полностью процессированного белка FVIII. Замедление диссоциации от vWF может объяснять снижение активности, наблюдаемой в анализах aPTT и TGA, тогда как в двухстадийном хромогенном анализе наблюдалась полная активность. Пониженная скорость активации в присутствии vWF подтверждена при хромогенном анализе с модифицированным хромогенным субстратом с лимитированным содержанием тромбина, как активатора FVIII.

Функционирование SC rFVIIIc в условиях in vivo оценивалось на модели рассечения хвостовой

вены (РХВ) мышей с НемА. Сначала мышей подвергали анестезии, потом им вводили 4,6 мкг/кг, 1,38 или 0,46 мкг/кг или процессированного rFVIII<sub>Sc</sub> (лекарственная субстанция, содержащая около 75-85% процессированного rFVIII<sub>Sc</sub>) и очищенного одноцепочечного белка (SC) rFVIII<sub>Sc</sub> за 48 ч до РХВ. Конец хвоста отрезался и немедленно помещался в пробирку для сбора крови. Процентное значение защиты для выживания измерено для процессированного белка rFVIII<sub>Sc</sub> (лекарственная субстанция) и одноцепочечного белка (SC) rFVIII<sub>Sc</sub> как показано в табл. 7 и фиг. 7А, 7В и 7С.

Таблица 7. Определение эффективности препарата rFVIII<sub>Sc</sub> и одноцепочечного (SC) rFVIII *in vivo*

Доза (мкг/кг)		4,6	1,38	0,46
% защиты для выживания	rFVIII <sub>Sc</sub> DS	93	52	19
	Одноцепочечный rFVIII <sub>Sc</sub>	93	64	14

Показатели исследования *in vivo* повторное хвостовое кровотечение и выживание подвергали ежечасному мониторингу вплоть до 12 ч после РХВ с последним наблюдением через 24 ч после РХВ. Белки SC rFVIII<sub>Sc</sub> и rFVIII<sub>Sc</sub> продемонстрировали эквивалентную эффективность на этой модели в условиях *in vivo*, со значениями ЭД50 (эффективная доза в 50% случаев) равными, соответственно, 1,17 и 1,23 мкг/кг, когда РХВ проводили через 48 ч после инфузионного введения препаратов (фиг. 7А). Для каждого уровня протестированной дозы препаратов SC rFVIII<sub>Sc</sub> и rFVIII<sub>Sc</sub> наблюдали сравнимые кривые выживания в течение 24 ч после РХВ ( $p \geq 0,65$ ) (фиг. 7В) и частоты возникновения повторных кровотечений (фиг. 7С), что указывает на эффективность SC rFVIII<sub>Sc</sub> эквивалентную rFVIII<sub>Sc</sub>, несмотря на его более низкую кажущуюся активность при анализе методом aPTT. Поэтому замедленная активация SC rFVIII<sub>Sc</sub> в условиях *in vitro* в присутствии vWF, как оказалось, не обладает значительным влиянием на эффективность этого белка *in vivo*. Эти наблюдения указывают на то, что белок SC rFVIII<sub>Sc</sub> представляет собой новую и эффективную изоформу rFVIII<sub>Sc</sub> с потенциалом клинического применения.

Пример 9. Фазы 1/2а клинического исследования.

rFVIII<sub>Sc</sub> - это рекомбинантный белок слияния, состоящий из единой молекулы FVIII, ковалентно связанной с Fc-доменом IgG<sub>1</sub> человека для продления полупериода циркуляции белка rFVIII. В этом исследовании, впервые проводимом на людях, на ранее лечившихся пациентах-мужчинах с серьезной формой гемофилии А определяли безопасность и фармакокинетику препарата rFVIII<sub>Sc</sub>. 16 пациентов получали единственную дозу препарата ADVATE® 25 или 65 МЕ/кг с последующим введением равной дозы rFVIII<sub>Sc</sub>. Большинство нежелательных явлений не были связаны с исследуемым препаратом. Ни у одного пациента в исследовании не появились антитела или ингибитры к rFVIII<sub>Sc</sub>. Среди примененных уровней доз в сравнении с препаратом ADVATE®, rFVIII<sub>Sc</sub> показал 1,54 и 1,71-кратное продление  $t_{1/2}$  элиминирования и значений среднего времени удержания, 1,49- и 1,56-кратное снижение клиренса и 1,49- и 1,56-кратное повышение общего системного воздействия. ADVATE® и rFVIII<sub>Sc</sub> обладали сравнимыми дозозависимыми пиковыми концентрациями в плазме и показателями восстановления. Время достижения уровня 1% активности FVIII, превышающего исходный уровень среди примененных уровней доз, было примерно в 1,53 и 1,68 раз дольше, чем для препарата ADVATE®. Таким образом, с препаратом rFVIII<sub>Sc</sub> может быть предложен приемлемый терапевтический подход для достижения пролонгированной гемостатической защиты и меньшая частота введения доз для пациентов с гемофилией А. rFVIII<sub>Sc</sub> является рекомбинантным белком слияния, состоящим из одиночной молекулы rFVIII с удаленным В-доменом, ковалентно связанным с Fc-доменом IgG<sub>1</sub> человека. Потенциальные выгоды Fc-белков слияния включают лучшую переносимость и пролонгированную гемостатическую защиту, а Fc-домен представляет собой природную молекулу, которой не свойственна известная токсичность. Dumont J.A. и др., *BioDrugs* 20(3):151-60 (2006), Dumont J.A. и др., "Monomeric Fc fusion technology: an approach to create long-lasting clotting factors," в книге: Kontermann R. ed., *Therapeutic Proteins - Strategies to Modulate Half-Life*, глава 11, Wiley VCH publisher; предварительная публикация онлайн, DOI: 10.1002/9783527644827.ch10. Присоединение Fc-домена к молекуле IgG<sub>1</sub> позволяет связываться с неонатальным Fc-рецептором (FcRn), который экспрессируется во многих типах клеток, включая эндотелиальные клетки. Экспрессия FcRn сохраняется на стабильном уровне в продолжение жизни и отвечает за защиту IgG<sub>1</sub> и Fc-белков слияния от лизосомальной деградации, таким образом пролонгируя  $t_{1/2}$  данного белка. Dumont J.A. и др., *BioDrugs* 20(3): 151-60 (2006), Roopenian D.C. и др., *Nat. Rev. Immunol.* 7(9):715-25 (Epub 2007 Aug 17). Многочисленные белки при циркуляции крови захватываются клетками, выстилающими сосудистое русло, посредством неспецифического пиноцитоза и перемещаются по путям эндосомальной и лизосомальной деградации.

Fc-белки взаимодействуют с рецепторами FcRn, расположенными в эндосомах. Эндосомы, содержащие FcRn, направляют Fc-белки слияния обратно к плазматической мембране, высвобождая в русло циркуляции крови pH-зависимым механизмом, Lencer W.I. and Blumberg R.S., *Trends Cell Biol.* 15(1):5-9 (2005), таким образом, белки избегают лизосомальной деградации. Этот подход с использованием рециркуляции был успешно использован для продления  $t_{1/2}$  терапевтических биологических белков. Несколько лекарственных препаратов на основе Fc-белков слияния были одобрены для клинического ис-

пользования (например, этанерцепт, ромиплостин), а другие находятся на этапе разработки. Huang C., *Curr. Opin. Biotechnol.* 20(6):692-9. (Epub 2009 Nov 4), Schmidt S.R., *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 12(2):284-295 (2009).

Доклинические данные исследования rFVIII<sub>Fc</sub> указывают, что FVIII может избежать деградации, таким образом, продлевая  $t_{1/2}$  природным защитным механизмом, опосредованным FcRn. У мышей и собак с гемофилией А, значение конечного  $t_{1/2}$  в плазме для rFVIII<sub>Fc</sub> было приблизительно в 2 раза больше, чем для rFVIII. Dumont J. и др., *Blood.* 116(21) Abstract 545 (2009), Liu T. и др., *J. Thromb. Haemost.* 9(S2):561 (2011). На основании этих данных можно утверждать, что изобретателями впервые на людях проведено клиническое исследование для изучения безопасности и PK белка слияния rFVIII<sub>Fc</sub> продолжительного действия у пациентов с гемофилией А.

План исследования.

В этом открытом многоцентровом исследовании фаз 1/2a с повышением дозы на ранее лечившихся пациентах с серьёзной гемофилией А изучали безопасность препарата rFVIII<sub>Fc</sub> и его фармакокинетику (PK) по сравнению с препаратом ADVATE® (антигемофильный фактор [рекомбинантный], способ получения без плазмы и альбумина, октоког α, производитель Baxter Healthcare). Это исследование выполнено в соответствии с требованиями Свода Федеральных законов США (US CFR) и руководств ICH по надлежащей клинической практике. Перед проведением какого-либо испытания были получены одобрения от принимающих участие экспертных советов организаций и письменные информированные согласия от всех субъектов исследований. План исследования был последовательным. Вводили единственную дозу препарата ADVATE® в дозе 25 или 65 МЕ/кг с последующим введением равной дозы rFVIII<sub>Fc</sub> (фиг. 8). Оба лекарственных препарата вводили внутривенно в течение примерно 10 мин. Как ожидалось, два выбранных уровня доз охватывали обычный терапевтический диапазон доз. Субъекты исследования в течение 28 дней после получения rFVIII<sub>Fc</sub> проходили анализы на безопасность, включая тестирование на наличие антител и ингибиторов к FVIII на 14- и 28-й дни после инъекции этого препарата. У пациентов измеряли активность FVIII плазмы перед инъекцией, 10 и 30 мин, 1, 3, 6, 9, 24, 48, 72, 96, 120 и 168 ч (7 дней) после инъекции rFVIII<sub>Fc</sub> с дополнительным отбором образцов через 192, 216 и 240 ч (10 дней) для пациентов, получивших дозу rFVIII<sub>Fc</sub> 65 МЕ/кг. Активность FVIII в плазме крови измерялась в те же временные точки после лечения ADVATE®, в течение 72 ч для группы, получившей дозу 25 МЕ/кг, и 96 ч для группы, получившей дозу 65 МЕ/кг.

(a) Субъекты исследования.

Пациенты-мужчины возрастом по меньшей мере 12 лет с серьёзной гемофилией А (определённой как уровень активности FVIII < 1%) и имеющие документированное подтверждение по меньшей мере 100 дней предварительного воздействия препаратами FVIII (из плазмы - pdFVIII или рекомбинантного - rFVIII). Были исключены пациенты, у которых известны проявления гиперчувствительности к белкам мыши или хомяка, в истории болезни были ингибиторы или определялись титры ингибиторов при отборе пациентов, или которые принимали лекарственные препараты, способные повлиять на гемостаз или системные иммуносупрессорные препараты, или которые переживают острую фазу бактериальной или вирусной инфекции (отличной от гепатита или ВИЧ) в течение 30 дней отбора. Генотип пациента, если был известен, записывали при приёме в исследование.

(b) Лекарственный препарат.

Трансгены, содержащие последовательности rFVIII<sub>Fc</sub> и Fc человека, были надёжно перенесены трансфекцией в клетки НЕК293, и полученная клеточная линия для обеспечения безопасности продукта интенсивно изучалась на стабильность, стерильность и вирусную контаминацию. Очищенный фармацевтический продукт состоит из мономерного белка FVIII с удалённым В-доменом, ковалентно связанного своим карбоксильным терминальным концом с N-терминальным концом Fc-мономера, который образует дисульфидную связь со вторым Fc-мономером во время синтеза и секреции белка из клетки. Белок rFVIII<sub>Fc</sub> был очищен с помощью хроматографии и нанофильтрации и проявил полную активность в одностадийном и хромогенном анализах в отношении коммерчески доступных препаратов rFVIII. Препарат поставлялся в виде замороженной жидкости, содержащей 1000 МЕ в 2 мл раствора в составе с L-гистидином (pH 7), хлоридом натрия, хлоридом кальция, сахарозой, манитом и полисорбатом 20. Перед введением препарат разбавлялся солевым раствором (0,9% NaCl).

(c) Результирующие измерения.

Первоочерёдной целью этого исследования была безопасность, оцениваемая посредством медицинского осмотра, сообщения появившихся при лечении нежелательных явлений (НЯ), появления антител и мониторинга лабораторных показателей в течение определённого периода. Вторичные цели включали параметры, получаемые при анализах показателей фармакокинетики (PK). Лабораторные анализы оценивания включали определение времени конверсии протромбина, времени частичной активации тромбопластина (aPTT), международного приведённого значения, уровней D-димера, антигена фактора фон Виллебранда (vWF), стандартные гематологические анализы и испытания химии крови, а также анализы мочи.

Активность FVIII была измерена одностадийным анализом образования сгустка (aPTT) на анализаторе Siemens BCS-XP с использованием коммерческих реактивов (Dade Actin FSL) с проведением калиб-

ровки по отношению к референтной плазме здорового человека (Precision Biologics CRYOcheck™), сравниваемой с 5-м международным стандартным образцом (IS) плазмы человека Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ). В дополнение анализу aPTT, активность FVIII измеряли анализом с хромогенным субстратом Rosen S., Scand. J. Haematol. Suppl. 33 (Suppl 40):139-45 (1984), используя коммерчески доступный набор (Aniara BIOPHEN FVIII:C), который соответствует рекомендациям Европейской Фармакопеи. Проведение хромогенного анализа калибровалось по сравнению с референтной плазмой здорового человека (Instrumentation Laboratories ORKE45), для которой также была определена активность в отношении 5-го стандартного образца (IS) плазмы человека ВОЗ.

Нижний предел количественного определения (LLOQ) для одностадийного и хромогенного анализов составил, соответственно, 0,5 и 0,4 МЕ/дл. Ингибиторы FVIII определяли при Бетесда-тесте в модификации Неймегена, и его результаты с содержанием менее 0,6 БЕ/мл считались негативными. Содержание антител к rFVIII:Fc оценивали, используя электрохемилюминисцентный иммунохимический анализ со специфическим связыванием, в котором использовали биотин и меченный сульфогруппами rFVIII:Fc. Чувствительность анализа была определена равной 89 нг/мл с использованием в качестве заместителя контроля моноклональные антитела к FVIII человека. Диагностический анализ методом ротационной тромбоэластометрии цельной крови (ROTEM®) был выполнен для двух пациентов, по одному на каждый уровень дозы, в разные временные точки для оценки улучшения общего гемостаза после введения препаратов ADVATE® и rFVIII:Fc.

(d) Фармакокинетический анализ.

Выбираемая произвольно однокамерная модель распределения, которая автоматически оценивала уровень эндогенного FVIII и последующий остаточный уровень после выведения, была реализована программой WINNONLIN® для анализа данных активности FVIII плазмы отдельного субъекта относительно времени, прошедшего после однократного введения препаратов ADVATE® или rFVIII:Fc. Для расчёта параметров, включающих максимальную активность ( $C_{max}$ ),  $t_{1/2}$ , клиренс (CL), объём распределения в равновесном состоянии ( $V_{ss}$ ), площадь под кривой (время нулевого значения экстраполированного до бесконечности [ $AUC_{INF}$ ]), среднее время удержания (MRT) и восстановления показателей.

Моделирование методом Монте-Карло профиля активности rFVIII:Fc во времени: для построения профилей активность FVIII - время после применения режимов дозирования 25 и 65 МЕ/кг было проведено моделирование Монте-Карло с использованием PK модели этой популяции для препаратов ADVATE® и rFVIII:Fc. На основе данных определения активности одностадийным анализом образования сгустка (aPTT) при применении препаратов ADVATE® и rFVIII:Fc у 16 пациентов в этом исследовании фаз 1/2a были оценены средние показатели модельных параметров (CL, объём распределения) в изучаемой популяции, межиндивидуальная вариабельность и остаточная вариабельность. В моделировании было использовано пять сотен субъектов с 15 точками отбора образцов для каждого пациента и каждого режима дозирования. Был оценён процент популяции с активностью выше или равной 1 и 3% в разные моменты времени после разных режимов дозирования препаратов ADVATE® и rFVIII:Fc.

Статистический анализ. Отдельные фармакокинетические (PK) параметры для препаратов rFVIII:Fc и ADVATE® сравнили с использованием модели дисперсионного анализа. Параметры PK были трансформированы в логарифмические значения для проведения этого анализа и оценивались средние значения, средние различия и доверительные интервалы в log-масштабе, которые были трансформированы для получения оценки средних геометрических значений, среднегеометрического соотношения (GMR) и доверительных интервалов, соответственно, в исходном масштабе. GMR является среднегеометрическим значением межиндивидуального соотношения значения PK параметра rFVIII:Fc к значению PK параметра препарата ADVATE®.

Результаты.

Распределение субъектов исследования. В этом исследовании были привлечены девятнадцать пациентов. 16 пациентов прошли PK оценку для обоих препаратов ADVATE® и rFVIII:Fc. Один пациент самостоятельно ввёл себе ранее принимавшийся препарат перед завершением периода вымывания после получения дозы ADVATE®, и поэтому был исключён из PK анализа, но учитывался при анализе безопасности. Три пациента выбыли из этого исследования перед получением какого-либо исследуемого препарата: один доброволец выбыл; второй был удалён исследователем из-за несоответствия, и один был удалён по просьбе спонсора из-за завершения регистрации в исследовании. Из всех получавших дозирование пациентов шесть пациентов получили 25 МЕ/кг, и 10 пациентов получили 65 МЕ/кг обоих препаратов ADVATE® и rFVIII:Fc. Средний возраст пациентов был 40,3 года (23-61 лет). Данные генотипической идентификации были собраны для 7 пациентов. Инверсия интрона 22 отмечена у 6 пациентов, и дефект рамки считывания отмечен у 1 пациента. Генотип был неизвестен у 9 пациентов. У 13 пациентов были антитела к гепатиту C, 4 из них также были ВИЧ-позитивными.

Безопасность. Подтверждено 44 появившихся при лечении НЯ у 11 (69%) пациентов во время лечения и последующих периодов. Этот период включает день введения доз ADVATE® или rFVIII:Fc до 28-го дня периода наблюдений после дозирования. Большинство событий было расценено как лёгкие, и ни один из них не привёл к отмене лечения. Один случай расстройства вкуса произошел как транзиторный у

одного пациента после получения дозы гFVIIIФс 65 МЕ/кг и был расценен связанным с препаратом гFVIIIФс. Один пациент пережил состояния беспокойства после получения 65 МЕ/кг гFVIIIФс, в результате у него было 21 НЯ, 19 из которых были определены как лёгкие и два из которых (головная боль и светобоязнь) - как умеренные. Ни одно из них не было признано исследователем как относящееся к применению гFVIIIФс. Не было сообщений о серьёзных эпизодах кровотечений. Не было обнаружено доказательств возникновения аллергических реакций в ответ на инъекцию препарата. Все протестированные образцы плазмы были негативными относительно содержания ингибиторов и антител к FVIII. Не наблюдалось местных реакций в месте инъекции. Не сообщалось о клинически значимых изменениях аномальных лабораторных значений.

#### Фармакокинетика.

Корреляция между результатами определения активности гFVIIIФс в плазме aPTT и хромогенным методами: активность препаратов ADVATE® и гFVIIIФс определяли такими же анализами с использованием коммерчески доступных реактивов и калибровки по отношению к стандартам плазмы здорового человека. Существовала сильная корреляция между результатами, полученными одностадийным анализом определения образования сгустка и хромогенным анализом в образцах, которые обладали активностью выше нижнего предела количественного определения (LLOQ). Коэффициенты корреляции ( $R^2$  Пирсона) 0,94 и 0,95 наблюдали между результатами обоих анализов, соответственно, для 151 образца после получения доз ADVATE® и 185 образцов после получения доз гFVIIIФс. По сравнению с результатами анализа aPTT результаты определения активности FVIII хромогенным анализом в среднем были на 21% больше для препарата ADVATE® и на 32% больше для гFVIIIФс, но не были статистически значимыми (фиг. 9). Это наблюдение привело к слегка повышенной оценке параметров воздействия при оценке обоих препаратов хромогенным анализом. Кажущиеся более высокие показатели восстановления активности FVIII, определённые хромогенным анализом, являются обычными для рекомбинантных препаратов FVIII, испытываемых в клинических анализах, и этот факт согласовывается с большинством других выпущенных на рынок препаратов. Lee C.A. и др., *Thromb. Haemost.* 82(6):1644-7 (Dec. 1999), Mikaelsson M. and Oswaldsson U., *Semin. Thromb. Hemost.* 28(3):257-64 (June 2002), Stroobants A.K. и др., *J. Thromb. Haemost.* 9 (Suppl 2) (2011).

Улучшенная фармакокинетика препарата FVIIIФс: результаты первичной оценки PK были получены из данных определения активности одностадийным (aPTT) анализом образования сгустка. У пациентов, которые получали 25 или 65 МЕ/кг препарата ADVATE® с последующим введением равных доз гFVIIIФс, происходил резкий рост активности FVIII в плазме и  $C_{max}$  достигалось в течение первого часа после дозирования. Последующее снижение наблюдаемой активности FVIII выявилось как моноэкспоненциальные характеристики снижения до достижения исходного уровня активности FVIII (фиг. 10А и 10В). Значение  $C_{max}$  возрастало пропорционально дозе, но было сравнимо между равными дозами препаратов ADVATE® и гFVIIIФс (табл. 8). Показатель общего воздействия ( $AUC_{INF}$ ) также возрос пропорционально дозе. Однако  $AUC_{INF}$  для гFVIIIФс было в 1,48 и 1,56 раз больше, чем для препарата ADVATE® при дозе 25 МЕ/кг ( $p=0,002$ ) и 65 МЕ/кг ( $p<0,001$ ), соответственно (табл. 8).

Таблица 8. РК параметры при одностадийном (aPTT) анализе для rFVIII<sup>Fc</sup> и ADVATE® по группам дозирования

Параметр	Доза: 25 МЕ/кг (N=6)			Доза: 65 МЕ/кг (N=9)		
	ADVATE® Среднее геом. [95% ДИ]	rFVIII <sup>Fc</sup> Среднее геом. [95% ДИ]	Среднее геом. соотношение [95% ДИ] (p- значение)	ADVATE® Среднее геом. [95% ДИ]	rFVIII <sup>Fc</sup> Среднее геом. [95% ДИ]	Среднее геом. соотношение [95% ДИ] (p- значение)
C <sub>max</sub> _OBS (МЕ/дл)	63,6 [59,1; 68,3]	60,5 [53,1; 69,0]	0,952 [0,819; 1,11] 0,440	133 [105; 168]	119 [103; 136]	0,895 [0,795; 1,01] (p = 0,061)
AUC <sub>INF</sub> (час*МЕ/дл)	994 [723; 1370]	1480 [1160; 1880]	1,48 [1,26; 1,76] (p = 0,002)	1800 [1350; 2400]	2800 [1980; 3970]	1,56 [1,33; 1,83] (p < 0,001)
t <sub>1/2</sub> (часов)	12,2 [9,14; 16,3]	18,8 [14,8; 23,8]	1,54 [1,40; 1,69] (p < 0,001)	11,0 [8,76; 13,9]	18,8 [14,3; 24,5]	1,70 [1,54; 1,89] (p < 0,001)
MRT (часов)	17,5 [13,1; 23,4]	27,0 [21,3; 34,2]	1,54 [1,40; 1,69] (p < 0,001)	15,8 [12,6; 19,9]	27,0 [20,6; 35,3]	1,71 [1,54; 1,89] (p < 0,001)
CL (мл/час/кг)	2,49 [1,80; 3,45]	1,68 [1,31; 2,15]	0,673 [0,569; 0,796] (p = 0,002)	3,61 [2,71; 4,83]	2,32 [1,64; 3,29]	0,642 [0,547; 0,753] (p < 0,001)
V <sub>ss</sub> (мл/кг)	43,9 [39,3; 49,0]	45,4 [39,3; 52,5]	1,04 [0,947; 1,13] (p = 0,357)	57,4 [48,3; 68,3]	62,8 [55,2; 71,5]	1,09 [0,976; 1,22] (p = 0,107)
Постепенное восстановление (МЕ/дл на МЕ/кг)	2,56 [2,36; 2,78]	2,44 [2,12; 2,81]	0,952 [0,819; 1,11] (p = 0,444)	2,04 [1,61; 2,59]	1,83 [1,59; 2,10]	0,894 [0,795; 1,01] (p = 0,060)

ДИ - доверительный интервал; среднее геом. - среднее геометрическое; OBS - наблюдаемое. Оценённые средние значения, 95% ДИ для средних значений и средние отличия были трансформированы для получения оценённых средних геометрических значений, 95% ДИ средних геометрических значений и среднегеометрических соотношений, соответственно.

Значения t<sub>1/2</sub>, MRT, CL и V<sub>ss</sub> оказались независимыми от дозы (табл. 8). Среднее геометрическое t<sub>1/2</sub> препаратов rFVIII<sup>Fc</sup> составило 18,8 ч в обеих группах, получавших дозы 25 и 65 МЕ/кг. Это значение выявляет 1,54 и 1,70-кратное улучшение показателя, чем для препарата ADVATE® (12,2 и 11,0 ч), соответственно, в эквивалентных дозах (p<0,001) (табл. 8). Такое же внутрисубъектное улучшение наблюдали для значений MRT для rFVIII<sup>Fc</sup> (27,0 ч для обеих групп дозирования) по сравнению с ADVATE® (17,5 ч для дозы 25 МЕ/кг и 15,8 ч для дозы 65 МЕ/кг) (p<0,001). Сопоставимым с улучшением показателей t<sub>1/2</sub> и MRT было соответствующее 1,49 и 1,56-кратное уменьшение внутрисубъектного значения CL, соответственно, при дозах 25 МЕ/кг (p=0,002) и 65 МЕ/кг (p<0,001). Не было обнаружено статистически значимых отличий показателей V<sub>ss</sub> и постепенного восстановления параметров между препаратами ADVATE® и rFVIII<sup>Fc</sup>. Поэтому у каждого пациента для препарата rFVIII<sup>Fc</sup> был продемонстрирован улучшенный РК-профиль по сравнению с ADVATE®. Улучшенный РК-профиль rFVIII<sup>Fc</sup> привёл к возрастанию времени после получения дозы до снижения активности FVIII до 1%, которое было в 1,53 и 1,68 раз дольше, чем у препарата ADVATE®, соответственно, при дозе 25 МЕ/кг (p<0,001) и 65 МЕ/кг (p<0,001) (данные не показаны), что предполагает потенциально большую терапевтическую длительность действия препарата rFVIII<sup>Fc</sup>. Благоприятный РК-профиль rFVIII<sup>Fc</sup> в отношении ADVATE® также был продемонстрирован по активности FVIII, измеренной хромогенным анализом (табл. 9), который был сравним с данными, полученными aPTT анализом. Оценка воздействия, т.е. C<sub>max</sub> и AUC<sub>INF</sub>, тем не менее была слегка выше для хромогенного анализа, чем для одностадийного анализа (aPTT) образования сгустка для обоих препаратов ADVATE® и rFVIII<sup>Fc</sup>.

Таблица 9. PK параметры при двустадийном (хромогенном) анализе для rFVIII Fc и ADVATE® по группам дозирования

Параметр	Доза: 25 МЕ/кг (N=6)			Доза: 65 МЕ/кг (N=9)		
	ADVATE® Среднее геом. [95% ДИ]	rFVIII Fc Среднее геом. [95% ДИ]	Среднее геом. соотношение [95% ДИ] (p- значение)	ADVATE® Среднее геом. [95% ДИ]	rFVIII Fc Среднее геом. [95% ДИ]	Среднее геом. соотношение [95% ДИ] (p- значение)
C <sub>max</sub> _OBS (МЕ/дл)	75,5 [65,5; 87,1]	76,5 [64,9; 90,1]	1,01 [0,940; 1,09] (p = 0,686)	175 [143; 215]	182 [146; 227]	1,04 [0,900; 1,20] (p = 0,571)
AUC <sub>INF</sub> (час*МЕ/дл)	1060 [822; 1360]	1660 [1300; 2120]	1,57 [1,38; 1,80] (p < 0,001)	2270 [1670; 3070]	4280 [2960; 6190]	1,89 [1,61; 2,21] (p < 0,001)
t <sub>1/2</sub> (час)	10,5 [8,49; 12,9]	16,7 [13,8; 20,1]	1,59 [1,35; 1,87] (p < 0,001)	10,8 [8,16; 14,2]	19,8 [14,3; 27,5]	1,84 [1,60; 2,12] (p < 0,001)
MRT (часов)	15,0 [12,2; 18,6]	23,9 [19,8; 28,9]	1,59 [1,35; 1,87] (p < 0,001)	15,4 [11,7; 20,4]	28,5 [20,5; 39,6]	1,85 [1,61; 2,12] (p < 0,001)
CL (мл/час/кг)	2,35 [1,80; 3,06]	1,49 [1,16; 1,92]	0,636 [0,557; 0,727] (p < 0,001)	2,87 [2,12; 3,89]	1,52 [1,05; 2,20]	0,530 [0,453; 0,620] (p < 0,001)
V <sub>ss</sub> (мл/кг)	35,5 [30,5; 41,3]	35,9 [30,4; 42,3]	1,01 [0,898; 1,14] (p = 0,822)	44,5 [36,7; 54,1]	43,4 [38,2; 49,4]	0,975 [0,863; 1,10] (p = 0,653)
Постепенное восстановление (МЕ/дл на МЕ/кг)	3,05 [2,62; 3,54]	3,09 [2,61; 3,66]	1,01 [0,940; 1,09] (p = 0,679)	2,70 [2,20; 3,31]	2,80 [2,24; 3,50]	1,04 [0,900; 1,20] (p = 0,571)

ДИ - доверительный интервал; среднее геом. - среднее геометрическое; OBS - наблюдаемое. Оценённые средние значения, 95% ДИ для средних значений и средние отличия были трансформированы для получения оценённых средних геометрических значений, 95% ДИ средних геометрических значений и среднегеометрических соотношений, соответственно.

Корреляция между фактором фон Виллебранда и распределением rFVIII Fc. В связи с тем, что большинство молекул FVIII находятся в циркуляции в комплексе с VWF, Lenting P.J. и др., *J. Thromb. Haemost.* 5: 1353-60 (2007) и из-за того, что в ходе связанного с определением полного генома исследования определены генетические детерминанты уровней FVIII, которые изначально независимы от уровней VWF, Smith N.L. и др., *Circulation* 727:1382-1392 (2010), изобретателями обнаружена связь между концентрациями VWF и rFVIII Fc. Сильная корреляция наблюдалась между концентрацией VWF и значениями CL и t<sub>1/2</sub> для обоих препаратов rFVIII Fc и ADVATE®. Как показано на фиг. 11A и 11B, как только увеличивалось содержание VWF, так сразу происходило снижение значения CL rFVIII Fc (p=0,0016) и ADVATE® (p=0,0012). Противоположное взаимодействие наблюдали между концентрацией VWF и t<sub>1/2</sub>. Как только увеличивалось содержание VWF, так сразу происходило возрастание значения t<sub>1/2</sub>. rFVIII Fc (p=0,0003) и ADVATE® (p<0,0001). Эта корреляция указывает, что функциональная группа rFVIII Fc не изменяет роли VWF в защите FVIII от клиренса.

Влияние пролонгированной PK препарата rFVIII Fc на цельную кровь при определении методом ROTEM®: перед введением исследуемого препарата к пробе крови пациента из каждой группы дозирования добавили равные дозы rFVIII Fc или ADVATE® и эти пробы проанализировали методом ROTEM® для цельной крови. Время образования сгустка (СТ) было линейным в отношении дозы препаратов rFVIII Fc и ADVATE® в диапазоне приблизительно 1-100% от нормы. И у одного и того же пациента этот эффект дозы был сравним у обоих препаратов rFVIII Fc и ADVATE® (данные не показаны), что указывает на сравнимую активность rFVIII Fc и ADVATE® для формирования сгустка.

Несмотря на варьирование исходных значений СТ из-за остаточных уровней активности FVIII перед введением доз ADVATE® или rFVIII Fc, оба препарата эффективно корректировали СТ до получения сравнимых значений через 30 мин после инъекций (см. фиг. 12A и 12B). Лучшие значения СТ через 3 ч после получения дозы 25 МЕ/кг (фиг. 12A) и после 24 ч получения дозы 65 МЕ/кг (фиг. 12B) дольше сохранялись для препарата rFVIII Fc, чем ADVATE®.

Препарат rFVIII Fc хорошо переносился пациентами в обеих дозах. Не наблюдалось клинически значимых изменений показателей анализов гематологии, химии крови и мочи. Большинство НЯ были лёгкими, не связанными с rFVIII Fc, и проходили без последствий. Во время этого исследования не про-

изошло серьёзных НЯ или гибели пациентов. И ни у одного пациента не появилось нейтрализующих или связывающих антител к белку rFVIII<sub>Fc</sub>.

Препарат rFVIII<sub>Fc</sub> продемонстрировал значительно улучшенный PK-профиль активности FVIII в отношении ADVATE®, со значениями  $t_{1/2}$  и MRT среди уровней доз в 1,54 и 1,71 раза дольше при измерении одностадийным анализом образования сгустка (aPTT) и в 1,59 и 1,84 раза дольше при измерении двустадийным хромогенным анализом. Пролонгированная активность rFVIII<sub>Fc</sub> предполагает возможное продолжение эффективности, позволяя использовать менее частый режим дозирования в профилактическом лечении пациентов с гемофилией А.

Применение PK параметров, полученных в этом исследовании для моделирования Монте-Карло, показало, что у большего процента пациентов, принимавших rFVIII<sub>Fc</sub>, будут сохраняться уровни активности FVIII выше 1 и 3%, по сравнению с пациентами, принимавшими равные дозы препарата ADVATE® (табл. 10). Например, было предсказано, что при введении дозы 25 МЕ/кг у 12,2% пациентов, лечившихся ADVATE®, по сравнению с 71,2% пациентов, лечившихся rFVIII<sub>Fc</sub>, были минимальные концентрации FVIII более 1% на 4 день. А при введении дозы 65 МЕ/кг у 11,0% пациентов, лечившихся ADVATE®, по сравнению с 66,4% пациентов, лечившихся rFVIII<sub>Fc</sub>, были найдены минимальные концентрации FVIII более 3% на 4 день. Планируется проведение клинических испытаний на большем количестве пациентов для подтверждения результатов исследования фаз 1/2a и расчётов моделирования Монте-Карло.

Таблица 10. Предсказанный процент пациентов, достигающих минимальных уровней более 1 и 3% от нормальной активности в определённом режиме дозирования препаратов ADVATE® или rFVIII<sub>Fc</sub>

Временные точки после дозирования (Сутки)	ADVATE®		rFVIII <sub>Fc</sub>	
	25 МЕ/кг	65 МЕ/кг	25 МЕ/кг	65 МЕ/кг
	Процент пациентов с минимальными уровнями FVIII более 1%			
3	40,0	67,8	92,6	99,0
4	12,2	31,0	71,2	90,0
5	4,20	13,6	39,4	71,6
7	0,200	1,40	7,80	26,4
	Процент пациентов с минимальными уровнями FVIII более 3%			
3	10,6	34,6	62,2	91,0
4	1,60	11,0	25,4	66,4
5	0,200	3,20	7,00	36,2
7	0	0,200	0,400	6,60

При определении коагуляции *in vitro* не продемонстрировано потери удельной активности rFVIII<sub>Fc</sub>, по сравнению с FVIII с удалённым В-доменом или природным FVIII и анализом образования сгустка и хромогенным анализом с использованием коммерчески доступных реактивов и обычно используемых референтных стандартов FVIII (Dumont и др., Blood (2012), предварительная публикация онлайн DOI: 10.1182/blood-2011-08-367813). Кроме того, эти результаты указывают на то, что препарат rFVIII<sub>Fc</sub> может быть надёжно количественно определяем в клинической лаборатории одностадийным анализом или хромогенным анализом.

В заключение следует отметить, что в этом клиническом исследовании фаз 1/2a продемонстрирована безопасность и пролонгированный период  $t_{1/2}$  препарата rFVIII<sub>Fc</sub> у пациентов с серьёзной формой гемофилии А. Продолжается основное исследование препарата rFVIII<sub>Fc</sub> фазы 3 для определения эффективных профилактических режимов дозирования для больных гемофилией А.

Пример 10. Фармакокинетика и эффективность препарата rFVIII<sub>Fc</sub> на моделях мышей и собак с гемофилией А.

Была проведена оценка фармакокинетики и эффективности препарата rFVIII<sub>Fc</sub> по сравнению с rFVIII на моделях мышей и собак с гемофилией А, в целях подтверждения исследований на человеке. rFVIII<sub>Fc</sub> представляет собой гетеродимерный белок с единственным FVIII с удалённым В-доменом (УВД), рекомбинантно связанный с Fc-доменом человеческого иммуноглобулина G1 (IgG1). Обычные димерные Fc-слияния, создаваемые путём соединения мономерного эффекторного белка с мономером Fc и дальнейшим соединением через дисульфидную связь с образованием димера, были неэффективны для больших белков коагуляции, таких как FVIII. Поэтому мы разработали методы создания новых конструкций Fc-белков слияния, в которых одна (мономерная) эффекторная молекула присоединяется к Fc (Dumont J.A., и др., BioDrugs 20(3):151-60 (2006)), (Dumont J.A. и др., Journal of aerosol medicine. 18(3):294-303 (2005)), (Bitonti и др., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101(26):9763-9768 (2004)). Этот подход применён изобретателями для ряда белков, включая rFIX человека (Peters R.T. и др., Blood. 115(10):2057-2064 (2010)), rFVIIa (Salas J. и др., J. Thromb. Haemost. 9(s2):O-TU-026. doi: 10.1111/j.1538-

7836.2011.04380\_2.x(2011)), и белка rFVIII с УВД (BDD rFVIII).

Материалы и методы.

Рекомбинантный белок слияния FVIII-Fc (rFVIII-Fc). Плазмида экспрессии pBUDCE4.1 (Invitrogen) белка rFVIII-Fc содержала две кассеты экспрессии. Одна кассета экспрессии находилась под контролем промотора CMV, за сигнальной последовательностью природного FVIII человека следовал фрагмент FVIII УВД (слияние положений S743-Q1638) непосредственно связанный с Fc-участком IgG1 человека (аминокислоты от D221 до K457, нумерация EU) без промежуточной последовательности. В другой кассете использован промотор EF1a для экспрессии только одного Fc-участка с гетерологичной сигнальной последовательностью IgKV мыши. Эмбриональные клетки почки человека линии 293 (HEK293H, Invitrogen) были трансфицированы этой плазмидой и была получена стабильно клонирующаяся суспензионная клеточная линия, которая экспрессировала белок rFVIII-Fc. Белок rFVIII-Fc очистили от разработанной среды накопления для культуры клеток с использованием процесса очистки на трёх колонках, включающем стадию аффинной очистки, специфической для FVIII (McCue J. и др., *J. Chromatogr. A.*, 1216(45):7824-30 (2009)), с последующей комбинацией хроматографической очистки на анионообменных колонках и колонках гидрофобного взаимодействия.

Рекомбинантный белок FVIII(rFVIII). Рекомбинантные препараты FVIII УВД (REFACTO® и XYNTHA®) и полноразмерным FVIII (ADVATE®) были приобретены в компании Novis Pharmaceuticals (Miami, FL) и приготовлены в соответствии с инструкциями производителей.

Животные. Мыши с гемофилией А (HemA), несущие нокаут экзона 16 гена FVIII на фоне 129 x B6 были получены у д-ра Х. Казазияна в Университете штата Пенсильвания (Bi L. и др., *Nat. Genet.* 10(1):119-121 (1995)) и выращены в лаборатории Biogen Idec изучения гемофилии. Трансгенные мыши с нокаутом мышинного гена FcRn (FcRn KO) и геном FcRn человека были получены из мышей линии C57BL/6J у д-ра Дэри Рупениана в лаборатории Jackson в г. Бар Харбор, штат Мэн, США. Генотипы мышей FcRn KO являются такими mFcRn (-/-) и mβ2m (-/-), а мышей Tg32B - mFcRn (-/-), mβ2m (-/-), hFcRn (+/+) и hβ2m (+/+). Мыши C57BL приобретены в лаборатории Jackson (г. Бар Харбор, штат Мэн). Все виды деятельности, связанные с животными, одобрены требованиям Институциональными Комитетами по уходу за животными и их использованию и выполнялись согласно "Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных".

Собаки с гемофилией А были получены из инбредной колонии, поддерживаемой в лаборатории исследования крови Фрэнсиса Авена (Francis Owen Blood Research Laboratory) в Университете штата Северная Каролина, г. Чапел Хил. Эти собаки были поражены серьёзной формой гемофилии с фенотипом, сравнимым с серьёзной формой человеческого заболевания (Graham J.B. and Buckwalter J.A. и др., *The Journal of Exp. Med.* 90(2):91-111 (1949)), (Lozier J.N. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(20): 12991-12996 (2002)).

Фармакокинетические (ПК) исследования на мышах. ПК показатели препаратов rFVIII-Fc и rFVIII (XYNTHA®) оценивали на мышах с HemA C57BL/6, FcRn KO и Tg32B после внутривенного введения доз 125 МЕ/кг. Кровь собирали из полой вены в одну десятую объёма 4% цитрата натрия через 5 мин и 4, 8, 16, 24, 32, 48, 54 и 72 ч после дозирования препарата rFVIII-Fc и через 5 мин и 1, 4, 8, 16, 20, 24, 32 и 48 ч после дозирования препарата rFVIII (4 мыши/временная точка/лечение). Плазма быстро замораживалась в бане из этанола/сухого льда и хранилась при -80°C до выполнения анализа активности FVIII с использованием специфического для FVIII человека хромогенного анализа (набор FVIII Coatest SP от компании DiaPharma [West Chester, OH]). Фармакокинетические параметры оценивали некомпартментным моделированием с применением программы WINNONLIN® версия 5.2 (Pharsight, Mountain View, CA).

Исследования эффективности на мышах с HemA. Все исследования эффективности выполнялись вслепую. Эффективность препарата для острого случая кровотечения изучалась на модели кровотечения надрезания хвоста. Самцы мышей с HemA (8-12-недельного возраста) анестезировали смесью препаратов 50 мг/кг кетамина и 0,5 мг/кг дексметомидина. Потом хвосты погружали в солевой раствор при 37°C в течение 10 мин для расслабления боковой вены с последующим введением в вену препаратов rFVIII-Fc, rFVIII (ADVATE®) или плацебо. Через 5 мин отрезали 1 см от края хвоста, и вытекающая кровь собиралась в 13 мл тёплого солевого раствора в течение 30 минут. Кровопотеря количественно измерялась гравиметрически.

Профилактическую эффективность изучали в модели кровотечения методом рассечения хвостовой вены (PXB), как описано ранее (Pan J. and Kim J.Y., *Blood.* 114(13):2802-2811 (2009)), за исключением того, что мыши с HemA получали однократное введение 12 МЕ/кг rFVIII-Fc, rFVIII (ADVATE®) или плацебо за 24 или 48 ч до рассечения боковой хвостовой вены. Доза в 12 МЕ/кг была определена в предыдущем эксперименте измерения эффективности дозы rFVIII, в котором при 12 МЕ/кг достигалось 50% защита мышей с HemA при повреждении PXB, причинённом через 24 ч после дозирования (данные не показаны).

Исследования на собаках с HemA. При PK/PD исследовании однократного дозирования rFVIII-Fc две собаки с врождённой гемофилией А (M10 и M11) получали внутривенные дозы препарата 125 МЕ/кг. Образцы крови собирали до дозирования и после дозирования препарата через 5 и 30 мин и 1, 2, 4, 8, 24,

32, 48, 72, 96, 144 и 168 ч для определения времени сворачивания цельной крови (WBCT). Отборы крови для определения активности FVIII (aPTT и хромогенный анализы), наличия антигенов к rFVIII<sub>Fc</sub>(ELISA), гематологические испытания и показателей химии крови, включали временные точки, указанные выше для анализа WBCT, а также через 15 минут и 3, 6 и 12 ч после введения дозы.

В следующем исследовании последовательного применения препарат rFVIII (REFACTO®) вводили внутривенно в дозе 114 МЕ/кг собаке M12 и 120 МЕ/кг собаке M38. Показатель WBCT измеряли до тех пор, пока время свёртывания не стало  $\geq 20$  мин (это время соответствовало содержанию FVIII:C  $\leq 1\%$ ), и также отбирали образцы в указанных временных точках для определения активности FVIII (aPTT и хромогенный анализы), наличия антигенов к rFVIII<sub>Fc</sub>(ELISA) и гематологических испытаний. Потом этим же собакам внутривенно вводили 125 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub> и образцы крови отбирали для проведения анализов WBCT, aPTT, ELISA, определения показателей гематологии и химии сыворотки крови. Временные точки для анализа WBCT включали момент до дозирования и через 5 и 30 мин и 1, 2, 4, 8, 24, 32, 48 и 72 ч после дозирования препаратов rFVIII и rFVIII<sub>Fc</sub>. Кровь также отбирали через 96, 120, 144 и 168 ч после дозирования rFVIII<sub>Fc</sub>. Отборы крови для определения активности FVIII и наличия антигенов включали временные точки, указанные выше для анализа WBCT, а также через 15 мин и 3, 6 и 12 ч после введения дозы. Анализы WBCT и aPTT выполнялись, как указано выше (Herzog и др., Nat. Med. 5(1):56-63 (1999)).

Определение активности FVIII хромогенным анализом. Активность FVIII в плазме собак с гемофилией А анализировали автоматизированным хромогенным анализом на приборе Sysmex CA1500 (Sysmex, IL) с реактивами компании Siemens Healthcare Diagnostics (Dallas, TX). Стандартная кривая строилась с помощью концентрата 7-го международного стандарта FVIII (NIBSC code 99/678), добавленного в плазму человека с удалённым FVIII (Stago, USA) в концентрациях в пределах 1,5-0,016 МЕ/мл. Активность FVIII в плазме мышей измеряли с помощью набора для количественного определения FVIII Coatest SP компании Chromogenix (DiaPharma, Lexington, MA), согласно инструкциям изготовителя. Стандартную кривую строили с использованием серийных разведений rFVIII<sub>Fc</sub> или rFVIII с концентрацией от 100 до 0,78 МЕ/мл в буферном растворе, содержащем необработанную плазму мышей с гемофилией А. Для измерения активности FVIII человека в плазме мышей C57BL/6, FcRn KO и Tg32B введённые в плазму мышей препараты rFVIII<sub>Fc</sub> или rFVIII сначала связывали моноклональными антителами, специфическими к FVIII человека mAb GMA8016 (Green Mountain Antibodies, VT), с последующим проведением стандартного анализа с набором Coatest.

Определение методом ELISA антигенов, специфичных к белкам rFVIII и rFVIII<sub>Fc</sub>. Уровни содержания антигенов к rFVIII и rFVIII<sub>Fc</sub> в плазме собак с гемофилией А измеряли методом иммуноферментного анализа (ELISA) согласно стандартному протоколу методики. Как антитела связывания использовали моноклональные антитела, специфичные к A1-домену FVIII, mAb GMA-8002 (Green Mountain Antibodies, Burlington, VT). Для обнаружения rFVIII были использованы поликлональные антитела F8C-EIA-D против FVIII, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) (Affinity Biologicals). Для обнаружения rFVIII<sub>Fc</sub> были использованы конъюгированные с HRP антитела ослика против фрагмента (F(ab)<sub>2</sub>) человека 709-036-098 (Jackson Immunologicals).

SPR анализ взаимодействия молекул rFVIII<sub>Fc</sub>-FcRn. Эксперименты по поверхностному плазмонному резонансу были выполнены на приборе Biacore T100. Сенсорные чипы CM5 исследовательского уровня, буферные растворы и реактивы для иммобилизации были приобретены в компании Biacore (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Препараты одноцепочечных рецепторов FcRn мыши, собаки и человека были иммобилизованы стандартным аминным связыванием с соседними проточными ячейками одного чипа с плотностью приблизительно 370 резонансных единиц (РЕ) с последующим блокированием этаноламином. Ассоциацию в равновесном состоянии Fc-содержащих аналитов (FVIII<sub>Fc</sub> и IgG) с иммобилизованными молекулами FcRn разных видов оценивали последовательным введением аналитов в 16 концентрациях (0,0625-2000 нМ) при pH 6,0 в проточном буфере (50 мМ MES [4-морфолинэтансульфоновой кислоты], 250 мМ хлорида натрия, 2 мМ хлорида кальция, 0,01% Твин 20 [монолаурат полиэтиленгликоль-сорбитана]). Каждый цикл измерений выполнялся дважды и включал 45 мин фазы ассоциации и 15 мин фазы диссоциации, обе при скорости потока 5 мкл/мин, с последующей регенерацией двумя инъекциями 1М раствора Трис-НСl при 25 мкл/мин. После двойного вычитания исходных уровней (пустая проточная ячейка и чистый проточный буфер) отклики связывания записывали вблизи завершения фазы ассоциации и откладывали на графике как функцию концентрации аналита от значений эффективной концентрации 50% ( $ЭК_{50}$ )(50%  $R_{max}$ ), сопоставляемые путём анализа данных построением нелинейной регрессии.

Статистический анализ. В программе GraphPad Prism 5 (Graph-Pad Software Inc., La Jolla, CA) были выполнены: t-тест для одной выборки, тест Манна-Уитни, тест Краскела-Уоллиса с преобразованием Данна, построение кривых выживаемости и логрангового теста. Двустороннее Р-значение было менее 0,05, что считается статистически значимым.

Результаты.

Рекомбинантный белок связывания FVIII Fc (rFVIII<sub>Fc</sub>). rFVIII<sub>Fc</sub> является рекомбинантным белком связывания FVIII человека с удалённым В-доменом с Fc-частью IgG1 человека без промежуточной линкерной последовательности (фиг. 14), который получен в хорошо охарактеризованной линии клеток НЕК

293Н. Белок rFVIII<sub>Fc</sub> протеолитически расщепляется внутри клетки с образованием тяжёлой цепи размером ~90 кДа и лёгкой цепи-Fc ~130 кДа, которые нековалентно связаны между собой посредством металл-ионных взаимодействий, опосредованных доменами A1 и A3 молекулы FVIII. Средняя удельная активность rFVIII<sub>Fc</sub> четырнадцати отдельных серий составила 8460±699 МЕ/мг при определении одностадийным анализом образования сгустка (аРТТ) и 9348±1353 МЕ/кг при определении хромогенным анализом, что соответствует значениям 1861±154 и 2057±298 МЕ/нмоль. Удельная активность rFVIII<sub>Fc</sub> является сравнимой с такой дикого типа FVIII плазмы человека (1429 МЕ/нмоль) (Butenas S. and Mann K.G., Biochemistry (Mosc). 67(1):3-12 (2002)). Таким образом, FVIII-активность белка rFVIII<sub>Fc</sub> не изменилось при слиянии C-терминального конца молекулы FVIII человека с N-терминальным концом Fc человека и результаты, полученные аРТТ и хромогенным анализом, находились в пределах один от другого примерно 10%.

Связывание rFVIII<sub>Fc</sub> с FcRn. Методом поверхностного плазмонного резонанса оценивали аффинность белка rFVIII<sub>Fc</sub> с одноцепочечными рецепторами FcRn мыши, собаки и человека. Скорости ассоциации и диссоциации комплекса rFVIII<sub>Fc</sub> и FcRn мыши были намного меньше, чем такие скорости для FcRn собаки и человека. Степень полумаксимального связывания (ЭК<sub>50</sub>) rFVIII<sub>Fc</sub> и FcRn человека была приблизительно в 4 раза слабее, чем для FcRn собаки и более чем в 20 раз меньше чем с FcRn мыши (табл. 11). Сходным образом, IgG1 человека также выявил наибольшую аффинность с FcRn мыши, тогда как аффинность связывания с FcRn собаки была меньше по сравнению с FcRn мыши, но больше по сравнению с FcRn человека (табл. 11).

Таблица 11. Результаты поверхностного плазмонного резонанса связывания FcRn мыши, собаки и человека с rFVIII<sub>Fc</sub> и IgG1 человека

Образец Fc*	FcRn	Плотность FcRn (PE)	ЭК <sub>50</sub> (нМ) †	Rmax (PE)
rFVIII <sub>Fc</sub>	мыши	370	< 1,5 ‡	581,4
rFVIII <sub>Fc</sub>	собаки	367	8,6	499,3
rFVIII <sub>Fc</sub>	человека	369	33,4	365,4
IgG1 человека	мыши	378	< 22,4 ‡	320,0
IgG1 человека	собаки	367	196,3	282,2
IgG1 человека	человека	378	558,4	211,0

\*rFVIII<sub>Fc</sub> или IgG1 вводили в проточную ячейку, в которой различные молекулы FcRn были химически конъюгированы в приблизительно равных плотностях (~370 PE).

†ЭК<sub>50</sub> значения (50% R<sub>max</sub>) являлись средними значениями, полученными при регрессионном анализе кривых отклика связывания подобранных для 16 концентраций аналитов (0,0625-2000 нМ) двух повторностях.

‡Из-за высокой аффинности кривые связывания при низких концентрациях не достигли равновесия при нормальных условиях эксплуатации прибора.

FcRn-зависимое улучшение фармакокинетики rFVIII<sub>Fc</sub> у мышей. Взаимодействие Fc с FcRn рассматривается как основной механизм продления периода полувыведения IgG и Fc-белков слияния. Для подтверждения того, что этот механизм действия также отвечает за продления периода полувыведения rFVIII<sub>Fc</sub>, мы сравнили фармакокинетические (ПК) профили rFVIII<sub>Fc</sub> с профилями rFVIII у мышей с дефицитом FVIII (HemA) (фиг. 15A), здоровых мышей (C57BL/6) (фиг. 15B), мышей с дефицитом FcRn (FcRn KO) (фиг. 15C) и трансгенных мышей с FcRn человека (фиг. 15D) после однократного внутривенного введения дозы препарата 125 МЕ/кг.

ПК параметры (табл. 12) определены хромогенным измерением активности FVIII человека в плазме мышей. Период t<sub>1/2</sub> для rFVIII<sub>Fc</sub> был в 1,8-2,2 раза больше, чем для rFVIII у мышей с HemA (13,7 против 7,6 ч) и здоровых мышей (9,6 против 4,3 ч). Увеличение t<sub>1/2</sub> для rFVIII<sub>Fc</sub> по отношению к rFVIII отсутствовало у мышей FcRn KO (6,4 против 6,9 ч) и наблюдалось у трансгенных мышей Tg32B с FcRn человека (9,6 против 4,1 ч). Таким образом, эти результаты подтверждают, что взаимодействие rFVIII<sub>Fc</sub> с рецептором FcRn, обуславливает продление t<sub>1/2</sub> препарата. Более того, согласованность с улучшением значения t<sub>1/2</sub> rFVIII<sub>Fc</sub> также отмечена в 1,6-2,4-кратном увеличении MRT и 1,2-1,8-кратном увеличении системного воздействия (AUC) по сравнению с препаратом rFVIII у мышей экспрессирующих FcRn (HemA, C57B1/6 и Tg32B), но не у мышей FcRn KO.

Таблица 12. Сводка PK параметров для препаратов rFVIIIc и rFVIII для разных линий мышей

Линия мышей	HemA <sup>†</sup>		C57BL/6 <sup>†</sup>		FcRn KO <sup>†</sup>		Трансгенная линия hFcRn (Tg32B) <sup>†</sup>	
	rFVIIIc*	rFVIII*	rFVIIIc*	rFVIII*	rFVIIIc*	rFVIII*	rFVIIIc*	rFVIII*
C <sub>max</sub> (мМЕ/мл)	2613,6	2710,4	2356,2	2000,1	2734,9	2458,4	3135,3	3137,0
Период полу-выведения (часов)	13,7	7,6	9,6	4,3	6,4	6,9	9,6	4,1
MRT (часов)	17,6	11,0	9,8	5,4	6,3	8,5	12,8	5,4
V <sub>ss</sub> (мл/кг)	68,2	49,2	67,5	50,8	49,3	51,6	64,1	49,6
CL (мл/час/кг)	3,9	4,5	6,9	9,3	7,8	6,1	4,1	7,3
AUC (час*мМЕ/мл)	32332,4	28026,8	18089,1	13404,0	16087,2	20609,3	30534,5	17165,7

C<sub>max</sub> - максимальная активность FVIII в плазме после инфузии; MRT - среднее время удержания; V<sub>ss</sub> - объём распределения в равновесном состоянии; CL - клиренс; AUC - площадь под кривой.

<sup>†</sup>PK параметры препаратов rFVIII и rFVIIIc сравнивались только среди той же линии мышей, но не между линиями, так как одна и та же молекула может показать различные значения t<sub>1/2</sub> в разных линиях мышей.

\*Оценка PK каждой молекулы использовалась в группе из 36 мышей, образцы отбирали путём создания кровотечения хвостовой полостью вены для 4 мышей каждой из 9 временных точек. Средние значения группы в каждой временной точке использовали в некомпартментном моделировании в программе WIN-NONLIN® для получения оценочных параметров.

rFVIIIc является полностью активным препаратом для лечения острых случаев кровотечений у мышей с HemA. Для оценки эффективности препарата rFVIIIc для острого случая кровотечения в сравнении с rFVIII мыши с HemA (16-20 мышей/группа) были обработаны повышающими дозами препаратов (24, 72 и 216 МЕ/кг) rFVIIIc или rFVIII и им нанесли повреждения надрезанием хвоста через 5 мин после введения доз. По сравнению с мышами, получившими плацебо (n=18), у которых медиана кровопотери составила 1 мл, получение обоих препаратов rFVIIIc и rFVIII привело к статистически значимому повышению защиты (P<0,05, тест Краскал-Уоллиса в обработке Данна) (фиг. 16). Медиана кровопотери с возрастом доз постепенно снижалась, достигая максимального снижения в 0,23 мл при дозе 72 МЕ/кг rFVIIIc и 0,20 мл при дозе 216 МЕ/кг rFVIII. В общем, кровопотери были сравнимы у животных, принявших равные дозы rFVIIIc или rFVIII, что указывает на то, что оба препарата обладают сравнимой активностью для предотвращения острого артериального кровотечения.

Пролонгированная профилактическая эффективность препарата rFVIIIc для мышей с HemA. Для определения того, может ли пролонгирование PK параметров привести к пролонгации защиты от повреждений, мы сравнили профилактическую эффективность препаратов rFVIIIc и rFVIII на мышях с HemA. Через 24 ч после внутривенного введения дозы 12 МЕ/кг проводилось рассечение одной боковой вены хвоста мышью с HemA. После нанесения повреждения выжило 49% (n=39) мышей, получивших препарат rFVIII, по сравнению с 100% (n=19) выживших мышью, получивших препарат rFVIIIc, логранговый тест) (фиг. 17A). Для дальнейшей демонстрации того, что rFVIIIc дольше сохраняет длительную эффективность, мышам с HemA нанесли повреждения через 48 ч после введения дозы 12 МЕ/кг rFVIIIc. Тем не менее, 58% (n=40) мышью, получивших препарат rFVIIIc, выжили, что сходно с результатом для мышью, получивших препарат rFVIII (49%) после 24 ч введения дозы (фиг. 17A). Результаты лечения как препаратом rFVIIIc, так и препаратом rFVIII было значительно лучше, чем для контрольной группы, получившей плацебо (n=30), в которой только 3% мышью выжили после повреждения (P<0,0001) (фиг. 17A). Улучшение и пролонгирование профилактической эффективности rFVIIIc также очевидно при измерении случаев повторных кровотечений после нанесения повреждения (фиг. 17B). В то время как 100% мышью, получивших плацебо, пережили повторные кровотечения в течение 10 ч после рассечения хвостовой вены, 87% мышью, получивших rFVIII, и 47% мышью, получивших rFVIIIc, пережили повторные кровотечения после повреждения, причинённого через 24 ч после дозирования препаратов, соответственно (P=0,002, rFVIIIc в сравнении с rFVIII) (фиг. 17B). Профиль повторного кровотечения для мышью, получивших rFVIIIc и травмированных через 48 ч, в значительной степени сравнимый с профилем мышью, получивших rFVIII и травмированных через 24 ч после получения препарата. В противоположность этому, оба профиля выживания и повторных кровотечений для мышью, получивших rFVIII и травмированных через 48 ч, являются неразличимыми от профиля для группы, получившей плацебо (данные не показаны). Поэтому эти результаты показывают, что rFVIIIc защищает мышью с HemA от

повреждения хвостовой вены в два раза дольше, чем такая защита от такой же дозы препарата rFVIII.

Улучшенные показатели РК/PD у собак с гемофилией А. Показатели РК и фармакодинамики (PD) для препарата rFVIII<sub>Fc</sub> также изучались на собаках с гемофилией А. После внутривенного введения дозы 125 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub> показатель WBCT немедленно возвращался к норме, которая у здоровых собак находится в пределах 8-12 мин (фиг. 18А и В). Значение WBCT сохранялось на уровне менее 20 мин, что указывает на активность FVIII >1%, в течение примерно 4 суток у 3 из 4 собак, получивших препарат rFVIII<sub>Fc</sub>, и 3 дня у оставшейся собаки (фиг. 18А). У собаки M12, получившей 114 МЕ/кг rFVIII, и собаки M38, получившей 120 МЕ/кг rFVIII, WBCT было также скорректировано до нормального значения незамедлительно после дозирования. Однако значение WBCT сохранялось на уровне менее 20 мин в течение 2 суток у M12 и 3 суток у M38, что приблизительно в 1,5-2 раза меньше, чем период, достигнутый при применении препарата rFVIII<sub>Fc</sub> (фиг. 18В). Более того, лечение как препаратом rFVIII<sub>Fc</sub>, так и препаратом rFVIII также сходным образом улучшило время свёртывания в анализе aPTT через 5 мин после дозирования.

РК появления антигена rFVIII<sub>Fc</sub> (фиг. 19А) определялась измерением концентрации rFVIII<sub>Fc</sub> в плазме методом ELISA, специфичным к rFVIII<sub>Fc</sub>, который позволял обнаружить и FVIII-часть, и Fc-часть молекулы препарата. Значение  $t_{1/2}$  для антигена rFVIII<sub>Fc</sub> составляет  $15,7 \pm 1,7$  ч (фиг. 19А), что сходно с  $t_{1/2}$  активности rFVIII<sub>Fc</sub> (фиг. 19В), при измерении хромогенным анализом:  $15,4 \pm 0,3$  ч (табл. 13). Существует хорошая корреляция между активностью FVIII и данными по антигену rFVIII<sub>Fc</sub>, тем самым демонстрируя то, что белок rFVIII<sub>Fc</sub> обладает полной активностью в условиях *in vivo*.

Таблица 13. Сводка РК параметров для препаратов rFVIII<sub>Fc</sub> и rFVIII для собак с гемофилией А

РК по данным измерения активности FVIII					
Лечение	$C_{max}$ (МЕ/мл)	AUC (час·МЕ/мл)	$T_{1/2}$ (часов)	CL (мл/час/кг)	$V_{ss}$ (мл/кг)
rFVIII <sub>Fc</sub> *	$2,0 \pm 0,54$	$25,9 \pm 6,47$	$15,4 \pm 0,3$	$5,1 \pm 1,4$	$86,4 \pm 14,0$
rFVIII†	2,0	18,2	7,4	6,5	64,0
РК по данным измерения rFVIII и антигена rFVIII <sub>Fc</sub>					
Лечение	$C_{max}$ (нг/мл)	AUC (час·нг/мл)	$T_{1/2}$ (часов)	CL (мл/час/кг)	$V_{ss}$ (мл/кг)
rFVIII <sub>Fc</sub> *	$210 \pm 33$	$2481 \pm 970$	$15,7 \pm 1,7$	$6,2 \pm 3,0$	$86,1 \pm 19,2$
rFVIII†	211	1545	6,9	8,7	80,7

\*Результаты представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение (СО), полученные на 4 собаках.

†Результаты представлены в виде среднего значения. Значения СО не сообщаются, так как две собаки выбыли.

У двух собак (M12 и M38), которые также получали однократную дозу rFVIII за 72 ч перед введением дозы rFVIII<sub>Fc</sub>, значение  $t_{1/2}$  антигена rFVIII было определено равное 6,9 ч и для активности rFVIII - 7,4 ч. Поэтому период полувыведения rFVIII<sub>Fc</sub> был приблизительно в два раза большим по сравнению с периодом для препарата rFVIII по данным измерений антигена и активности.

Дополнительно были оценены число тромбоцитов и концентрация фибриногена для использования их как предварительных испытаний тромбогенности. После введения доз препарата rFVIII<sub>Fc</sub> или rFVIII число тромбоцитов и концентрация фибриногена в плазме не отличались от этих показателей до получения доз препаратов (данные не показаны).

#### Обсуждение.

Эти исследования показали, что rFVIII<sub>Fc</sub> является полностью активным препаратом для лечения острых случаев кровотечений у мышей с HemA, в дополнение к сохранению нормальной специфической активности. Другие исследования, не показанные в этой заявке, показали, что белок rFVIII<sub>Fc</sub> также является полностью функциональным во взаимодействиях с FIXa, FX и фосфолипидами при формировании X-азного комплекса (Peters и др., *J. Thromb. Haemost.* DOI: 10.1111/jth.12076 (2012)). Более того, аффинность связывания с фактором фон Виллебранда (VWF) была сравнимой между препаратами rFVIII<sub>Fc</sub> и rFVIII, со значением Kd приблизительно 1,4 и 0,8 для белков rFVIII<sub>Fc</sub> и rFVIII соответственно (Peters и др., *J. Thromb. Haemost.* DOI: 10.1111/jth.12076 (2012)).

Активность rFVIII<sub>Fc</sub> не изменялась при слиянии C-терминального конца молекулы FVIII с N-терминальным концом Fc-части, поскольку C1 и C2 домены молекулы FVIII участвовали в связывании с фосфолипидами, которое было необходимым для образования комплекта протромбиназы на поверхности активированных тромбоцитов (Foster P.A. и др., *Blood.* 75(10):1999-2004 (1990)). Однако эти данные согласовывались с наблюдением того, что остатки аминокислот предположительно связывались с фосфолипидами, например K2092/F2093 домена C1, M2199/F2200 и L2251/L2252 домена C2, эти явления, как оказалось, формируют поверхность, которая удаляет C-терминальные остатки FVIII (Shen B.W. и др., *Blood.* (2007); Ngo J.C. и др., *Structure.* 16(4): 597-606 (2008)).

Период полувыведения rFVIII<sub>Fc</sub> удвоился только у мышей, экспрессирующих эндогенный рецептор FcRn мыши или трансгенный FcRn человека, но не изменился у мышей FcRn KO (см. фиг. 15 и табл. 12),

этот результат демонстрирует, что механизм пролонгации периода полувыведения rFVIII<sub>Fc</sub> опосредован рецепторами FcRn. В то же время известно, что эндотелиальные и гепапоэтические клетки вносят одинаковый вклад в рециклинг интернализированного IgG к клеточной поверхности, что способствует продолжительности существования и защите белка от деградации (Borvak J. и др., *Int. Immunol.* 10(9):1289-1298 (1998)), (Akilesh S. и др., *J. Immunol.* 179(7):4580-4588 (2007)). Определённо не известно, какой тип(ы) клеток, экспрессирующих рецепторы FcRn, отвечает за абсорбцию и рециклинг белка rFVIII<sub>Fc</sub>. Рецепторы FcRn заметно экспрессируются в сосудистой эндотелии, эпителии почек, печени, селезёнке, а также в антиген-представляющих клетках (APC) костного мозга, включая макрофаги (Borvak J. и др., *Int. Immunol.* 10(9):1289-1298 (1998)), (Akilesh S. и др., *J. Immunol.* 179(7):4580-4588 (2007)), (Yoshida M. и др., *Immunity.* 20(6):769-783 (2004)). Поскольку FVIII циркулирует в основном (~98%) в виде комплекса с VWF (Lenting P.J. и др., *J. Thromb. Haemost.* 5(7):1353-1360 (2007)), и оба белка совместно локализованы с макрофагами в печени и селезёнке, когда рекомбинантные белки FVIII и VWF вводятся вместе мышам с дефицитом VWF (van Schooten C.J. и др., *Blood.* 112(5):1704-1712 (2008)), то макрофаги могут играть роль в спасении rFVIII<sub>Fc</sub> от деградации и пролонгировании его периода полувыведения. Однако эти результаты могут также свидетельствовать о ранее неизвестном механизме, обусловленном Fc-слиянием, катаболизмом FVIII и защитой этого белка.

Подходы для разработки методов продления периода полувыведения факторов свёртывания крови включают пэгилирование (Rostin J. и др., *Bioconjug. Chem.* 11(3):387-396 (2000)), (Mei B. и др., *Blood.* 116(2):270-279 (2010)), гликопэгилирование (Moss J. и др., *J. Thromb. Haemost.* 9(7):1368-1374 (2011)), (Negrier C. и др., *Blood.* (2011)), и конъюгацию с альбумином (Metzner H.J. и др., *Thromb Haemost.* 102(4):634-644 (2009)), (Weimer T. и др., *Thromb. Haemost.* 99(4):659-667 (2008)). Несмотря на использование методов белковой инженерии, периоды полувыведения модифицированных вариантов rFVIII оказываются максимум в два раза больше, чем у дикого типа FVIII в разнообразных моделях доклинических исследований на животных (Liu T. и др., *Blood.* 112:511 (2008)), (Karpf D.M. и др., *16(Suppl. S4):40* (2010)). Непротиворечивые результаты были продемонстрированы на людях, например, сообщалось об улучшении периода полувыведения rFVIII<sub>Fc</sub> приблизительно в 1,7 раз по сравнению с препаратом ADVATE® у пациентов с гемофилией А (Powell J.S. и др., *Blood.* (2012), предварительная публикация онлайн DOI:10.1182/blood-2011-09-382846). Это ограничение продолжительности периода полувыведения FVIII кажется связанным с VWF. У мышей с нокаутом экспрессии белков FVIII и VWF в предварительных экспериментах наблюдали 5-кратное увеличение периода полувыведения rFVIII<sub>Fc</sub> по сравнению с rFVIII (Liu T. и др., неопубликованные результаты). О подобных наблюдениях ранее сообщалось в эксперименте на мышах с нокаутом экспрессии VWF при применении пэгилированного FVIII (Mei B. и др., *Blood.* 116(2):270-279 (2010)). Рассматриваемые вместе эти результаты указывают, что VWF может быть лимитирующим фактором для дальнейшего продления периода полувыведения FVIII.

Кроме продления периода полувыведения, препарат rFVIII<sub>Fc</sub> обеспечивает дополнительные преимущества. Основной сложностью FVIII-заместительной терапии является возникновение нейтрализующих антител к FVIII (ингибиторов). Это явление встречается у 15-30% ранее не лечившихся пациентов. Белок rFVIII<sub>Fc</sub> обладает потенциалом индуцировать иммунную толерантность и, таким образом, предотвращать развитие нейтрализующих антител. Сообщалось, что В-клетки, трансдуцированные ретровирусным вектором, презентующие домены FVIII как белки Ig, специфически предотвращают или снижают циркуляцию антител у мышей с HemA (Lei T.C. and Scott D.W., *Blood.* 105(12):4865-4870 (2005)). Было также обнаружено, что Fc-содержащие регуляторные эпитопы Т-клеток способны индуцировать у регуляторных Т-клеток усиление или подавление антиген-специфических иммунных ответов в условиях *in vitro* (De Groot и др., *Blood.* 112(8):3303-3311 (2008)). В дополнение к этому FcRn-опосредованный перенос материнских IgG и Fc-белков слияния через плаценту в русло циркуляции крови плода (Simister, N.E., *Vaccine.* 21(24):3365-3369 (2003)), Grubb J.H. и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105(24):8375-8380 (2008)) может индуцировать неонатальную толерантность к белку rFVIII<sub>Fc</sub>, в то же время обеспечивая необходимую защиту новорожденного от кровотечения при родах.

В заключение, изобретателями продемонстрировано, что препарат rFVIII<sub>Fc</sub> обеспечивает приблизительно в 2 раза большую эффективную длительность действия в отношении rFVIII по защите мышей с HemA от повреждения рассечением хвостовой вены и улучшает показатель WBCT у собак с HemA. Пролонгирование эффективности хорошо коррелирует с 2-кратным увеличением  $t_{1/2}$  препарата rFVIII<sub>Fc</sub> в результате рециклинга Fc-белка слияния посредством специфических и хорошо охарактеризованных внутриклеточных механизмов.

Пример 11. Иммунотенность белка rFVIII<sub>Fc</sub> у мышей.

130 самцов мышей с гемофилией А, возрастом на начало исследования 7-9 недель, были случайным образом, учитывая возраст и вес, разделены на 13 групп лечения (n=10/группа). Мыши получали лечение повторяющимися внутривенными дозами препаратов rFVIII<sub>Fc</sub>, rFVIII-mFc, XYNTHA® или ADVATE® по 50, 100 и 250 МЕ/кг, в качестве плацебо для контрольной группы использовали три состава буферных растворов препаратов FVIII<sub>Fc</sub>, XYNTHA® and ADVATE®. Время в/в введения препаратов было 0, 7, 14, 21, 35-й день после первой в/в инъекции, а образцы крови отбирали с помощью ретро-орбитального уст-

ройства отбора крови в дни (-1), 14, 21, 28 и 42 после получения первой дозы лечения (фиг. 20).

Немедленно после отбора крови образцы плазмы отделяли центрифугированием и инактивировали в течение 30 мин обработкой нагреванием при 56°C для обеспечения точного измерения антител к FVIII. Появление суммарных антител к FVIII (фиг. 21А, 21В и 21С), нейтрализующих FVIII антител (фиг. 23) и суммарных антител к Fc (фиг. 24) было изучено с использованием образцов плазмы.

После введения доз FVIII 50 МЕ/кг на 28 день после первой инъекции только у 1 из 10 мышей в группе, получавшей препарат rFVIII-Fc, у 2 из 10 мышей в группе, получавшей rFVIII-mFc, появились определяемые антитела к FVIII по сравнению с 5 из 10 мышей и 7 из 10 мышей, получавших препараты XYNTHA® и ADVATE® (фиг. 22С). При дозе 100 МЕ/кг количество мышей, у которых появились определяемые антитела FVIII на 28 день составило 2, 5, 8 и 9 в группах, принимавших, соответственно, rFVIII-Fc, rFVIII-mFc, XYNTHA® и ADVATE® (фиг. 22С). При дозе 250 МЕ/кг количество мышей, у которых появились определяемые антитела FVIII на 28 день, составило 10, 10, 7 и 7 в группах, принимавших, соответственно, rFVIII-Fc, rFVIII-mFc, XYNTHA® и ADVATE® (фиг. 22С). Данные, соответствующие 14, 21 и 42 дням показаны, соответственно, на фиг. 22А, 22В и 22D.

В общем, изобретателями наблюдалась хорошая корреляция между суммарным количеством тел и нейтрализующих антител к FVIII ( $R^2=0,7452$ ) и титры обоих типов антител возрастали с течением времени (фиг. 23). В пределах диапазона терапевтических доз (50 и 100 МЕ/кг) количество мышей, у которых появились специфические к FVIII антитела, как и титры антител в группах, принимавших rFVIII-Fc, были значительно ниже по сравнению с препаратом ADVATE® ( $p<0,05$ ) и немного меньше по сравнению с препаратом XYNTHA® ( $p=0,05$ ). Этот результат указывает на потенциальную низкую иммуногенность препарата rFVIII-Fc.

Пример 12. Ответ лимфоцитов селезёнки к rFVIII-Fc по сравнению с коммерчески доступными препаратами rFVIII.

Определяли ответ лимфоцитов селезёнки к рекомбинантному фактору VIII (rFVIII) при его соединении с фрагментом Fc человека (hFc, IgG1) или Fc мыши (mFc, IgG2a) и сравнивали с откликом лимфоцитов селезёнки к коммерчески доступным препаратам rFVIII [полноразмерный FVIII (ADVATE®) и FVIII с удалённым В-доменом (XYNTHA®/REFACTO AF®)].

Мышам с гемофилией А (hemA) каждую неделю на протяжении 6 недель вводили 50 или 250 МЕ/кг испытуемых препаратов. На 56 день 4 мыши из каждой группы подвергли эвтаназии и отобрали спленоциты (фиг. 25). Одну половину спленоцитов использовали для определения профиля иммуногенности спленоцитов с помощью окрашивания внутриклеточных цитокинов, маркеров регуляторных Т-клеток и дендритных клеток, используя проточную цитометрию (FACS) (фиг. 26). Другую половину клеток использовали для выделения РНК и проведения определения профиля механизмов отклика, используя метод ПЦР в режиме реального времени на основе микрочипов. На фиг. 27А показан точечный график профиля результатов FACS анализа изотипного контроля. На фиг. 27В показан точечный график профиля результатов FACS анализа образцов, содержащих спленоциты позитивные по молекулам CD4 и TNF- $\alpha$ . Процентное содержание дважды положительных клеток было определено из точечных графиков во всех случаях лечения с применением препаратов и плацебо. Процентное содержание дважды положительных клеток у мышей, которым вводили FVIII, получено сравнением с группой, которой вводили плацебо.

Внутриклеточное окрашивание цитокинов выполнялось совместно с окрашиванием CD4-маркера Т-хелперных клеток и таких цитокинов, как IL-2 (фиг. 28), IL-4 (фиг. 30) и TNF- $\alpha$  (фиг. 29). IL-2 представляет собой митоген Т-клеток, участвующий в пролиферации Т-клеток, который секретируется активированными Т-клетками у мышей с hemA в ответ на присутствие FVIII. IL-4 идентифицирован как цитокин, секретируемый активированными Т-клетками у мышей с hemA в ответ на присутствие FVIII. TNF- $\alpha$  является провоспалительным цитокином, отвечающим за повышенную продукцию антител у пациентов, больных гемофилией. С использованием метода проточной цитометрии измеряли усиление флуоресценции каждого типа окрашенных молекул. Аналогичным образом определяли соотношение толерогенных и иммуногенных дендритных клеток путём окрашивания поверхности и проточным цитометрическим анализом маркеров, таких как PD-L1 (CD274) (фиг. 32) и CD80 (фиг. 33). PD-L1 представляет собой ингибиторный лиганд, который участвует во взаимодействии с рецептором PD-1 на активированных Т-клетках, таким образом, блокируя синтез IL-2, опосредованный Т-клеточным рецептором (TCR) и пролиферацию клеток. Повышенная экспрессия в дендритных клетках (DC) лигандов PD-L1 является критическим фактором, которым может ингибировать иммуногенность и повышать толерантность организма. CD80 является поверхностным маркером, обычно обнаруживаемым на дендритных клетках после фагоцитоза антигена и во время его созревания до презентующего антигена для Т-клеток. Маркер CD80 принадлежит набору корцепторов пролиферации в активирующихся Т-клетках. Возрастание окрашивания поверхностных молекул CD80 косвенно указывает на лучшее созревание и презентацию антигенов дендритными клетками.

Дополнительно процент регуляторных Т-клеток (Treg) в селезёнке оценивали совместным окрашиванием молекул CD4 и foxp3 (фиг. 34) - маркера этих клеток. Foxp3 представляет собой внутриклеточ-

ный маркер регуляторных Т-клеток. Foxp3+ Т-клетки участвуют в установлении, поддержании и адаптивном переносе периферийной толерантности, опосредованной Т-клетками.

Оценивали также наличие клеток, экспрессирующих оба маркера CD4 и Tim3 (фиг. 35) или CD279 (PD-1) (фиг. 36). Tim3 (Т-клеточный иммуноглобулиновый домен и муциновый домен 3) выступает как отрицательный регулятор ответов Т-хелперных клеток 1 (Th1-клеток). Молекула Tim3 экспрессируется также нативными иммунными клетками и может повышать уровень провоспалительных ответов. Молекула Tim3 ингибирует Th1-опосредованные ауто- и аллоиммунные реакции и действует через свой лиганд, галектин-9, для индукции клеточной гибели Th1, но не Th2 клеток. CD279 (PD-1) является представителем большого семейства CD28/CTLA-4 Т-клеточных регуляторов. Молекула PD-1 экспрессируется на поверхности активированных Т-клеток, В-клеток и макрофагов, что наталкивает на предположение, что по сравнению с CTLA-4 молекула PD-1 обеспечивает более широкую отрицательную регуляцию иммунных реакций. Среди изучаемых цитокинов есть такие, которые отвечают за иммуногенность и образование ингибиторов. У мышей, которым вводили 50 МЕ/кг rFVIII-hFc или rFVIII-mFc, отмечено существенное ингибирование уровней синтеза IL-4 и TNF- $\alpha$ , а уровень синтеза IL-2 не изменился по сравнению с группой животных, которым вводили плацебо. Напротив, уровни синтеза этих цитокинов были выше в группах животных, получавших 250 МЕ/кг этих препаратов. У мышей, которым вводили 50 МЕ/кг XYNTHA® и ADVATE®, не выявлено какого-либо ингибирования, тогда как в группе, получавшей 250 МЕ/кг, выявлено возрастание внутренней концентрации IL-2, IL-4 и TNF- $\alpha$ . В дополнение к этому высокий процент foxp3-положительных Т-клеток отмечен у мышей, которым вводили 50 МЕ/кг rFVIII-mFc по сравнению с другими препаратами. У мышей, получавших 50 МЕ/кг rFVIII-hFc и rFVIII-mFc наблюдался большой процент дендритных клеток селезёнки, положительных по молекуле PD-L1 (CD274), несущих ингибирующий сигнал для активации и пролиферации Т-клеток. Эти группы обладали также большим процентом незрелых дендритных клеток, как показано снижением окрашивания CD80-маркеров.

Эти результаты показали, что препарат rFVIII Fc в дозе 50 МЕ/кг у мышей с hemA выявил меньшую иммуногенность, чем коммерчески доступные препараты rFVIII [полноразмерный FVIII (ADVATE®) и FVIII с удалённым В-доменом (XYNTHA®/REFACTO AF®)]. Следовательно, препарат rFVIII Fc может обеспечивать снижение синтеза антител и индуцировать иммунную толерантность.

Пример 13. Биораспределение и клиренс rFVIII Fc у мышей.

Показано, что рекомбинантный белок слияния одной молекулы FVIII с константным участком IgG1 Fc (rFVIII Fc) снижает клиренс по сравнению с препаратами rFVIII FcRn-зависимым механизмом (Powell и др., 2012 Blood), используя природный способ, который обеспечивает рециркуляцию антител в кровяном русле. Кроме того, как указано выше, клиническое испытание фаз 1/2a на пациентах с гемофилией показало, что белок rFVIII Fc обладает в 1,5-1,7 раз большим периодом полувыведения, чем полноразмерный фактор FVIII (ADVATE®). Следовательно, исследование проводилось для: (i) идентификации типов клеток и органов, которые вносят вклад в защиту белка rFVIII Fc и (ii) оценки относительного вклада FVIII- и Fc-доменов в биораспределение и клиренс rFVIII Fc у мышей.

Клиренс rFVIII Fc и rFVIII сравнивали на моделях генноинженерных мышей с дефицитом или FVIII (HemA) или фактора фон Виллебранда (VWF). Для удаления клеток Купфера и моноцитов/макрофагов у этих мышинных моделей было использовано внутривенное введение клодронат-содержащих липидных везикул. Эффективность удаления количественно учитывалась иммуногистохимическими анализами и FACS. Фармакокинетический анализ выполняли после внутривенной инъекции rFVIII Fc или rFVIII с помощью FVIII-специфического набора для анализа Coatest.

Удаление клеток Купфера у мышей с HemA приводило к возрастанию клиренса rFVIII Fc. Более того, в отсутствие VWF (мышь с двойным нокаутом HemA/VWF) удаление клеток Купфера и макрофагов привело к возрастанию клиренса rFVIII Fc до значений подобных с rFVIII, что указывает на то, что эти клетки отвечают за большинство отличий в клиренсе в этой модели между препаратами rFVIII и rFVIII Fc. Эти исследования выдвигают предположение, что клетки Купфера могут вносить свой вклад в осуществлении FcRn-опосредованного рециклинга молекул rFVIII Fc. Для проверки наличия этого механизма продолжаются исследования с использованием трансплантатов костного мозга мышам FcRn KO. Эти исследования в сочетании с экспериментами по клеточному поглощению *in vitro* будут попыткой распознавания участия клеток Купфера и нахождения отличия от других FcRn-экспрессирующих типов клеток, включая эндотелиальные клетки.

Пример 14. Клеточно-опосредованный иммунный ответ на препарат rFVIII Fc у мышей с гемофилией А.

Целью настоящего исследования была идентификация клеточно-опосредованных иммунных реакций на рекомбинантный FVIII, который является интересным для разработки лучшего терапевтического управления гемофилией А. Поэтому мы изучали ответ лимфоцитов селезёнки на рекомбинантный белок FVIII (rFVIII), связанный с участком Fc человека (rFVIII Fc; IgG1) в сравнении с коммерчески доступными препаратами: полноразмерным rFVIII (ADVATE®) и rFVIII с удалённым В-доменом (XYNTHA®/REFACTO AF®). Мышам с HemA вводили 4 раза в неделю с последующим введением 2 раза ка-

ждую неделю препараты в дозах 50, 100 или 200 МЕ/кг. По завершению 8 недель мышей из каждой группы подвергали эвтаназии и определяли профиль иммуногенности их лейкоцитов селезёнки испытаниями на содержание внутриклеточных цитокинов, маркеров регуляторных Т-клеток и дендритных клеток используя проточную цитометрию и профили РНК. У мышей, которым вводили 50 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub>, отмечено существенное ингибирование уровней синтеза IL-2, IL-4 и TNF- $\alpha$  (цитокинов, которые способствуют проявлению иммуногенности). Уровни синтеза этих цитокинов были выше у мышей, получавших 250 МЕ/кг этого препарата. У мышей, которым вводили 50 МЕ/кг XYNTHA® и ADVATE®, не выявлено какого-либо ингибирования, тогда как в группе, получавшей 250 МЕ/кг, выявлено возрастание внутриклеточной концентрации IL-2, IL-4 и TNF- $\alpha$ . В дополнение к этому высокий процент foxp3-положительных Т-клеток отмечен у мышей, которым вводили 50 и 100 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub>, по сравнению с другими препаратами. У мышей, получавших 50 и 100 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub>, наблюдался больший процент дендритных клеток селезёнки, положительных по молекуле PD-L1 (CD279), несущих ингибирующий сигнал для активации и пролиферации Т-клеток. Эти группы обладали также большим процентом незрелых дендритных клеток, как показано снижением окрашивания CD80-маркеров. Таким образом, обе дозы 50 и 100 МЕ/кг препарата rFVIII<sub>Fc</sub> показали пониженную иммуногенность и синтез антител в этой модели.

#### Введение.

Образование ингибиторов к FVIII признано серьёзным осложнением для управления проявлениями гемофилии А. Вероятность образования ингибиторов оценивается в диапазоне от 20 до 30% для всех случаев гемофилии А и 30-40% в случае тяжёлых заболеваний (Green, Haemophilia 17:831-838 (2011); Eckhardt и др. J. Thromb. Haemost. 9:1948-58 (2011)). Заболевания, обусловленные синтезом ингибиторов, в настоящее время лечатся индукцией иммунной толерантности, включающей частое введение высоких доз препаратов FVIII. Механизмы образования у пациентов ингибиторов в большинстве случаев остаются неизвестными и зависят от множества факторов риска, а также клеток и молекул иммунной системы.

Образование ингибиторов при гемофилии вовлекает комплексное взаимодействие множества типов клеток, поверхностных молекул и секретируемых белков иммунной системы, включая Т-лимфоциты, В-лимфоциты, антиген-презентирующие клетки (APC; дендритные клетки и макрофаги), цитокины и регуляторные компоненты этих типов клеток. Синтез антител В-клетками зависит от оптимальной помощи Т-клеток, которые активированы представлением антигена на APC. Толерантность к терапевтическим пептидами белкам, вводимым инъекционно, включая рекомбинантный FVIII, опосредовано классом Т-клеток, называемыми регуляторными Т-клетками (Treg) (Cao и др., J. Thromb. Haemost. 7(S1):88-91 (2009)).

Несколько ключевых молекул были идентифицированы как такие, что коррелируют с образованием ингибиторов у пациентов с гемофилией. Такие молекулы, среди прочих, включают провоспалительный цитокин TNF- $\alpha$ , противовоспалительный цитокин интерлейкин (IL)-10 и маркер Treg клеток CTLA4 (Asstermark и др., J. Thromb. Haemost. 5:263-5 (2007); Pavlova и др. J. Thromb. Haemost. 7:2006-15 (2009)).

В этом исследовании изобретателями изучен ответ лимфоцитов селезёнки на белок слияния рекомбинантного фактора VIII и Fc (rFVIII<sub>Fc</sub>) по сравнению с коммерчески доступными препаратами полноразмерного rFVIII (пр-rFVIII; ADVATE®) и rFVIII с удалённым В-доменом (УВД-rFVIII; XYNTHA®/REFACTO AF®).

#### Материалы и методы.

Материалы. Мыши с дефицитом фактора FVIII (Vi и др. Nat. Genet. 10:119-21 (1995)) были первоначально получены от д-ра Казазияна (Университет штата Пенсильвания, г. Филадельфия, штат Пенсильвания, США) и поддерживались в виде воспроизводимой колонии в лаборатории изучения гемофилии Biogen Idec или в лаборатории Charles River.

Антитела, используемые для окрашивания и анализа FACS, были получены в компании BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA) или eBioscience (San Diego, CA, USA).

Использованные антитела были направлены против поверхностных маркеров мыши, таких как CD4 (Т-хелперные клетки), CD11c и CD80 (дендритные клетки), PD-1, PD-L1, CD25 (клетки Treg), внутриклеточные цитокины (IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ ) и факторы транскрипции (Foxp3).

План исследования иммуногенности. Три группы лечения получали внутривенные инъекции в дозах 50, 100 или 250 МЕ/кг, которые вводили по определённым дням (фиг. 37). Проводили каждое лечение 10 мышам и им производили введение при каждом уровне дозы. Животных подвергали эвтаназии на 56 сутки путём ингаляции CO<sub>2</sub> и вырезанные селезёнки помещали в стерильный фосфатно-солевой буфер (PBS).

Спленоциты разделяли с использованием набора для разрушения селезёнки и устройства для мягкого разрушения биологических тканей MACS (Miltenyi Biotec, Cologne, Germany). Одноклеточные суспензии фиксировали 3% раствором формалина для окрашивания в анализе FACS или хранили в буфере для разрушения для выделения РНК (Roche).

Оценка результатов. Антитела к FVIII определяли с использованием собственного разработанного в компании метода ELISA.

Схематичное описание: белком FVIII покрывали поверхность 96-луночных планшетов, которые ис-

пользовали для захватывания антител плазмы мышей, собранной в определённые временные точки. Антитела, специфичные к FVIII, обнаруживали с использованием антител к IgG мыши. Определение профиля ответа Т-клеток проводили на выделенных спленоцитах мыши (фиг. 38). Лимфоциты и дендритные клетки селезёнки окрашивали по поверхностным и внутриклеточным мишеням.

Для поверхностного окрашивания общее количество  $1 \times 10^6$  спленоцитов инкубировали с антителами подходящих концентраций. Для внутриклеточного окрашивания клетки делали проницаемыми с помощью раствора BD Fix-Perm (BD Biosciences) с их последующей инкубацией с антителами к цитокинам в этом же буфере. Окрашивание молекул Foxp3 выполнялось с использованием антител в буферном растворе для окрашивания Foxp3 (BD Biosciences). Интенсивность флуоресценции записывали с использованием прибора BD FACS Canto II, анализ данных выполнен, используя программное обеспечение FLOWJO®.

Лимфоциты совместно окрашивали с рецепторами CD4 и внутриклеточными маркерами IL-2, TNF- $\alpha$  и IL-4. В клетках Treg окрашивали поверхностные маркеры CD4 и CD25 с последующим окрашиванием внутриклеточных маркеров Foxp3. Спленоциты окрашивали на присутствие маркеров CD11c и PD-L1 (дендритные клетки) или CD4 и PD-1 (CD4+ Т-клетки) для идентификации клеток, вовлечённых в механизм взаимодействия PD-L1-PD-1. Всё количество РНК выделяли (Roche) и на ней синтезировали кДНК с помощью обратной транскрипции (Qiagen, Hilden, Germany). Праймеры для молекул TGF- $\beta$ , IL-10, IL-12a и EBI-3 приобретали в компании IDT technologies. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени с использованием красителя SYBR green выполнялась на системе Quantitect (Qiagen) с применением оборудования для ПЦР в режиме реального времени ABI 7900 Fast Block. Данные анализировали на программном обеспечении 7500 версии 2.0.5.

#### Результаты.

Общие уровни содержания антител к FVIII на 42 сутки. Общие уровни содержания антител к FVIII на 42 сутки определяли в плазме мышей, которым инъекционно ввели 50, 100 или 250 МЕ/кг препаратов rFVIIIc, УВД-FVIII (XYNTHA®) или полноразмерного FVIII (пр-rFVIII) (ADVATE®) с использованием метода ELISA. В обеих группах, получавших 50 и 100 МЕ/кг rFVIIIc, были значительно ниже уровней антител по сравнению с УВД-rFVIII или полноразмерным пр-FVIII препаратами, что указывает на более низкую антигенность FVIII в сравнении с инъекциями rFVIIIc. В группах, получавших 250 МЕ/кг rFVIIIc, не было статистической разницы между разными препаратами, и отмечались высокие уровни содержания антител (фиг. 39).

Внутриклеточные цитокины (IL-2 и TNF- $\alpha$ ) в CD4+ клетках. Мыши, получавшие по 50 МЕ/кг препаратов в каждой группе лечения, не отвечали по этому показателю в отношении данных уровня антител к FVIII, тогда как мыши, получавшие по 250 МЕ/кг препаратов в каждой группе лечения, отвечали в виде наибольших уровней антител (данные не показаны). Дозы rFVIIIc в 50 и 100 МЕ/кг (фиг. 40A и 40B) обеспечивали пониженный процент содержания IL-2- и TNF- $\alpha$ -положительных CD4+ клеток, что указывает на пониженную иммуногенность этого препарата, тогда как препараты УВД-rFVIII или пр-FVIII показали более высокие количества цитокин-положительных клеток. Все три схемы лечения в дозах 250 МЕ/кг (фиг. 40C) обеспечили повышенный процент цитокин-положительных клеток, что иллюстрирует на более высокую иммуногенность этой дозы. Сходные результаты были получены и для IL-4.

CD4/CD25/Foxp3 трижды положительные клетки (маркеры Treg клеток). При дозе 100 МЕ/кг процент превышения Treg клеток в отношении плацебо был статистически значимо выше в группе rFVIIIc ( $P < 0,05$ ) по сравнению с группами, получавшими УВД-rFVIII или пр-FVIII (фиг. 41). Подобные результаты были получены для дозы 50 МЕ/кг rFVIIIc, что иллюстрирует на то, что обе дозы лечения 50 и 100 МЕ/кг могут способствовать доминированию Treg клеток и подавлять иммунные реакции на FVIII.

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени для цитокинов, связанных с развитием толерантности. Анализ ПЦР в режиме реального времени для цитокинов, связанных с развитием иммунной толерантности, а именно: TGF- $\beta$  (фиг. 42A), IL-10 (фиг. 42B) и IL-35 (субъединицы IL-12a и EBI-3, показаны соответственно, на фиг. 42C и 42D), выполняли с использованием РНК, изолированной у мышей, относящихся к получавшей лечение дозой 100 МЕ/кг группе. Для определяемых цитокинов в группе, получавшей rFVIIIc, уровни мРНК были повышены ( $P < 0,05$ ) по сравнению с другими типами лечения в дозе 100 МЕ/кг, что указывает на наличие спленоцитов, экспрессирующих толерогенные цитокины, таким образом усиливая иммуносупрессивное микроокружение. Во всех спленоцитах группы, получавшей дозу 100 МЕ/кг, содержание мРНК, отвечающей за экспрессию маркеров иммунотолерантности Foxp3 (фиг. 42E), CD25 (фиг. 42F), CTLA-4 (фиг. 42G) и индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO-1) (фиг. 42H) было повышенным.

Данные анализа FACS в установлении механизма PD-L1-PD-1. Молекула PD-L1 (CD274) на дендритных клетках соединяется с PD-1 (CD279) на Т-клетках для инициирования механизмов, которые подавляют активацию и пролиферацию Т-клеток, таким образом, приводя к подавлению иммунных реакций. У спленоцитов группы, принимавшей дозу 100 МЕ/кг, окрашивались поверхностные рецепторы CD11c и PD-L1 (фиг. 43A) или CD4 и PD-1 (фиг. 43B). При дозе 100 МЕ/кг процент положительных по маркеру PD-L1 дендритных клеток и процент положительных по маркеру PD-1 Т-клеток были выше у

животных, получавших препарат rFVIII<sub>IFc</sub> ( $P < 0,05$ ) по сравнению с животными, получавшими УВД-FVIII и пр-FVIII. Это указывает на положительную регуляцию иммуносупрессорных механизмов в дендритных и в Т-клетках молекулами rFVIII<sub>IFc</sub>.

Обсуждение.

Экспериментальные результаты, показанные выше, показали, что препарат rFVIII<sub>IFc</sub> в дозах 50 и 100 МЕ/кг обладает меньшей иммуногенностью и повышает толерантность к FVIII, что продемонстрировано следующими данными.

(a) Пониженный уровень содержания проиммуногенных цитокинов (IL-2 и TNF- $\alpha$ ) в CD4<sup>+</sup> Т-клетках по сравнению с другими молекулами FVIII.

(b) Стимуляция регуляторных Т-клеток и синтеза маркеров (Foxp3, CD25, PD-1, CTLA4), которые отвечают за иммунную толерантность в мышей, которым вводили rFVIII<sub>IFc</sub>. Значение Foxp3<sup>+</sup> Treg клеток и роль молекул CTLA4 в повышении толерантности к FVIII при гемофилии было описано ранее (Cao и др., *J. Thromb. Haemost.* 7(S1):88-91 (2009); Astermark и др. *J. Thromb. Haemost.* 5:263-5 (2007)).

(c) Более высокий уровень содержания толерогенных цитокинов (IL-10, TGF- $\beta$ , IL-35) в спленocyтaх мышей, которым вводили rFVIII. Эти маркеры были обнаружены в нескольких исследованиях как ключевые иммунорегуляторные цитокины и главные детерминанты иммунотолeрантности (Bi и др., *Nat. Genet.* 10:119-21 (1995)).

(d) Возрастание популяции толерогенных дендритных клеток (PD-L1, IDO-1 и снижение CD80) у мышей, проходящих лечение введением препарата rFVIII<sub>IFc</sub>.

Одновременно с этим, у мышей, лечившихся препаратом rFVIII<sub>IFc</sub>, выявили понижение или отсутствие антител к FVIII в дозах 50 и 100 МЕ/кг (Liu и др., *WFH Abstract #FB-WE-04.2-5* (2012)) и устойчивость при стимулировании дозой 250 МЕ/кг после развития толерантности от доз 50 МЕ/кг rFVIII<sub>IFc</sub>.

Выводы. У мышей, лечившихся препаратом rFVIII<sub>IFc</sub>, выявили понижение или отсутствие антител к FVIII в дозах 50 и 100 МЕ/кг по сравнению с обычными видами лечений с помощью FVIII. На основании изучения Т-клеток и дендритных клеток мышей препарат rFVIII<sub>IFc</sub> определён как менее иммуногенный, чем традиционные лекарственные средства FVIII, и обеспечивает развитие толерогенных механизмов. Препарат rFVIII<sub>IFc</sub> вызывает повышение уровней ключевых иммунорегуляторных цитокинов у спленocyтoв мышей с гемофилией А, что является индикатором развития иммунотолeрантности. Собранные вместе эти результаты указывают на существование толерогенного микроокружения в селезёнке мышей, которым в малых дозах инъекционно вводили rFVIII<sub>IFc</sub> (50 и 100 МЕ/кг).

Эти исследования впервые продемонстрировали, что rFVIII<sub>IFc</sub> активирует передачу сигналов дендритными клетками, которая является ключевым фактором иммунотолeрантности. Эти данные указывают, что существующая функциональная иммунная толерантность к FVIII у мышей с гемофилией А обеспечивается препаратом rFVIII<sub>IFc</sub>.

Пример 15. Оценка синтеза антител к препарату rFVIII<sub>IFc</sub> по сравнению с XYNTHA® и ADVATE® у мышей с гемофилией А.

Развитие ингибирующих антител к заместительным белкам FVIII случается у 20-30% ранее нелечившихся пациентов, что является наиболее серьёзным осложнением при лечении гемофилии. Индукция иммунной толерантности (ИИТ), которая сопровождает частое введение препаратов, в настоящее время используется для лечения пациентов, у которых появились ингибиторы. Однако субпопуляция таких пациентов не отвечает на ИИТ. См., например, публикации Green, *Haemophilia* 17:831-838 (2011); Eckhardt и др. *J. Thromb. Haemost.* 9:1948-58 (2011); Cao и др., *J. Thromb. Haemost.* 7(S1):88-91 (2009). Рекомбинантный белок FVIII<sub>IFc</sub> обладает периодом полувыведения приблизительно в 1,6 раз большим, чем период полувыведения rFVIII, и этот препарат в данный момент находится на клиническом изучении фаз 2/3. Эксперименты, представленные в этой заявке, определяют иммуногенные и иммунотолeрантные свойства rFVIII<sub>IFc</sub> по сравнению с другими rFVIII заместительными rFVIII белками при лечении гемофилии А (HemA) у мышей.

(a) Сравнение иммуногенности препаратов rFVIII<sub>IFc</sub>, XYNTHA® и ADVATE® у мышей с HemA. Образование антител. Четыре группы мышей с HemA, с 9-12 мышами с HemA в группе получали дозы по 50, 100 и 250 МЕ/кг препаратов rFVIII<sub>IFc</sub>, XYNTHA®, ADVATE® и контроль плацебо. Дозы вводили мышам на 0, 7, 14, 21 и 35-й день. Кровь отбирали на 0, 14, 21, 28 и 42-й день (фиг. 44).

Препарат rFVIII<sub>IFc</sub> индуцировал значительно более низкий уровень образования антител в дозе 50 МЕ/кг (фиг. 45) и 100 МЕ/кг (фиг. 46) по сравнению с препаратами XYNTHA® и ADVATE®. Однако все белки FVIII показали схожее образование антител в дозе 250 МЕ/кг (фиг. 47). Титры нейтрализующих антител коррелировали с общим уровнем содержания связывающих антител (фиг. 48).

(b) Сравнение иммуногенности препаратов rFVIII<sub>IFc</sub>, XYNTHA® и ADVATE® у мышей с HemA. Профили ответа Т-клеток. Для определения профилей Т-клеток спленocyтoв на 53 день вводили дополнительные дозы препаратов rFVIII<sub>IFc</sub>, XYNTHA®, ADVATE® и контроль плацебо. Селезёнку мышей извлекали на 56-й день (фиг. 49). Полученные результаты показывают, что препарат rFVIII<sub>IFc</sub> способствует доминированию CD4/CD25/Foxp3-положительных Treg клеток (фиг. 50, правая сторона).

Резюме. Введение препарата rFVIII<sub>IFc</sub> привело к значительному снижению образования антител по

сравнению с препаратами XYNTHA® и ADVATE® в дозах 50 и 100 МЕ/кг. Профиль толерогенности после получения доз 50 и 100 МЕ/кг rFVIII-Fc показал, что rFVIII-Fc может способствовать доминированию Treg клеток и подавлять иммунные реакции на FVIII.

(с) Исследование приобретения иммунной толерантности. Для проверки того, могут ли повторные введения rFVIII-Fc индуцировать функциональную толерантность в условиях *in vivo*, были приняты следующие режимы дозирования. Мышам с HemA (возрастом 8-10 недель) вводили 50 МЕ/кг rFVIII-Fc или плацебо еженедельно в течение 4 недель (на 0, 7, 14, 21-й день) с последующей одной инъекцией на 35-й день. На 49-й день от начала исследования этим мышам ввели недельную дозу rFVIII-Fc 250 МЕ/кг для определения того, что эти животные могут переносить высокие дозы rFVIII-Fc. Эти разрешающие дозы вводили на 0, 7, 14 и 21-й дни с 49 дня от начала исследования (см. фиг. 51). Образцы крови отбирали в определённые временные точки для проверки на наличие антител к FVIII методом ELISA. Как показано на фиг. 52, повторные дозы привели к статистически значимому снижению содержания антител к rFVIII-Fc при его введении в высоких дозах 250 МЕ/кг, тогда как у животных, получавших плацебо, были высокие уровни антител после введения. Эти данные ясно показывают, что повторное введение rFVIII-Fc в дозе 50 МЕ/кг на основе этой использованной схемы дозирования способно индуцировать толерантность к высоким дозам препарата rFVIII-Fc (250 МЕ/кг).

Выводы: было найдено, что в терапевтических дозах rFVIII-Fc был: (1) менее иммуногенным в сравнении с XYNTHA® и ADVATE®, и (2) способен к индуцированию иммунной толерантности к FVIII у мышей с HemA.

В настоящее время устанавливается, могут ли даже низкие дозы rFVIII-Fc привести к приобретению иммунной толерантности к высоким дозам rFVIII-Fc. В таком исследовании низкие дозы rFVIII-Fc, а именно 25 и 10 МЕ/кг, будут использованы во время фазы индукции толерантности. После чего будут введены дозы 250 МЕ/кг rFVIII-Fc и измерены уровни содержания антител к FVIII, как было проведено в предыдущем исследовании.

Пример 16. Метаболические пути клиренса препарата rFVIII-Fc у мышей с гемофилией А.

Длительно действующий рекомбинантный белок слияния фактора коагуляции FVIII и Fc (rFVIII-Fc) в настоящее время находится в фазе 3 клинического исследования эпизодического и профилактического лечения пациентов с гемофилией А. По сравнению с рекомбинантным препаратом полноразмерного белка FVIII (ADVATE®, Baxter Healthcare Corporation), rFVIII-Fc обладает в 1,7 раз более продолжительным периодом выведения и значительно большим клиренсом у пациентов с гемофилией А. См. статью Powell и др., *Blood* 119:3031-7(2012). Этот улучшенный фармакокинетический (PK) профиль опосредован взаимодействием Fc с неонатальным Fc-рецептором (FcRn). См. Dumont и др., *Blood* 119:3024-30 (2012). rFVIII-Fc состоит из одной молекулы фактора коагуляции человека FVIII с удалённым В-доменом непосредственно соединённым с Fc-доменом иммуноглобулина человека G1, который посредством взаимодействия с рецепторами FcRn рециркулирует природным путём после поглощения клетками (эндоцитоз или пиноцитоз) (фиг. 53). Моноцитные клетки (макрофаги и дендритные клетки), включая находящиеся в печени макрофаги (клетки Купфера) принимают участие в обеспечении клиренса фактора фон Виллебранда (VWF) и FVIII (фиг. 54). См. статью Schooten и др., *Blood* 112(5): 1704-12 (2008).

Для того чтобы выяснить, какие типы клеток вовлечены в поглощение молекул rFVIII-Fc, их выведение и FcRn-опосредованный рециклинг, изобретателями изучено влияние удаления макрофагов и клеток Купфера на клиренс rFVIII-Fc на моделях генноинженерных мышей.

Материалы и методы.

Клиренс препаратов rFVIII-Fc и rFVIII (УВД - с удалённым В-доменом) сравнивали в 3 моделях мышей с нокаутом (KO) генов: (1) с гемофилией А (FVIII KO), дефицитных по FVIII; (2) с двойным нокаутом (DKO) по FVIII и VWF, с недостатком экспрессии FVIII и VWF; и (3) FcRn-KO, с недостатком экспрессии FcRn. Во всех трёх моделях макрофаги и клетки Купфера удаляли препаратом CLODROSOME® (Encapsula NanoSciences, Inc.), который является токсичным аналогом АТФ (клодронат) инкапсулированный в липосомах, который специфически захватывается макрофагами путём фагоцитоза и запускает их апоптоз. См. статью van Rooijen & Hendriks, *Methods Mol. Biol.* 605:189-203 (2010).

Контрольные мыши в каждой группе получали нетоксичные липосомы ENCAPOSOME® (фиг. 55). Единственную дозу FVIII или rFVIII-Fc (125 или 250 МЕ/кг) вводили за 24 ч до получения липосом. Образцы крови отбирали ретроорбитальным способом или из полой вены, кровь отбиралась в определённые промежутки времени (4 образца в одну временную точку).

Потом измерялась активность FVIII человека в образцах плазмы хромогенным анализом FVIII, а PK параметры оценивались с помощью программного обеспечения WINNONLIN® (Pharsight Corp.), включая анализ некомпартментальной модели. Удаление клеток Купфера и макрофагов определяли иммунохимическим окрашиванием и количественно измеряли программным обеспечением Visiopharm (Hoersholm, Denmark) или с помощью полимеразной цепной реакции обратной транскрипции (ПЦР-ОР).

Результаты.

(а) Удаление макрофагов и клеток Купфера. Фиг. 56 иллюстрирует репрезентативное окрашивание срезов печени антителами к Iba-1, специфичного маркера макрофагов, через 24 ч после контрольной об-

работки мышей с гемофилией А препаратом ENCAPSOME® (А, А') или получения препарата CLODRSOME® (В, В'). Снимки А и А' показывают шаблоны количественного учёта, отмечающие окрашенные клетки Купфера (голубой цвет), общую область ткани (тёмно-синий цвет) и пустые области (серый цвет). Подобные профили удаления были получены и для других линий мышей. Количественный анализ положительно окрашенных областей показал, что >90% клеток Купфера печени были удалены и остались на низком уровне в течение 3 дней после обработки препаратом CLODRSOME® (n=4) по сравнению с животными, обработанными контрольным препаратом ENCAPSOME® (фиг. 57). Циркуляция моноцитных клеток также была снижена на >50% в течение 24 ч после обработки препаратом CLODRSOME®, как определено цитометрическим анализом клеток крови, окрашенных мечеными антителами к маркерам F4/80+ (n=4). В течение 48 ч количество удалённых клеток восстанавливалось (фиг. 57). В соответствии с наблюдаемым удалением макрофагов в печени анализ ПЦР в режиме реального времени (RT-PCR) экспрессии маркера макрофагов - фрагмента эпидермального ростового фактора, содержащего муцин-подобный рецептор 1 (Emr1) (F4/80), показал, что обработка препаратом CLODRSOME® снижала экспрессию Emr1 мРНК на >95% в печени и лёгких мышей с гемофилией А (фиг. 58). Emr1 - это обозначение, используемое для белка человека. Гомологичный белок мыши известен как F4/80. Emr1 является трансмембранным белком, представленным на клеточной поверхности зрелых макрофагов.

(b) Клиренс препаратов FVIII на моделях мышей. В противоположность ранее представленным результатам, которые полагали, что клетки Купфера играют роль в выведении белков FVIII и VWF (van Schooten C.J., и др. *Blood*. 112(5): 1704-12 (2008)), удаление клеток Купфера не привело к ожидаемому снижению клиренса FVIII у мышей с гемофилией А (фиг. 59). Наоборот, удаление клеток Купфера у мышей с гемофилией А значительно увеличили клиренс rFVIIIc (фиг. 59). Аналогичным образом, у мышей DKO удаление клеток Купфера не снизило клиренс FVIII, а значительно повысило клиренс rFVIIc (фиг. 60). У мышей FcRn-KO удаление клеток Купфера не повлияло на клиренс FVIII или rFVIIIc (фиг. 61).

Выводы. Удаление макрофагов и клеток Купфера у мышей с гемофилией А и мышей DKO (дефицитных по FVIII и VWF) повысило клиренс rFVIIIc, но не снизило клиренс FVIII, что указывает на то, что макрофаги и клетки Купфера могут отвечать за основное отличие клиренсов препаратов FVIII и rFVIIIc в этих мышах. В отсутствие VWF и FVIII (мышь DKO) удаление макрофагов и клеток Купфера повысило клиренс rFVIIIc до уровней, достигнутых для FVIII.

Недостаточное влияние удаления клеток Купфера на клиренс FVIII у мышей с гемофилией А и мышей DKO отличалось от данных ранее опубликованных исследований. См. статью van Rooijen & Hendrikx, *Methods Mol. Biol.* 605:189-203 (2010). Удаление макрофагов и клеток Купфера у мышей FcRn-KO не привело к значительным отличиям клиренса между FVIII и rFVIIIc, указывающим на потенциальную роль FcRn в макрофаг-опосредованном рециклинге молекул rFVIIIc.

Вместе эти исследования показывают, что rFVIIIc защищал организм независимым от макрофагов и/или клеток Купфера путём и что естественный механизм регуляции этих клеток может влиять на опосредованный рециклинг препарата rFVIIIc.

Пример 17. Приобретение иммунной толерантности к уже существующим антителам к фактору VIII.

Очень вероятно, что пациенты, которые получают препарат rFVIIIc, предварительно лечились разными методами терапии препаратами rFVIII. У около 30% пациентов с гемофилией А образовывались антитела к FVIII, что является главной проблемой в действующей заместительной терапии с помощью FVIII. В настоящее время единственным утверждённым подходом достижения толерантности у пациентов, имеющих ингибиторы к FVIII, является введение им высоких доз FVIII в течение неопределённого периода времени, т.е. пока пациент не выработает устойчивость. Поэтому существует интерес определения того, могут ли низкие дозы rFVIIIc направить в обратную сторону развитие иммуногенности FVIII путём ингибирования сигнальных механизмов Т- и В-клеток и сместить его в сторону развития толерантности. В этом исследовании мышам с hemA (возрастом 8-10 недель) будут инъекционно вводиться еженедельно в течение 5 недель препараты УВД-FVIII (XYNTHA®) или пр-FVIII (ADVATE®) в дозе 50 МЕ/кг. В образцах крови, отобранных у этих животных в определённые дни, как указано на схеме, будут определяться уровни содержания антител к FVIII. После индукции ингибирующих антител животные будут иницироваться введениями 50 МЕ/кг препарата rFVIIIc еженедельно в течение 5 недель. Это будет фазой развития толерантности. Снова будут определяться уровни содержания антител к FVIII в образцах крови, отобранных, как указано. После прохождения фазы развития толерантности животным снова введут препараты XYNTHA® или ADVATE® в дозе 50 МЕ/кг, ещё четыре инъекции, и отобранные образцы крови будут проанализированы на наличие антител к FVIII. В случае успешного приобретения толерантности второе применение препаратов XYNTHA® или ADVATE® не приведёт к синтезу каких-либо антител к FVIII, что может указать на способность rFVIIIc индуцировать иммунотолерантность к FVIII.

Пример 18. Адаптивная иммунотерапия Т-клеток и перенос иммунной толерантности.

Регуляторные Т-клетки (Treg) являются главными игроками в индукции и поддержании периферийной толерантности к FVIII и другим пептидным лекарственным средствам. Одним из ключевых ис-

следований, использованных для определения наличия функциональной иммунной толерантности, является перенос Treg клеток, изолированных у животных с приобретённой толерантностью реципиентам, которым потом вводят высокие дозы препаратов FVIII. Наличием функционального переноса толерантности является свидетельство недостаточности или меньшей продукции антител у мышей, получивших дозу препарата.

В этом исследовании мышам с HemA (возрастом 8-10 недель) будут индуцировать толерантность введением 50 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub> или плацебо еженедельно в течение 4 недель (на 0, 7, 14, 21-й день) с последующими двумя инъекциями препарата на 35 и 53-й день. Образцы плазмы будут отбираться для определения уровней антител к FVIII с использованием метода ELISA. На 56-й день мыши без антител пройдут эвтаназию и их селезёнки будут изолированы. Спленциты этих мышей будут собираться и переводиться в одноклеточные суспензии с использованием набора для изоляции спленцитов (Miltenyi Biotec). Treg клетки из общей массы спленцитов будут отделяться с использованием набора для изоляции на основе магнитных гранул, меченных маркерами CD4 и CD25 мыши (Miltenyi Biotec). Изолированные Treg клетки будут подсчитаны с применением счётчика клеток. Аликвота клеточной суспензии будет фиксироваться с помощью 3% раствора формалина для фенотипического анализа методом FACS при определении чистоты изолята. Treg клетки потом будут в/в вводиться в мышам-реципиентам на 0-й день в количестве  $1 \times 10^6$  клеток/мышь в 200 мкл раствора. В 1-й день начала исследования животным будут вводиться дозы по 250 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub> с последующими повторными инъекциями еженедельно на 8, 15, 22 и 29-й день. Образцы крови будут отбираться на 15, 22, 29 и 36-й день для анализа плазмы на содержание антител к FVIII с использованием метода ELISA. В случае успешного переноса толерантности у мышей, получивших Treg клетки от животных с приобретённой толерантностью, не будут образовываться антитела FVIII, тогда как у мышей, которым введут Tregs клетки от доноров, получивших плацебо, обнаружатся антитела к FVIII.

Пример 19. Идентификация механизмов в индукции иммунной толерантности к rFVIII<sub>Fc</sub>. Исследования с дендритными клетками и макрофагами.

Одной из ключевых особенностей, отличающих rFVIII<sub>Fc</sub> от других лекарственных препаратов FVIII, является присутствие активной последовательности Fc, которая представляет собой естественно встречающийся компонент. Он может быть тем обуславливающим фактором, который подавляет иммунный ответ и вызывает реакцию развития иммунной толерантности. Молекулы Fc, присутствующие в IgG и белке rFVIII<sub>Fc</sub>, способствуют взаимодействию с классическими рецепторами Fc IgG и FcRn. Среди Fc-рецепторов подтип FcγRIIb (FcγR2b) представляет собой ингибирующий рецептор и передачей супрессирующих сигналов, которые сдерживают активацию типов клеток, несущих этот рецептор. Fc-рецепторы, включая FcRn, главным образом локализованы в антиген-репрезентирующих клетках (APC - дендритные клетки, макрофаги и В-клетки), но не Т-клетках. Поэтому вероятно, что молекулы rFVIII<sub>Fc</sub> могут задействовать рецепторы FcR2b и/или FcRn в этих клетках для активации развития у них толерогенного фенотипа.

Для установления того, вовлекаются ли рецепторы FcR2b и/или FcRn в дендритных клетках и макрофагах в развитие толерогенного фенотипа, будут проводиться следующие эксперименты.

1) Идентификация маркеров по мРНК и уровню содержания клеточных поверхностных (белков) в клеточных линиях макрофагов мышей, макрофагов и дендритных клеток селезёнки, которые регулируются rFVIII<sub>Fc</sub>, в сравнении с только одним FVIII или мутантной формой rFVIII<sub>Fc</sub>, которые не взаимодействуют с Fc-рецепторами.

2) Сверхэкспрессия и нокдаун белков FcγR2b или FcRn в клеточной линии макрофагов мышей RAW 264.7 и изучение влияния rFVIII<sub>Fc</sub> на эти рецепторы исследованием последующих мишеней каскада.

3) Идентификация возможного вовлечения других важных механизмов, таких как опосредованная рецепторами TLR передача сигналов в клетках APC в ответ на молекулы rFVIII<sub>Fc</sub>.

Пример 20. Альтернативные пути для индукции толерантности.

Иммунная толерантность к rFVIII<sub>Fc</sub> может также быть достигаться через мукозальный путь введения препаратов (через слизистые оболочки). Двумя возможными местами индуцирования толерантности является гастроэнтеральная и респираторная слизистые оболочки. Можно индуцировать оральную толерантность к rFVIII<sub>Fc</sub> или путём скармливания животным кормов или использованием искусственного вскармливания через зонд, для доставки молекул к желудочно-кишечной слизистой оболочке. Слизистая кишечника обладает специализированными вторичными лимфоидными органами, называемыми Пейеровыми бляшками, которые содержат антиген-репрезентирующие клетки (APC), что представляет возможность для участия в регуляторных иммунных реакциях. Эти APC могут синтезировать антигены и активировать специфические субпопуляции дендритных клеток и Tregs клеток, которые могут перемещаться в другие области организма и программировать другие клетки иммунной системы для подавления иммунного ответа на присутствии антигена, в нашем случае экзогенно вводимого FVIII. Этот феномен может быть опосредован взаимодействиями Fc с рецепторами FcRn и/или FcγR2b, представленными на клетках APC иммунной системы слизистой кишечника. Для слизистой оболочки дыхательных путей может быть сообщена толерантность путём ингаляции аэрозолей rFVIII<sub>Fc</sub>, которая может обеспечиваться

теми же механизмами, что и в кишечнике.

Определение того, может ли иммунная толерантность быть достигнута через мукозальный путь, препараты XYNTHA® или ADVATE® будут вводиться пероральным путём или через аэрозоль мышам с hemA. После индукции ингибирующих антител животные будут инициироваться введениями препарата rFVIII<sub>Fc</sub>. Это будет фазой развития толерантности. Уровни содержания антител к FVIII будут определяться в образцах крови, отобранных согласно указаниям. После прохождения фазы развития толерантности животным снова введут препараты XYNTHA® или ADVATE® и отобранные образцы крови будут проанализированы на наличие антител к FVIII. В случае успешного приобретения толерантности второе применение препаратов XYNTHA® или ADVATE® не приведёт к синтезу каких-либо антител к FVIII, что может указать на способность rFVIII<sub>Fc</sub> индуцировать иммунотолерантность к FVIII после мукозального введения препаратов.

Пример 21. Иммунотолерантность к другим факторам свёртывания.

Для установления того, может ли иммунотолерантность обеспечиваться добавлением Fc-части к активным фрагментам факторов свёртывания отличным от FVIII, созданы химерные полипептиды, содержащие фактор свёртывания FVIIa, связанный с Fc (rFVIIaFc), или фактор свёртывания FIX, связанный с Fc (rFIXFc). Выполнены клонирование, экспрессия и очистка белков rFVIIaFc и rFIXFc согласно способам, известным в этой сфере знаний. Определены биохимические, биофизические и фармакокинетические свойства белков rFVIIaFc и rFIXFc, как описано в примерах выше и/или с использованием способов, известных в этой сфере знаний. Проведены исследования по иммунотолерантности и оцениванию образования антител к белкам rFVIIaFc и rFIXFc по сравнению с коммерческими препаратами факторов свёртывания, как представлено в вышеприведённых примерах. Химерные полипептиды, содержащие активные фрагменты факторов свёртывания и действующую Fc-часть, такие как rFVIIaFc и rFIXFc, способны эффективно индуцировать иммунотолерантность к немодифицированным факторам свёртывания (т.е. FIX или FVII без Fc-части).

Пример 22. Трансплацентарный перенос иммунной толерантности к FVIII с использованием rFVIIIFc.

Целью этого изучения было определение того, может ли введение rFVIIIFc беременным мышам обеспечить перенос этих молекул через плаценту плоду (благодаря взаимодействию Fc-части с FcRn рецептором на плацентарных клетках), и может ли воздействие rFVIIIFc на иммунную систему плода на ранней стадии развития привести к получению толерантности программированием тимуса на распознавание FVIII, как собственного антигена, и не приводить к развитию на него иммунной реакции. Беременным мышам внутривенно инфузионно вводили с помощью ретроорбитальной инъекции на 16-й день вынашивания одну дозу (6 Ед) препарата rFVIIIFc или XYNTHA® или две дозы (по 6 Ед каждая) инъекцией в хвостовую вену на 15- и 17-й дни вынашивания. Иммуногенность препарата XYNTHA® оценивалась на новорожденных мышатах, родившихся у иммунизированных мышей, до достижения ими зрелости (в возрасте 6-9 недель). 16-й день беременности был выбран потому, что он совпал с временем развития аутоиммунной регуляторной молекулы, AIRE, которая играет ключевую роль в удалении аутореактивных Т-клеток из тимуса. Результаты показали, что первый эксперимент, в котором тестировалось дозирование беременным мышам однократной инфузией препаратов rFVIIIFc или XYNTHA® на 16-й день вынашивания, родившиеся у беременной мышей, получавших препарат rFVIIIFc, мышата статистически значимо имели более низкие титры Бетесда к препарату XYNTHA® по сравнению с мышатами, родившимися у беременной мышей, получавших XYNTHA® (фиг. 62). Во втором эксперименте, в котором тестировалось дозирование беременным мышам препаратов на 15- и на 17-й день вынашивания, родившиеся у беременной мышей, получавших препарат rFVIIIFc, мышата статистически значимо имели более низкие титры Бетесда к препарату XYNTHA® по сравнению с мышатами, родившимися у контрольных самок, и отмечена тенденция к меньшим титрам антител по сравнению с мышатами, родившимися у самок, получавших XYNTHA® (фиг. 63).

Путём обнаружения активности FVIII у мышат, рождённых у иммунизированных самок, будет определён трансплацентарный перенос белка (rFVIIIFc) от материнского контура кровообращения к контуру плода. Функционирование на уровне Т-клеток будет оцениваться определением профилей Т-клеток и исследованиями переноса от мышат с приобретённой толерантностью к rFVIIIFc.

Пример 23. Препарат rFVIIIFc регулирует появление толерогенных маркеров к антигенрепрезентирующим клеткам.

Материалы и методы.

Мыши. Мыши (C57BL/6) с гемофилией А (HemA), несущие нокаут экзона 16 гена FVIII на фоне 129 × B6 (Bi L., Lawler A.M., Antonarakis S.E., High K.A., Gearhart J.D. и Kazazian H.H., Jr. 1995. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. Nat. Genet. 10:119-121) были получены у д-ра Х. Казазияна (Университет штата Пенсильвания, г. Филадельфия, штат Пенсильвания, США) и поддерживались в виде воспроизводимой колонии в лаборатории изучения гемофилии Biogen Ides или в лаборатории Charles River. Все процедуры, связанные с животными, одобрены требованиям Институциональным Комитетом по уходу за животными и их использованию (IACUC) и выполнялись на

основании "Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных".

Антитела и реактивы. Антитела, используемые для окрашивания и проточной цитометрии, были получены в компании BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA) или eBioscience (San Diego, CA, USA). Используемые антитела были направлены против поверхностных маркеров мыши, таких как CD4 и PD-1 (Т-хелперные клетки), CD11c, CD80 и PD-L1 (дендритные клетки) и CD25 (клетки Treg), внутриклеточных цитокинов (IL-2, IL-4, TNF- $\alpha$ ) и факторов транскрипции (Foxp3). Реактивы для внутриклеточного окрашивания цитокинов и факторов транскрипции были приобретены в компании BD Biosciences. Рекомбинантный белок FVIII<sub>Fc</sub> с удалённым В-доменом (rFVIII<sub>Fc</sub>) и рекомбинантный белок FVIII с удалённым В-доменом (rFVIII) были синтезированы как описано авторами Peters и др. (Peters R.T., Toby G., Lu Q., Liu T., Kulman J.D., Low S.C., Bitonti A.J. and Pierce G.F. 2012. Biochemical and functional characterization of a recombinant monomeric Factor VIII-Fc fusion protein. *J. Thromb Haemost.* DOI: 10.1111/jth.12076).

Другие лекарственные субстанции фактора VIII, а именно rVBD FVIII XYNTHA® (Wyeth Pharmaceuticals, Philadelphia, PA, USA), и полноразмерный FVIII ADVATE® (Baxter Healthcare Corporation, Westlake Village, CA, USA) приобрели и приготовили согласно руководств производителей.

Индукция иммунизации/толерантности у мышей. Три группы лечения, состоящие из самцов мышей возрастом 8-10 дней с Nema, получали внутривенные инъекции в дозах 50, 100 или 250 МЕ/кг, которые вводили на 0, 7, 14, 21, 35 и 53-й дни. Проводили каждое лечение 10 мышам и им производили введение при каждом уровне дозы. Образцы крови собирали методом ретроорбитального кровотоотбора на 0 (предварительный кровотоотбор), 14, 21, 28 и 42-й дни и использовали для отделения плазмы и определения уровней содержания антител к FVIII методом ELISA. Животным ещё раз вводили препараты на 53-й день, животных подвергали эвтаназии на 56-день путём ингаляции CO<sub>2</sub> и вырезанные селезёнки помещали в стерильный фосфатно-солевой буфер (PBS). Спленоциты разделяли с использованием набора для разрушения селезёнки и устройства для мягкого разрушения биологических тканей MACS (Miltenyi Biotec, Cologne, Germany). Одноклеточные суспензии фиксировали 3% раствором формалина (Boston Bio-Products) для окрашивания при анализе FACS или хранили в буфере для разрушения для выделения РНК (Roche Applied Science, Indianapolis, IN). Для определения иммунной толерантности мышам первоначально вводили по 50 МЕ/кг препарата на 0, 7, 14, 21 и 35-й день. После подтверждения отсутствия антител к FVIII на 42-й день этим мышам вводили 250 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub> раз в неделю, т.е. на 49, 56, 63 и 70-й день (0, 7, 14 и 21-й день после повторного введения). Животных, подвергшихся разовому введению, исследовали на уровне содержания антител к FVIII в пробах крови на 14, 21 и 28-й день.

Антитела к FVIII, определяемые методом ELISA. Следующий протокол исследования был разработан в лаборатории Biogen Idec по изучению гемофилии. Перед анализом все образцы плазмы прогревали на водяной бане до 56°C для инактивации остаточных факторов коагуляции, введённых при лечении, и антикоагуляционных ферментов, способных разрушить нанесённые на планшеты стандарты. На 1-й день 96-луночный планшет для микротитрования с высокой способностью связывания (Thermo Immunol. 2HB) покрывался 1 мкг/мл (100 мкл/лунка) FVIII с удалённым В-доменом в 0,05М растворе карбоната натрия, pH 9,6 и инкубировался в течение ночи (12-18 ч) при температуре 4°C. На следующий день супернатант удаляли и планшет промывали 4 раза с помощью PBST (забуференного фосфатно-солевого раствора, содержащего 0,05% Твин 20). Поверхность планшета потом блокировали с помощью 200 мкл PBST, содержащего инактивированный нагреванием 10% раствор сыворотки лошади, pH 7,4, в течение 60 мин при комнатной температуре. Стандартным образцом, использованным для определения IgG мыши, был поликлональный пул моноклональных антител к FVIII, приготовленный смешиванием равного количества антител GMA8002 (A1), GMA8008 (C2), GMA8011(C1), GMA8015(A2), GMA8016 (A2), GMA8005 (A1/A3). Все моноклональные антитела были получены в компании Green Mountain Antibodies, Inc, Burlington, VT с эпитопами FVIII-доменов, показанных в скобках. Испытуемые образцы плазмы мышей разбавляли блокирующим буфером и содержали такие же концентрации прогретой плазмы, как и стандартные образцы. Блокирующий буфер потом удаляли и разбавленные стандарты добавляли по 100 мкл/лунка в двух повторениях. Планшет инкубировали в течение 2 ч при 37°C встряхиванием на орбитальной мешалке. После промывания 4 раза PBST по 100 мкл/лунка добавляли конъюгат IgG козла-HRP против IgG мышей, разбавленный блокирующим буфером 1:20000, и инкубировали планшет в течение 60 мин при 37°C, встряхивая на орбитальной мешалке. Планшет снова промывали 4 раза PBST и потом добавляли по 100 мкл/лунка ТМВ и инкубировали при комнатной температуре 5-10 мин. Результаты определения считывали на ОП при длине волны 650 нм с помощью устройства считывания планшетов.

Анализ активности Бетесда для определения титров нейтрализующих антител. Этим анализом определяли титр антител нейтрализующих FVIII в полученных образцах плазмы. Схематично анализ выполнялся смешиванием образцов плазмы с известными концентрациями рекомбинантного препарата FVIII и инкубированием в течение 2 ч при 37°C. Остаточная активность этой смеси определялась с использованием набора Coatest FVIII SP в присутствии фактора IXa, фактора X, фосфолипидов и CaCl<sub>2</sub>. Активность FVIII рассчитывали с применением стандартной кривой для активности FVIII, построенной с использованием rFVIII в отсутствии каких-либо ингибиторов.

Окрашивание для анализа FACS. Определение профиля ответа Т-клеток и дендритных клеток про-

водили на выделенных спленocyтaх мыши. Лимфоциты и дендритные клетки селезёнки окрашивали по поверхностным и внутриклеточным мишеням. Для поверхностного окрашивания общее количество  $1 \times 10^6$  спленocyтoв инкубировали с антителами подходящих концентраций. Для внутриклеточного окрашивания клетки делали проницаемыми с помощью раствора BD Fix-Perm (BD Biosciences) с их последующей инкубацией с антителами к цитокинам в этом же буфере. Окрашивание молекул Foxp3 выполнялось с использованием антител в буферном растворе для окрашивания Foxp3 (BD Biosciences). Интенсивность флуоресценции записывали с использованием прибора BD FACS Canto II, анализ данных выполнялся, используя программное обеспечение FLOWJO. Лимфоциты совместно окрашивали с CD4-рецепторами и внутриклеточными маркерами IL-2, TNF- $\alpha$  и IL-4. У регуляторных Т-клеток (Treg) окрашивали поверхностные маркеры CD4 и CD25 с последующим окрашиванием внутриклеточных маркеров Foxp3. Спленocyтoв окрашивали на присутствие маркеров CD11c и PD-L1 (дендритные клетки) или CD4 и PD-1 (CD4+ Т-клетки) для идентификации клеток, вовлечённых в механизм взаимодействия PD-L1-PD-1.

Анализ ПЦР в режиме реального времени и ПЦР в режиме реального времени на основе микрочипов. Всё количество РНК выделяли с использованием набора для выделения РНК (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) и на ней синтезировали кДНК с помощью обратной транскрипции (Qiagen, Hilden, Germany). Праймеры изучаемых генов для ПЦР в режиме реального времени были разработаны с использованием доступных онлайн алгоритмов на веб-сайте компании IDT technologies ([www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)) и были приобретены в компании IDT technologies (Coralville, IA). ПЦР в режиме реального времени с использованием красителя SYBR green выполнялась на системе Quantitect (Qiagen, Hilden, Germany) с применением оборудования для ПЦР в режиме реального времени ABI 7900 Fast Block (Applied Biosystems, Foster City, CA). Для ПЦР в режиме реального времени на основе микрочипов 500 нг кДНК смешивали с мастер-микс-раствором для количественной ПЦР на основе красителя SYBR green и аликвоты распределяли в 96-луночную планшете с набором микрочипов (PAMM047Z, T-cell Anergy and Immune Tolerance PCR Array; SA Biosciences, Frederick, MD, USA). Реакции выполнялись с применением оборудования для ПЦР в режиме реального времени ABI 7900 Fast Block (Applied Biosystems, Foster City, CA). Результаты анализировали с использованием программного обеспечения 7500 версии 2.0.5 и соответствующие уровни генных транскриптов были измерены эндогенными конститутивными генами в качестве контроля, используя относительный метод количественного определения 2- $\Delta$ Ct (Livak K.J. and Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25:402-408.). Конститутивные гены, которые использовались для нормализации, были такие: GAPDH, HPRT, Hsp90ab, beta-actin и GusB. Для каждого образца средние значения пороговых циклов (Ct) для конститутивных генов были взяты вместе и использованы для расчёта  $\Delta$ Ct. мРНК, для которых получены Ct >35, исключали из анализа данных.

Пролиферация Т-клеток и определение уровней содержания интерферона- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Мышам с HemA (возрастом 8-10 недель) инъекционно вводили лекарственные субстанции FVIII раз в неделю в течение 2 недель. Через 72 ч после второй инъекции мышей эвтаназировали и собирали перитонеальные макрофаги промыванием стерильным раствором PBS. Т-клетки селезёнки выделяли, используя магнитные гранулы набора для выделения CD4+ Т-клеток мышей (Miltenyi Biotec, Germany). Т-клетки метили 10 мкМ раствором карбоксифлуоресцеин-сукцинимидилового эфира (CFSE) (Invitrogen, Carlsbad, CA) в тёплом растворе PBS в течение 15 мин и помещали на 96-луночные планшеты с поверхностью с ультранизкой адгезией (Corning) вместе с перитонеальными макрофагами с плотностью  $1 \times 10^6$  клеток в мл в каждую лунку. Клетки инкубировали с 0,1; 1 и 10 нМ раствором rFVIII, плацебо или микрогранулами CD3/CD28 (положительный контроль, Miltenyi Biotec) в питательной среде X-VIVO 15 (Lonza), содержащей костимулирующие антитела, а именно антитела к CD28 и CD49d (BD Biosciences), в течение 96 ч при 37°C. В конце инкубации в супернатанте культуры проводили измерения набором для ELISA компании Meso Scale Devices (MSD). Пролиферация Т-клеток определялась измерением интенсивности флуоресценции CFSE (средней интенсивности флуоресценции - MFI) проходящих Т-клеток, используя метод FACS (BD FACS CANTO II) при прямом и боковом рассеянии излучения.

Статистический анализ. Статистический анализ результатов выполнен с использованием одностороннего критерия Стьюдента (Т-тест) и критерия Манн-Уитни (Т-тест). Статистически значимыми считали Р-значения <0,05.

Результаты. Дендритные клетки являются специализированными антиген-репрезентирующими клетками и несут ключевые молекулы и ферменты, которые являются главными в направлении иммунного ответа в сторону развития толерантности. Спленocyтoв, полученные у мышей с hemA, которым вводили лекарственные субстанции FVIII или плацебо, окрашивались по маркерам CD11c и молекулам главного комплекса гистосовместимости (MHC) II класса для учёта дендритных клеток. Совместным окрашиванием со специфическими антителами к этим молекулам был идентифицирован набор дендритных клеток селезёнки, экспрессировавших такие маркеры как CD80, поверхностный маркер, активизирующийся у зрелых дендритных клеток, что указывает на более выраженную презентацию антигена, и CD274 (PD-L1), лиганд PD-1 рецептора. Как показано на фиг. 63A, спленocyтoв, отобранные у мышей с HemA, получавших по 100 МЕ/кг препаратов rFVIII Fc или УВД-FVIII, показали значительное снижение процентного

содержания дендритных клеток, экспрессирующих маркеры CD80, что предположительно вызвано избытком незрелых дендритных клеток.

Хотя мыши, получавшие препарат пр-FVIII, показали снижение процентного содержания CD80+ дендритных клеток по сравнению с плацебо, этот факт не был статистически значимым (фиг. 64A). Эта тенденция была схожей для мышей, получавших дозу rFVIII<sub>Fc</sub> 50 МЕ/кг. При дозах 250 МЕ/кг все три типа лечения не выявили отличий в процентном содержании CD80+ дендритных клеток среди спленоцитов. Результаты анализов методом FACS дендритных клеток селезёнки, экспрессирующих маркеры CD274 (PD-L1), выявил, что препарат rFVIII<sub>Fc</sub> в дозе 100 МЕ/кг повышал процент таких клеток по сравнению с плацебо и другими типами лечения препаратами FVIII (фиг. 64B). Как показано анализом ПЦР в режиме реального времени, эта молекула также регулировалась на уровне мРНК с помощью препарата rFVIII<sub>Fc</sub> (фиг. 64C). Этот факт вызывает предположение, что молекулы rFVIII<sub>Fc</sub> регулируют механизм PD-L1:PD-1 - один из ключевых иммуносупрессорных механизмов, таким образом снижая иммуногенность к белкам FVIII. Кроме маркеров CD274, rFVIII<sub>Fc</sub> также повышает уровни мРНК индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO) - ключевого фермента, который регулирует пролиферацию и активацию Т-клеток, влияя на метаболизм триптофана (фиг. 64D).

Пример 24. Препарат rFVIII<sub>Fc</sub> в низких дозировках усиливает экспрессию маркеров иммунной толерантности и анэргию спленоцитов.

Экспериментальные методики проводились согласно материалам и методам, описанным в примере 23.

Для идентификации маркеров иммунной толерантности, индуцированной rFVIII<sub>Fc</sub>, был применён метод ПЦР в режиме реального времени на основе микрочипов, направленный на выявление специфических для иммунной толерантности и анэргии клеток генов (SA Biosciences). Для идентификации новых элементов отклика, активированных лекарственной субстанцией, использовали мРНК, выделенную у спленоцитов, полученных у мышей, которым вводили препарат rFVIII<sub>Fc</sub> по 50 и 250 МЕ/кг и плацебо.

Кандидатов идентифицировали на основе их уровня экспрессии (2-кратное превышение или понижение по сравнению с плацебо) и расчёте р-значений на основе критерия Стьюдента (<0,05). Относительную экспрессию каждого гена измеряли, используя метод расчёта  $2^{-\Delta C_t}$  (Livak K.J. and Schmittgen T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods 25:402-408) после нормализации средних значений Ct набора из 5 конститутивных генов (см. пример 23, Материалы и методы).

На основании этих критериев выполненный анализ на микрочипах выявил кандидатов, которые преимущественно регулировались на уровне спленоцитов белком rFVIII<sub>Fc</sub> в дозе 50 МЕ/кг, по сравнению с введением мышам плацебо и дозы препарата 250 МЕ/кг (фиг. 65 и 66). Эти результаты включали статистически значимые повышения активности генов, специфических для развития толерантности, таких как Foxp3, CTLA-4 и CD25; генов, связанных с развитием анэргии, таких как Egr2, Dgka и CBL-B; генов, принадлежащих к суперсемейству фактора некроза опухолей (TNFRSF); простагландин-синтазе-2 (PTGS2) и рецептору простагландина E2 (PTGER2) (см. фиг. 66). И наоборот, с использованием микрочипов идентифицированы некоторые гены, понижающие активность, известные как относящиеся к провоспалительным молекулам, таким как CCL3 и STAT3 (фиг. 66).

Эти результаты указывали на наличие толерогенных механизмов и толерогенного микроокружения у спленоцитов и животных, получавших дозы 50 МЕ/кг препарата rFVIII<sub>Fc</sub>. Эти профили экспрессии генов, определённых с использованием микрочипов, были валидированы используя ПЦР в режиме реального времени с парами индивидуальных праймеров для идентифицированных кандидатов.

Пример 25. Пролиферирующие и синтезирующие высокие уровни IFN- $\gamma$  CD4+ спленоциты, выделенные у группы мышей, получавших 250 МЕ/кг препарата.

Экспериментальные методики проводились согласно материалам и методам, описанным в примере 23.

Исследование пролиферации Т-клеток проведено для изучения специфических реакций Т-клеток на фактор VIII *ex vivo*. CD4+ Т-клетки, изолированные у мышей, получавших две еженедельные инъекции по 50 или 250 МЕ/кг rFVIII<sub>Fc</sub>, метили красителем CFSE, разбавляли перитонеальными макрофагами (антиген-репрезентирующие клетки, APC) и инкубировали в присутствии препарата rFVIII с удалённым В-доменом в трёх концентрациях 0,1; 1 и 10 нМ.

Анализ пролиферации методом FACS на основе сигналов разбавления CFSE выявил, что Т-клетки из групп животных, получавших препарат rFVIII<sub>Fc</sub> в дозе 250 МЕ/кг, показали дозозависимое увеличение пролиферации, которое было статистически значимым при концентрации 10 нМ (фиг. 67). Помимо этого, Т-клетки мышей, получавших 50 МЕ/кг препарата rFVIII<sub>Fc</sub>, не показали статистически значимого повышения пролиферации при возрастании концентраций rFVIII *ex vivo* по сравнению с плацебо (фиг. 67).

Уровни содержания интерферона (IFN) измеренные в супернатантах культур таких инкубирований выявили подобный профиль схемы пролиферации Т-клеток, т.е. дозозависимое увеличение секреции Т-клеток, полученных у мышей, получавших 250 МЕ/кг препарата rFVIII<sub>Fc</sub> (фиг. 68A), тогда как изменений уровней содержания Т-клеток у мышей, получавших 50 МЕ/кг препарата rFVIII<sub>Fc</sub>, не было (фиг.

68B). Для того чтобы вскрыть механизм(ы) действия препарата rFVIII<sub>Fc</sub> в подавлении иммунного ответа к FVIII, мы применили две мутантные конструкции: одна - не связывающая рецептор Fc $\gamma$  (названная rFVIII<sub>Fc</sub>-N297A) и другая - с недостатком связывания рецептора FcRn (названная rFVIII<sub>Fc</sub>-IHN). Эти конструкции использовались для идентификации взаимодействий rFVIII<sub>Fc</sub> одного из этих рецепторов связывания в обеспечении иммуносупрессорного действия. С этой целью изобретателями изучался профиль секреции IFN $\gamma$  Т-клетками, выделенными у мышей, получавших две еженедельные инъекции препарата rFVIII<sub>Fc</sub>-N297A в дозе 250 МЕ/кг (фиг. 68C) и 50 МЕ/кг (фиг. 68D).

Непосредственное сравнение секреции IFN $\gamma$  Т-клетками, выделенными у мышей, получавших дозы 250 МЕ/кг препаратов rFVIII<sub>Fc</sub> и rFVIII<sub>Fc</sub>-N297A, выявило, что уровни содержания цитокинов были сильно снижены у Т-клеток животных, получавших мутантную молекулу, хоть и были значительно выше уровней в сравнении с плацебо. Тем не менее, уровни содержания IFN $\gamma$  в группе, получавшей 50 МЕ/кг мутантного белка, не показали статистически значимого отличия от дозы 50 МЕ/кг препарата rFVIII<sub>Fc</sub>. Этот факт наталкивает на предположение, что высокий уровень образования антител и пролиферация Т-клеток, наблюдаемая при высоких дозах rFVIII<sub>Fc</sub>, может быть результатом взаимодействий доменов Fc с рецепторами Fc $\gamma$ , которые блокируются Fc $\gamma$ , несвязывающимся с мутантным белком.

Вышеизложенное описание специальных осуществлений изобретения должно столь полно раскрыть общую природу этого изобретения, что другие исследователи, применив знания в пределах компетентности в этой области техники, могут легко модифицировать и/или внедрить различные применения таких специальных осуществлений, без излишних экспериментов, не отходя от общего принципа данного изобретения. Поэтому подразумевается, что такие адаптации и модификации находятся в пределах значения и диапазоне эквивалентов раскрытых осуществлений изобретения на основе знаний и руководств, представленных в этом изобретении. Следует понимать, что фразеология или терминология, представленные в этой заявке, приводятся с целью описания, но не являются ограничивающими, так что эту терминологию и фразеологию данных параметров следует интерпретировать компетентным изобретателем в свете наставлений и руководств.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение химерного полипептида, содержащего часть фактора VIII (FVIII) и первую Fc-часть, для производства лекарственного средства для индукции иммунной толерантности к FVIII у больного, где часть FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотам 20-1457 SEQ ID NO: 2, и где первая Fc-часть содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотам 1458-1684 SEQ ID NO: 2.

2. Применение по п.1, где часть FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична аминокислотам 20-1457 SEQ ID NO: 2, и где указанная первая Fc-часть содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична аминокислотам 1458-1684 SEQ ID NO: 2.

3. Применение по п.1, где указанная часть FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотам 20-1457 SEQ ID NO: 2, и где первая Fc-часть содержит аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотам 1458-1683 SEQ ID NO: 2.

4. Применение химерного полипептида, содержащего часть фактора VIII (FVIII) и первую Fc-часть, для производства лекарственного средства для предупреждения или ингибирования развития ингибитора FVIII, где часть FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотам 20-1457 SEQ ID NO: 2, и где первая Fc-часть содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотам 1458-1684 SEQ ID NO: 2.

5. Применение по п.4, где часть FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична аминокислотам 20-1457 SEQ ID NO: 2, и где первая Fc-часть содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична аминокислотам 1458-1684 SEQ ID NO: 2.

6. Применение по п.4, где указанная часть FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотам 20-1457 SEQ ID NO: 2, и первая Fc-часть содержит аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотам 1458-1683 SEQ ID NO: 2.

7. Применение по любому из пп.1-6, где часть FVIII ковалентно связана своим C-концом с N-концом первой Fc-части.

8. Применение по любому из пп.1-7, где указанная первая Fc-часть образует дисульфидную связь со второй Fc-частью, где вторая Fc-часть содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотам 1458-1684 SEQ ID NO: 2.

9. Применение по любому из пп.1-8, где первая Fc-часть образует дисульфидную связь со второй Fc-частью и где вторая Fc-часть содержит аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотам 1458-1683 SEQ ID NO: 2.

10. Применение по любому из пп.1-9, отличающееся тем, что у указанного больного может развиваться ингибирующий иммунный ответ к FVIII при введении эквивалентной дозы FVIII без Fc-части.

11. Применение по любому из пп.1-10, где у больного развивался ингибирующий иммунный ответ к FVIII или больной никогда ранее не получал терапию FVIII.
12. Применение по любому из пп.1-11, где больным является плод, ребенок или взрослый.
13. Применение по п.12, где возраст ребенка меньше 1 года.
14. Применение по любому из пп.1-13, где часть FVIII содержит один или несколько фрагментов Fc-части, отличающихся от первой, которые повышают период полувыведения.
15. Применение по любому из пп.10-14, где иммунный ответ включает образование ингибирующих антител к FVIII.
16. Применение по п.15, где концентрация антител составляет по меньшей мере 0,6 единиц Бетесда (БЕ) или по меньшей мере 5 БЕ.
17. Применение по любому из пп.10-16, где иммунный ответ включает клеточно-опосредованный иммунный ответ.
18. Применение по п.17, где клеточно-опосредованный иммунный ответ включает высвобождение цитокинов, выбранных из IL-12, IL-4 и TNF- $\alpha$ .
19. Применение по любому из пп.10-18, где иммунный ответ включает клинический симптом, выбранный из группы, состоящей из повышения вероятности возникновения кровотечений, высокого уровня поглощения FVIII, недостаточного ответа на терапию FVIII, снижения эффективности терапии FVIII и сокращения периода полувыведения FVIII.
20. Применение по любому из пп.1-19, отличающееся тем, что химерный полипептид понижает у больного количество антител к фактору FVIII или титр антител к FVIII, понижает у больного уровень цитокина, понижает у больного количество антител к FVIII в сравнении с таким количеством после предварительного лечения больного полипептидом, состоящим из полипептида FVIII, понижает у больного титр антител к FVIII в сравнении с таким титром после предварительного лечения больного полипептидом, состоящим из полипептида FVIII, понижает у больного уровень цитокина в сравнении с таким уровнем после предварительного лечения больного полипептидом, состоящим из полипептида FVIII, понижает у больного количество антител к фактору свёртывания крови в сравнении с таким количеством, которое могло бы возникнуть в результате введения больному полипептида, состоящего из части FVIII, понижает у больного титр антител к фактору свёртывания крови в сравнении с таким титром, который мог бы возникнуть в результате введения больному полипептида, состоящего из части FVIII или понижает у больного уровень цитокина в сравнении с таким уровнем, который мог бы возникнуть в результате введения больному полипептида, состоящего из части FVIII.
21. Применение по любому из пп.1-20, где у больного идентифицирована одна или больше характеристик, выбранных из группы, состоящей из:
- (a) наличия мутации или делеции в гене, кодирующем FVIII;
  - (b) наличия перестройки гена, кодирующего FVIII;
  - (c) наличия родственника, у которого ранее развился ингибирующий иммунный ответ к FVIII;
  - (d) больной получал терапию интерферонами;
  - (e) больной получал противовирусную терапию;
  - (f) наличия генетической мутации в гене, отличном от гена, кодирующего FVIII, который связан с риском развития ингибирующего иммунного ответа; и
  - (g) любой комбинации вышеуказанного.
22. Применение по п.21, где генетическая мутация в гене, отличном от гена, кодирующего FVIII, включает одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из:
- (i) генетического полиморфизма, связанного с повышением уровня TNF- $\alpha$ ;
  - (ii) генетического полиморфизма, связанного с повышением уровня IL10;
  - (iii) генетического полиморфизма, связанного с понижением уровня CTLA-4;
  - (iv) мутации молекул DR15 или DQB0602 главного комплекса гистосовместимости (MHC) II класса; и
  - (v) любой комбинации вышеуказанного.
23. Применение по любому из пп.1-22, где часть фактора VIII содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотам 20-1457 SEQ ID NO: 2, и где первая Fc-часть содержит аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотам 1458-1683 SEQ ID NO: 2.
24. Применение по любому из пп.1-23, где химерный полипептид является мономер-димерным гибридным белком, содержащим первую цепь, содержащую часть фактора VIII и первую Fc-часть, и вторую цепь, по существу, состоящую из второй Fc-части или состоящую из второй Fc-части, где часть FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотам 20-1457 SEQ ID NO: 2, и где первая Fc-часть содержит аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотам 1458-1683 SEQ ID NO: 2, и где вторая Fc-часть содержит аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотам 1458-1683 SEQ ID NO: 2.
25. Набор для индукции иммунной толерантности к фактору VIII (FVIII), содержащий: (a) фармацевтическую композицию, содержащую химерный полипептид, содержащий часть фактора VIII и пер-

вую Fc-часть, и фармацевтически приемлемый носитель, где указанная часть FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотам 20-1457 SEQ ID NO: 2, и где первая Fc-часть содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотам 1458-1684 SEQ ID NO: 2; и (b) инструкции по введению композиции больному для иммунной толерантности к FVIII.

26. Набор по п.25, где химерный полипептид является мономер-димерным гибридным белком FVIII.

27. Набор по п.25 или 26, где в инструкции указывается по меньшей мере на одну стадию определения необходимости иммунной толерантности к FVIII у больного.

28. Набор по п.27, где по меньшей мере одна стадия определения необходимости иммунной толерантности у больного включает по меньшей мере одну стадию, выбранную из группы, состоящей из:

(a) определения у больного мутации или делеции в гене FVIII;

(b) определения у больного перестройки гена FVIII;

(c) определения у больного наличия родственника с ранее развившимся ингибирующим иммунным ответом к FVIII;

(d) определения факта проведения больному терапии интерферонами;

(e) определения факта проведения больному противовирусной терапии;

(f) определения у больного генетической мутации в генах, отличных от гена, кодирующего FVIII, связанных с повышенным риском развития ингибирующего иммунного ответа; и

(g) любой комбинации вышеуказанного.

29. Набор по п.28, где генетическая мутация гена, отличающегося от гена, кодирующего FVIII, содержит одну или несколько мутаций, выбранных из группы, состоящей из:

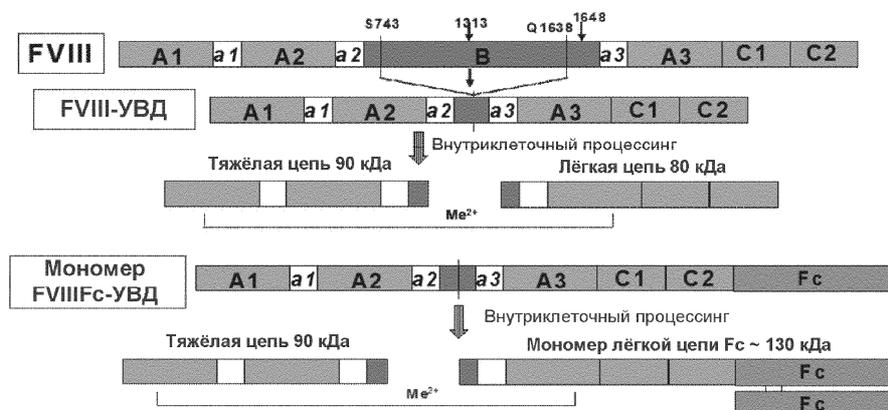
(i) генетического полиморфизма, связанного с повышением уровня TNF- $\alpha$ ;

(ii) генетического полиморфизма, связанного с повышением уровня IL10;

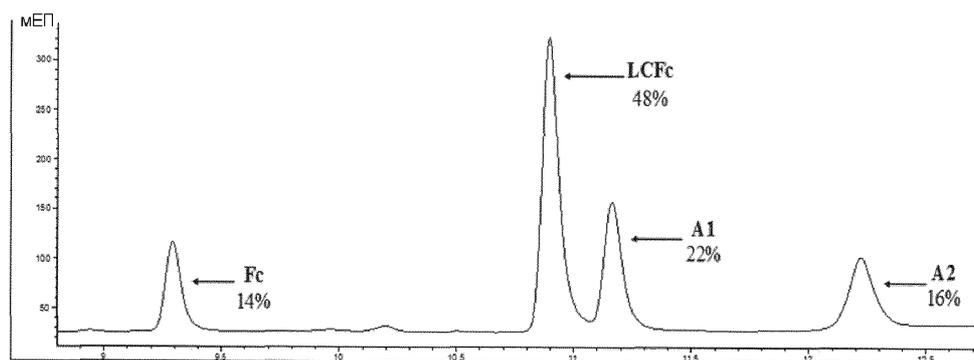
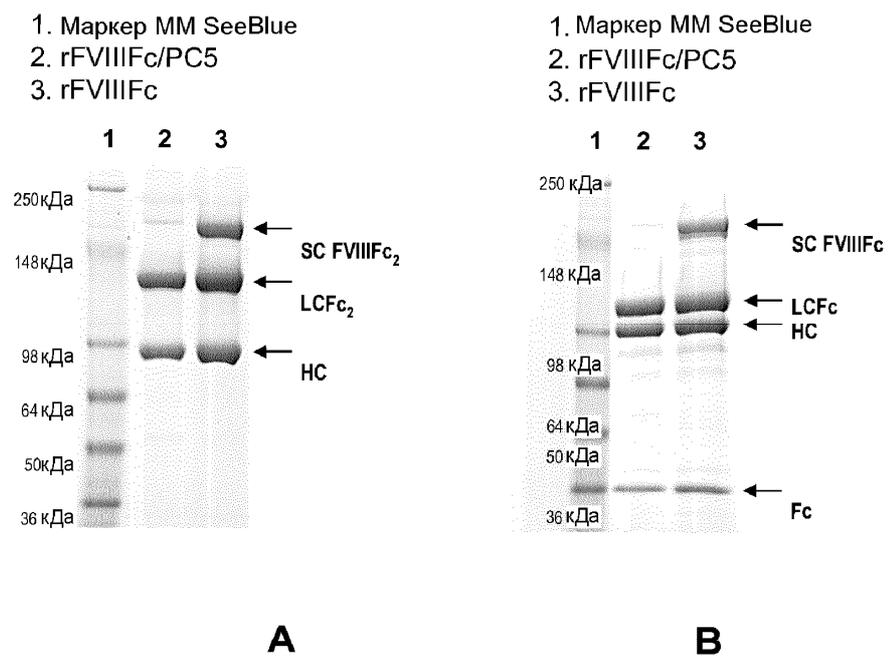
(iii) генетического полиморфизма, связанного с понижением уровня CTLA-4;

(iv) мутации молекул DR15 или DQB0602 главного комплекса гистосовместимости (МНС) II класса; и

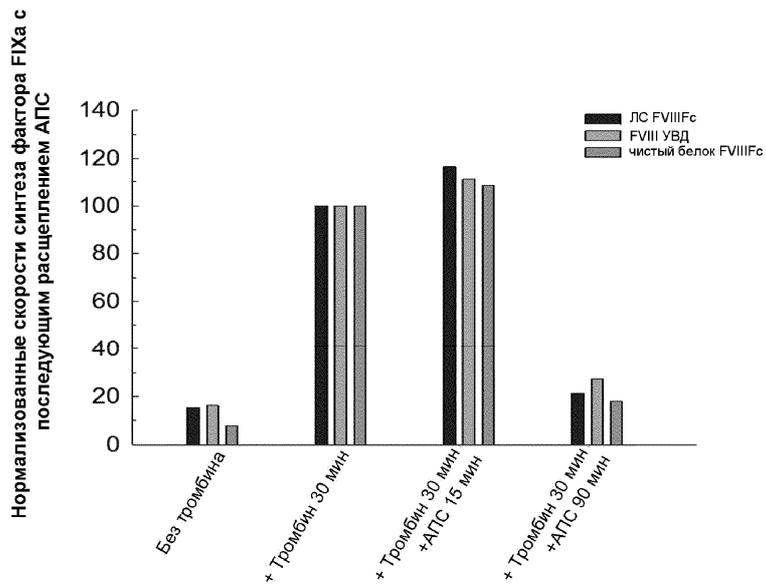
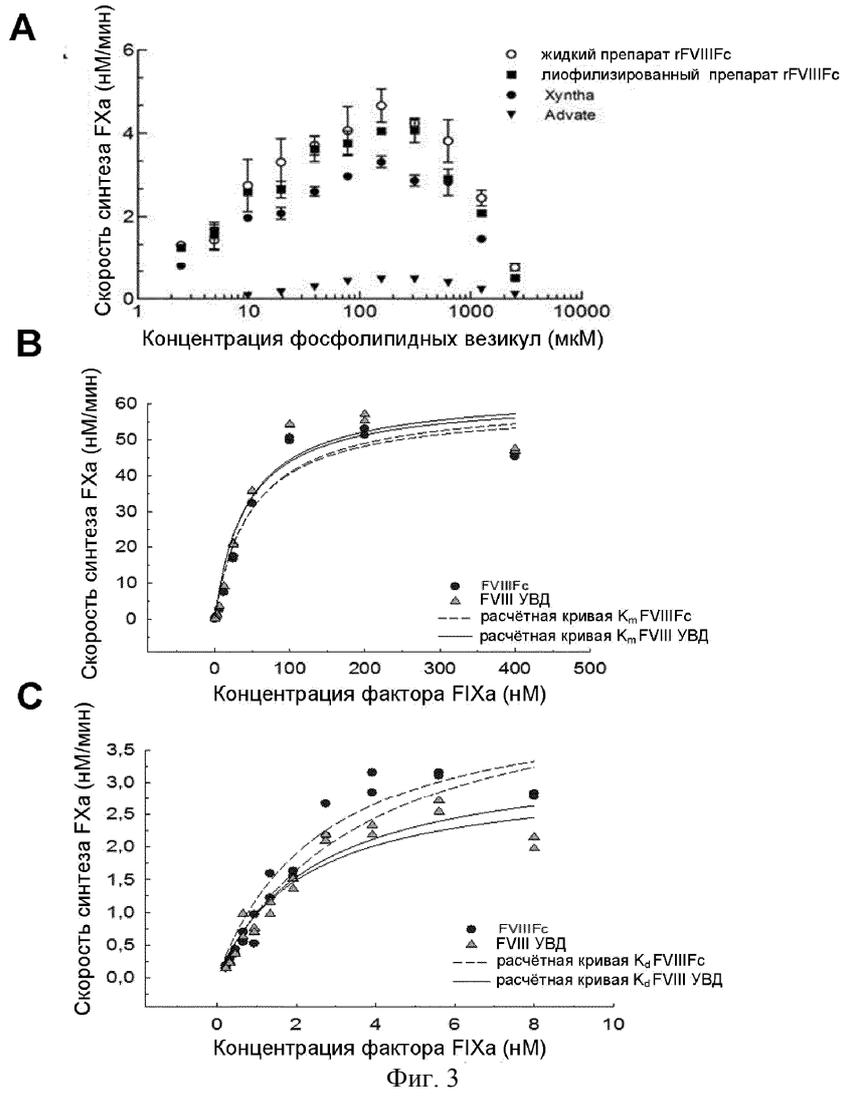
(v) любой комбинации вышеуказанного.

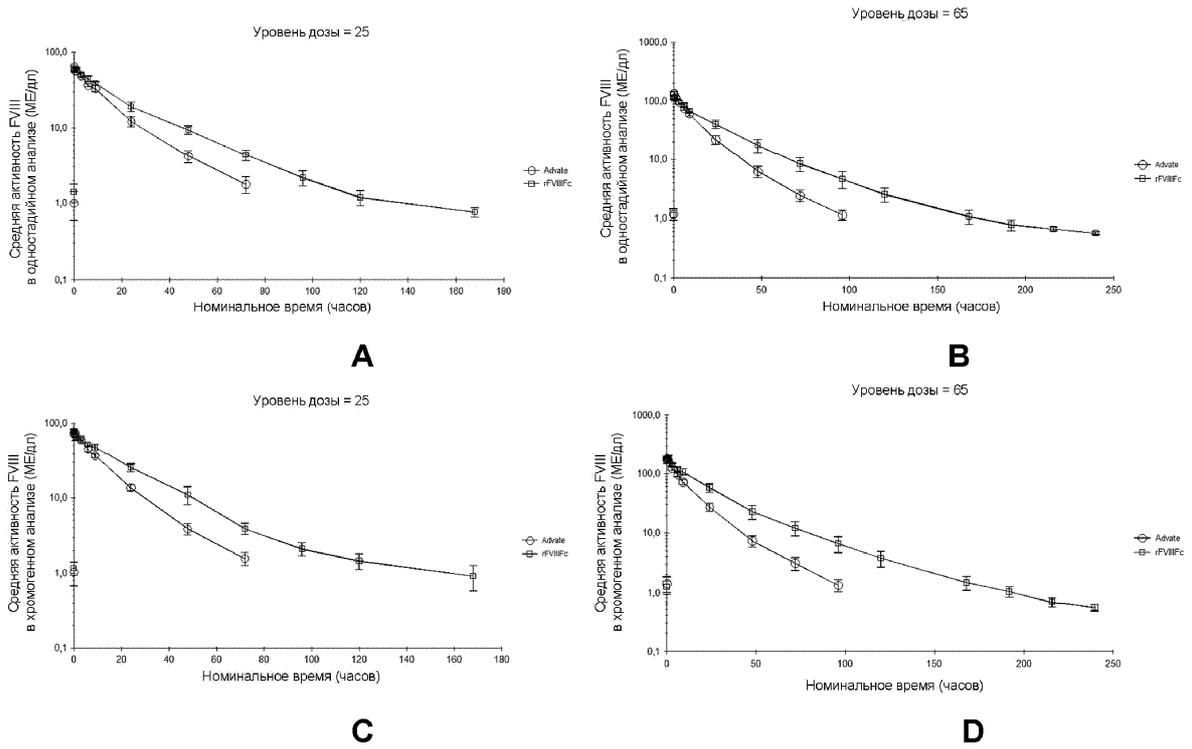


Фиг. 1

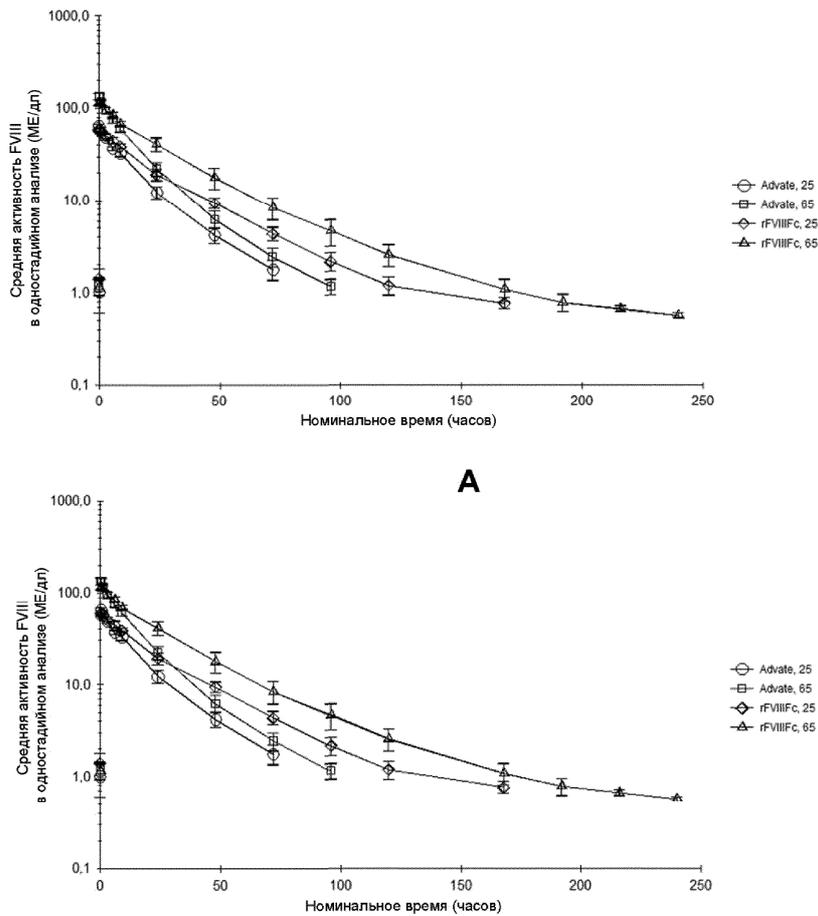


**C**  
Фиг. 2

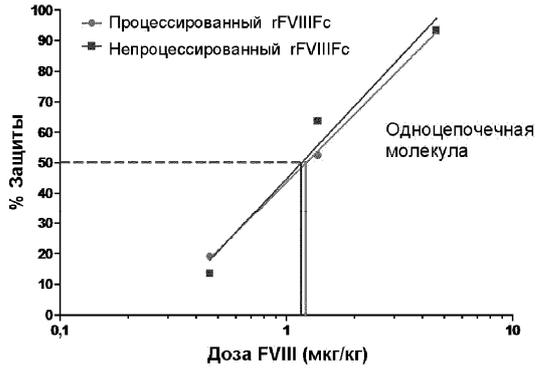




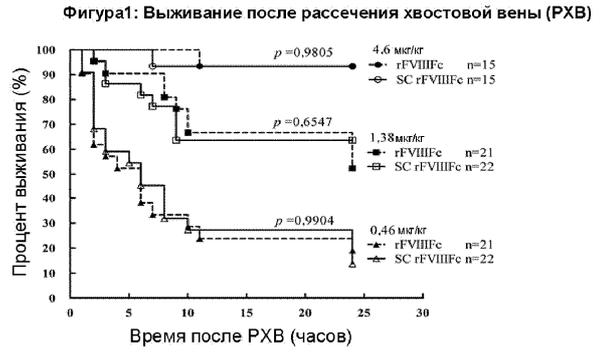
Фиг. 5



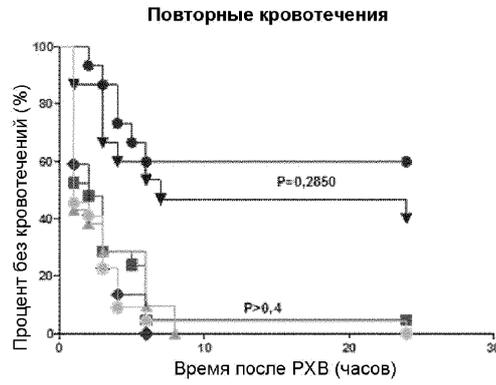
Фиг. 6



**A**



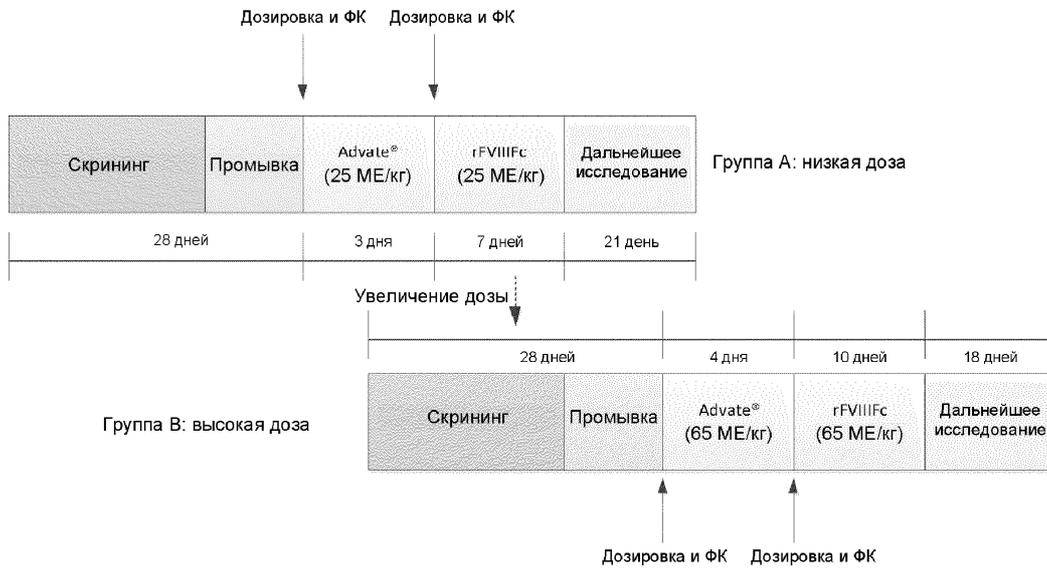
**B**



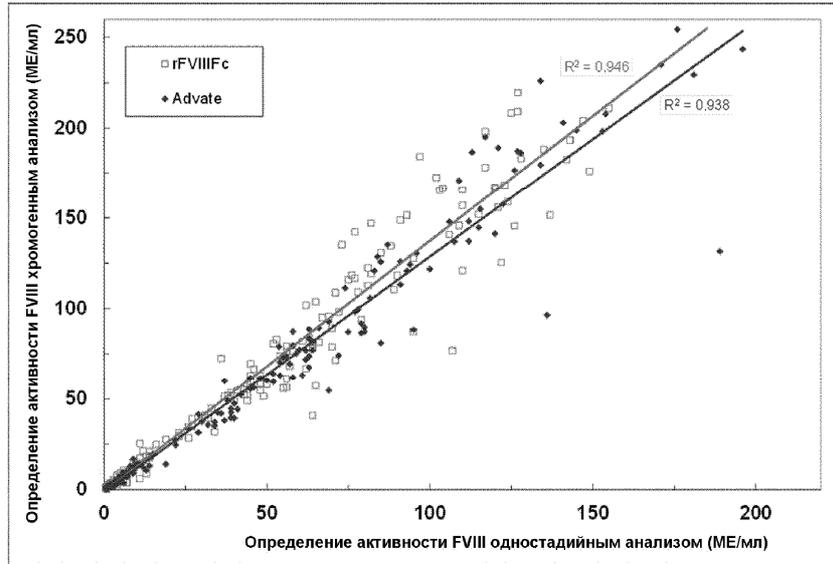
Фиг. 7

**C**

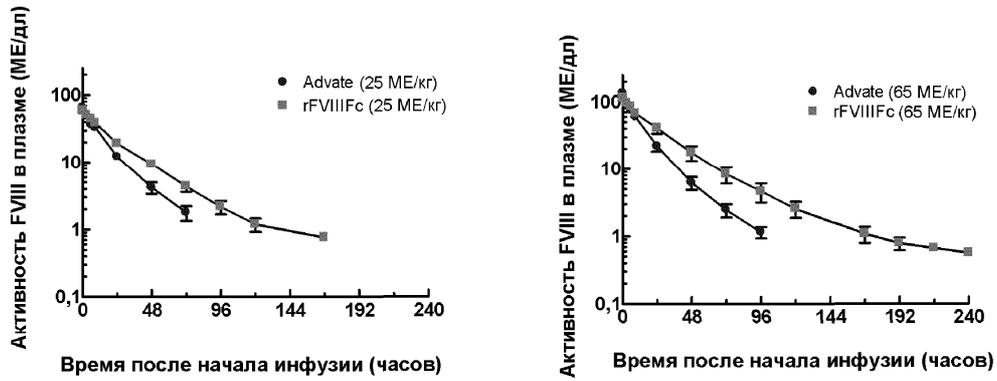
**Схема исследования**



Фиг. 8



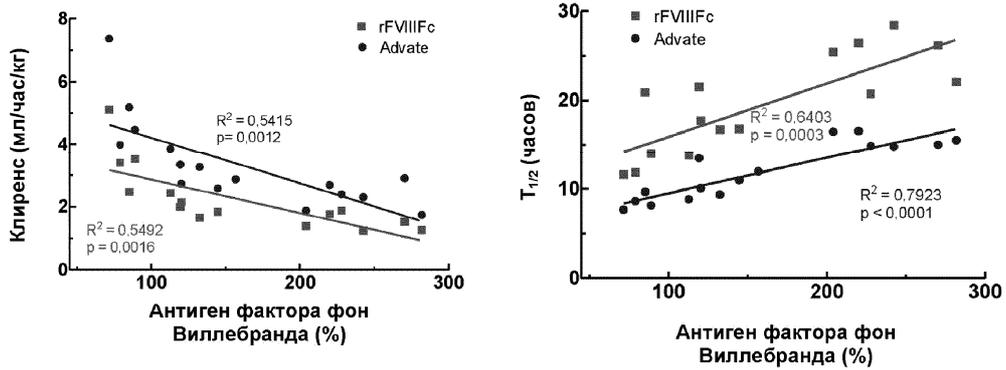
Фиг. 9



**A**

**B**

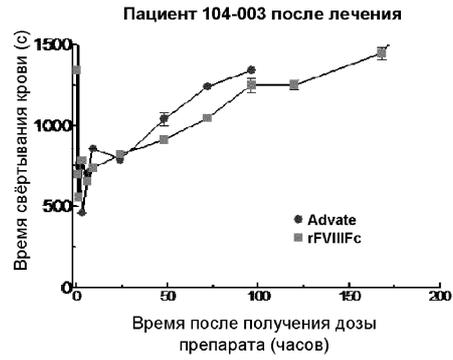
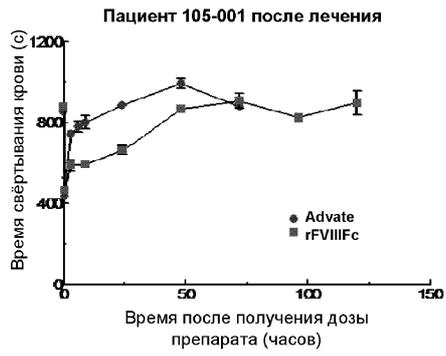
Фиг. 10



**A**

**B**

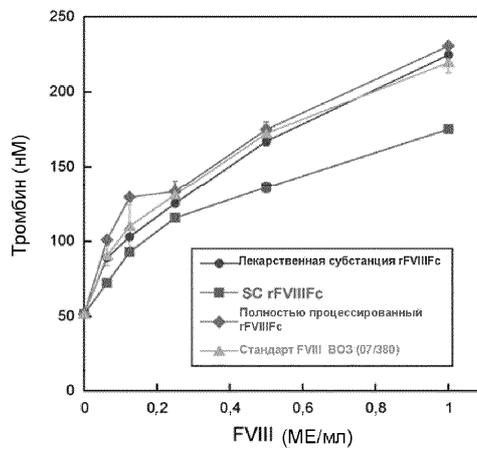
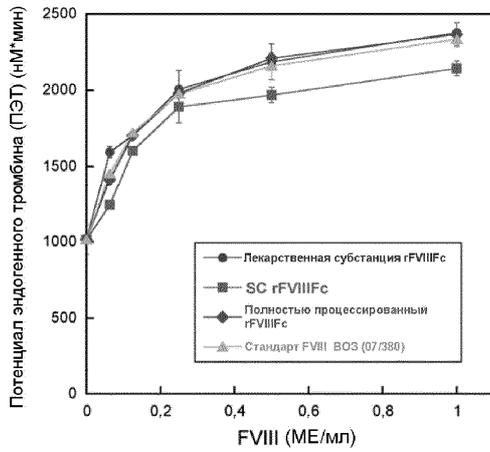
Фиг. 11



А

В

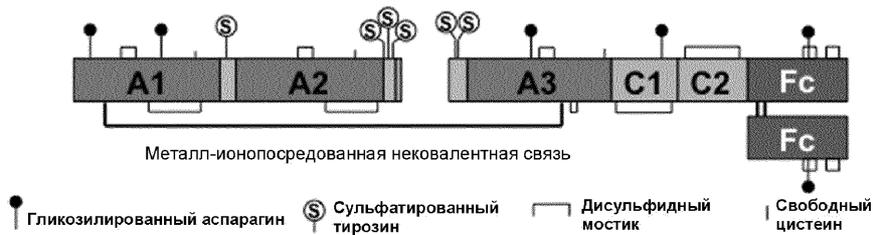
Фиг. 12



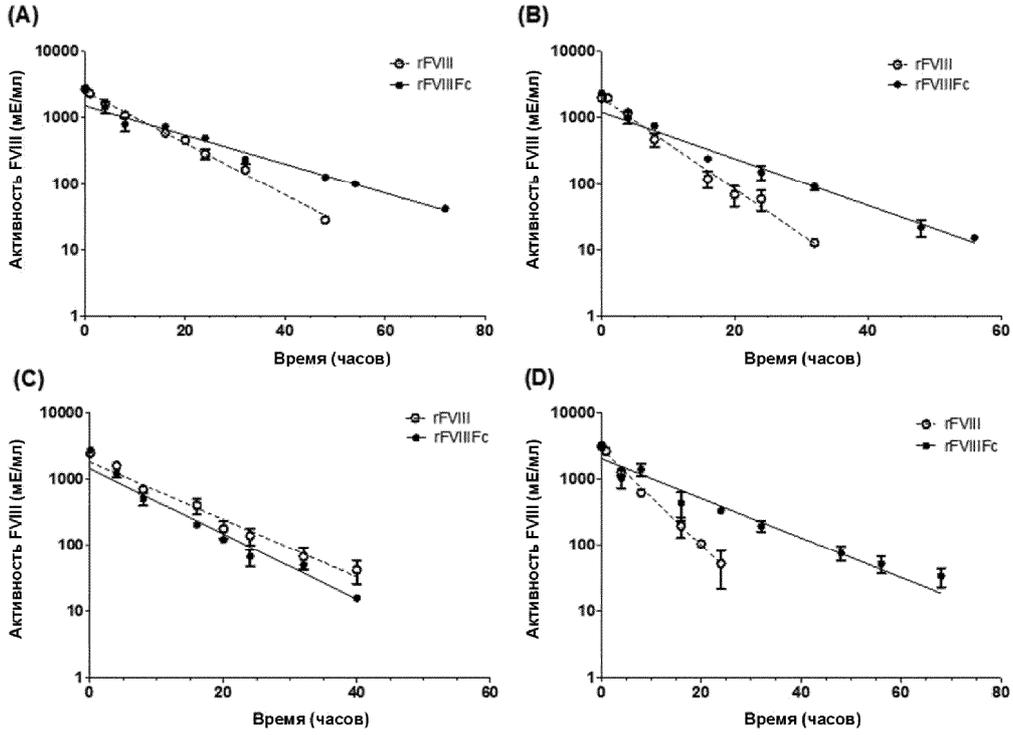
А

В

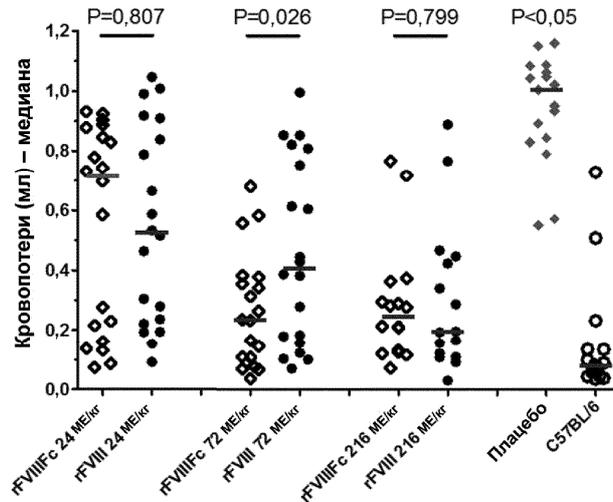
Фиг. 13



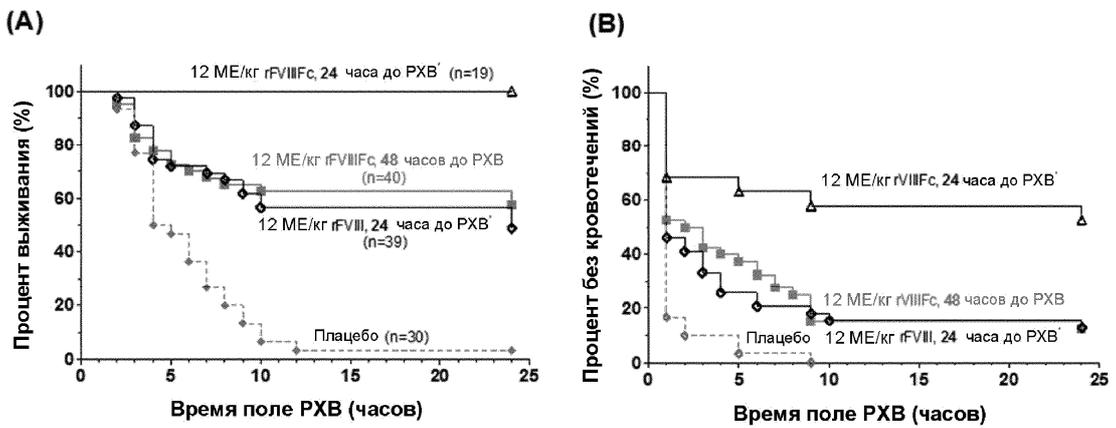
Фиг. 14



Фиг. 15

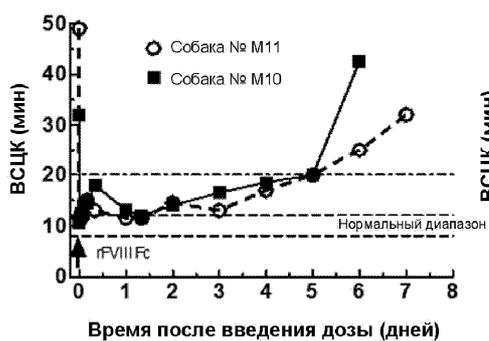


Фиг. 16

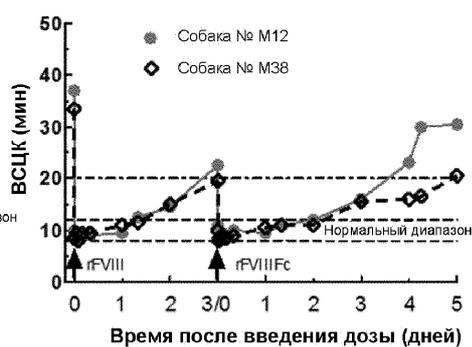


Фиг. 17

A. rFVIII Fc

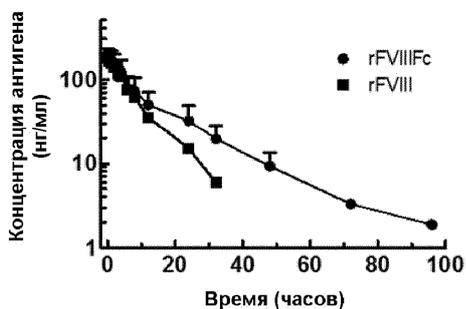


B. rFVIII с последующим введением rFVIII Fc в перекрёстном исследовании

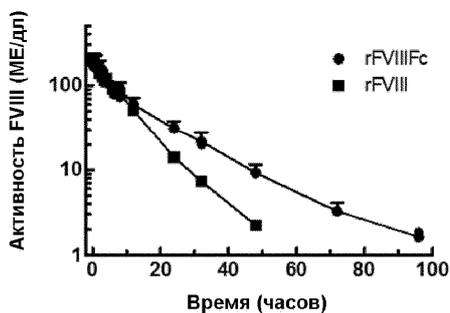


Фиг. 18

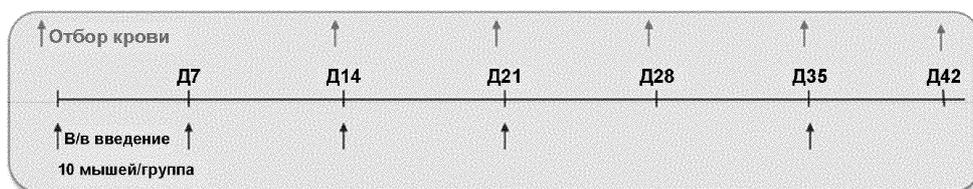
A.



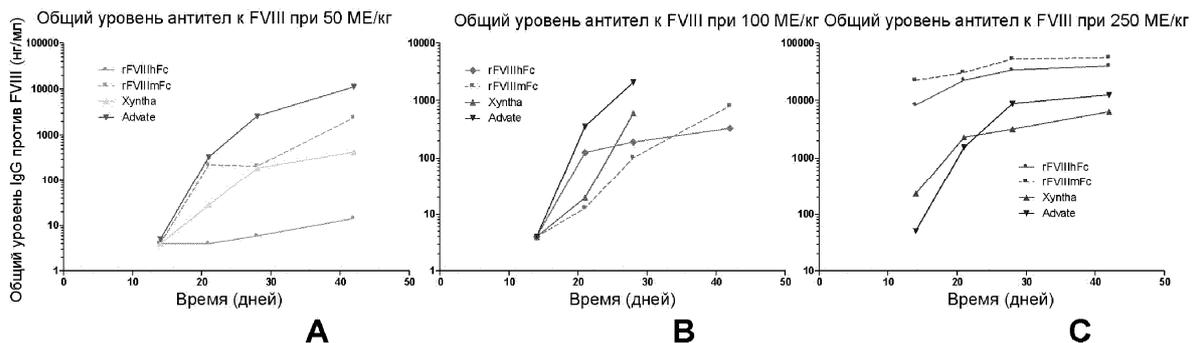
B.



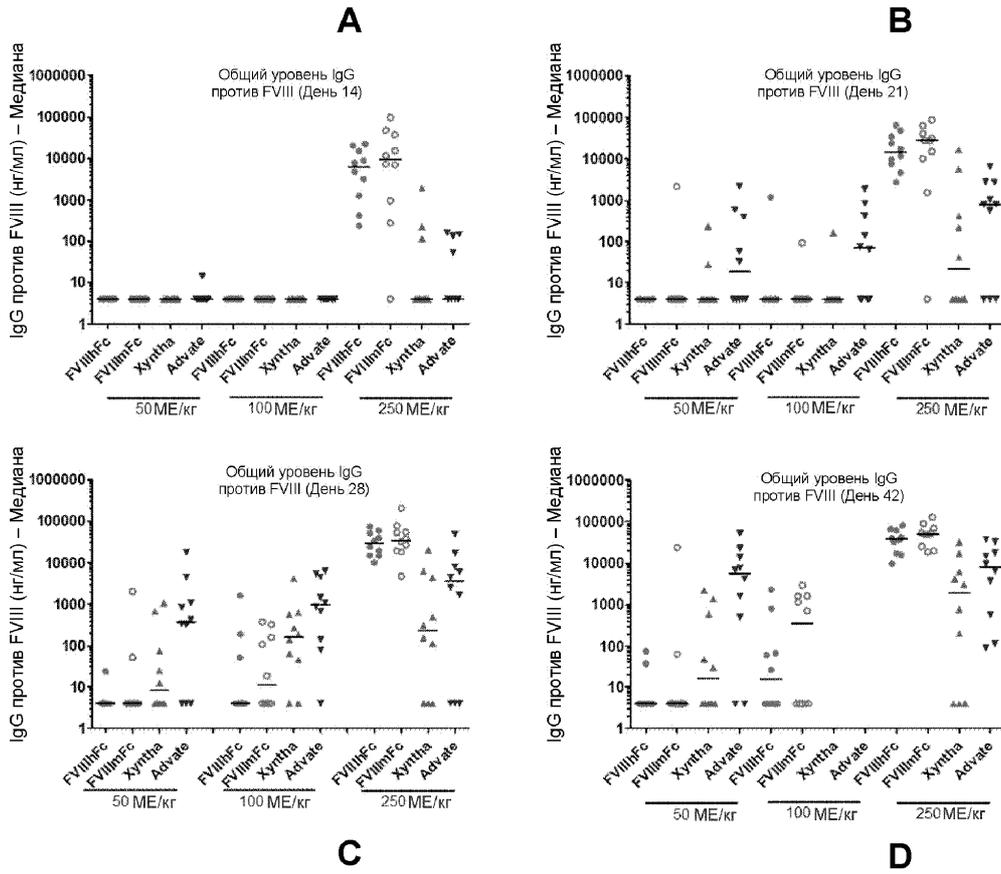
Фиг. 19



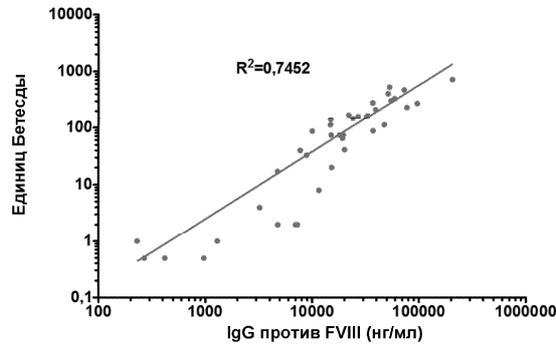
Фиг. 20



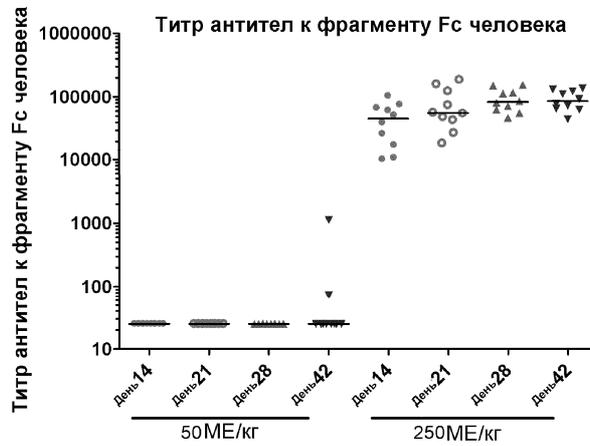
Фиг. 21



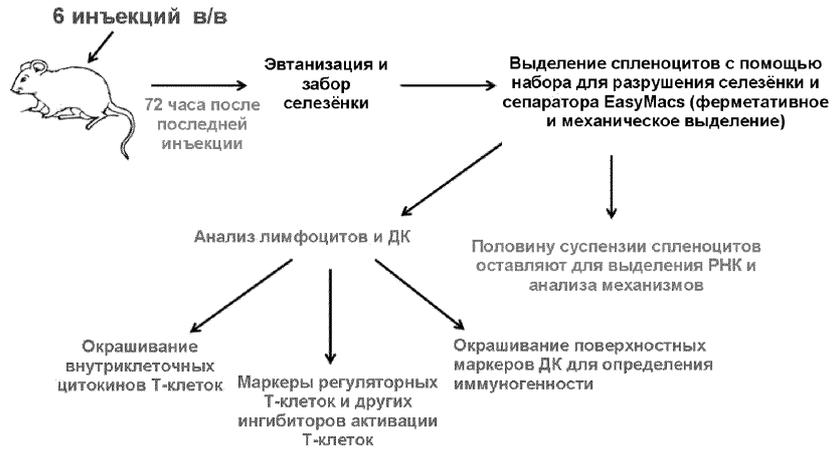
Фиг. 22



Фиг. 23



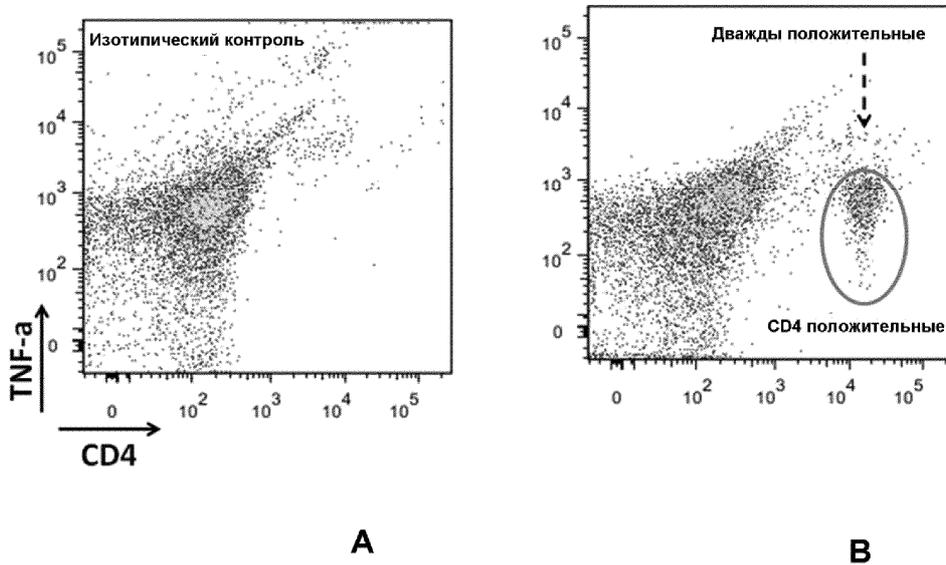
Фиг. 24



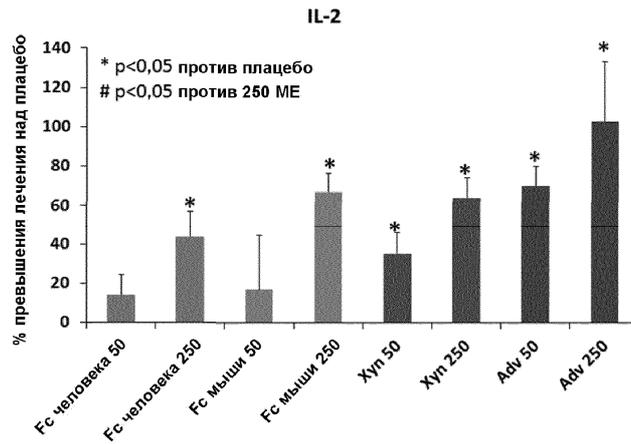
Фиг. 25



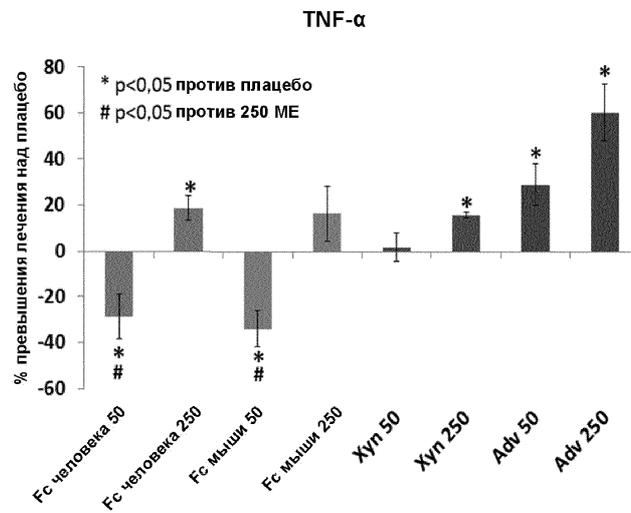
Фиг. 26



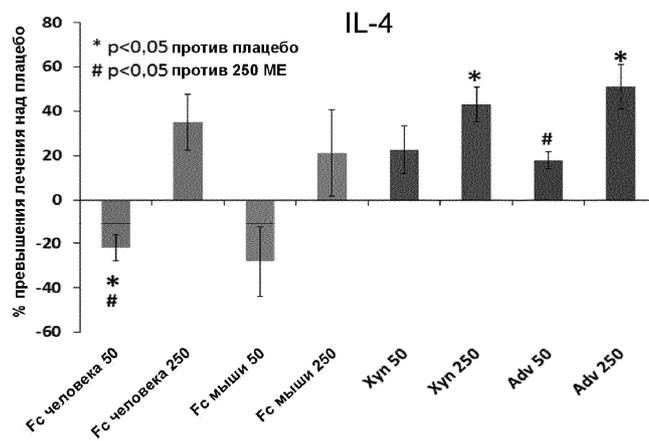
Фиг. 27



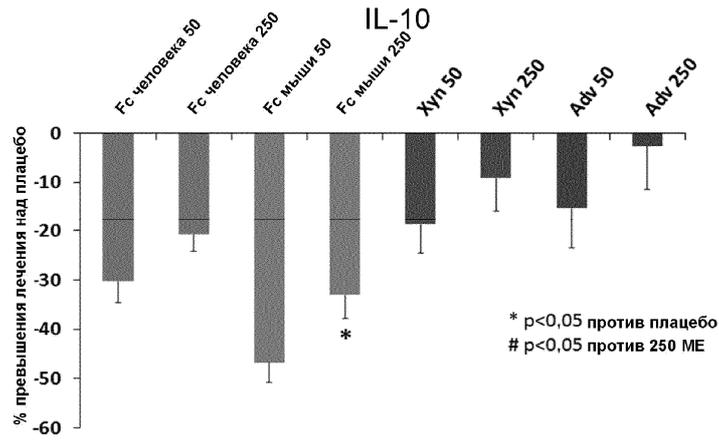
Фиг. 28



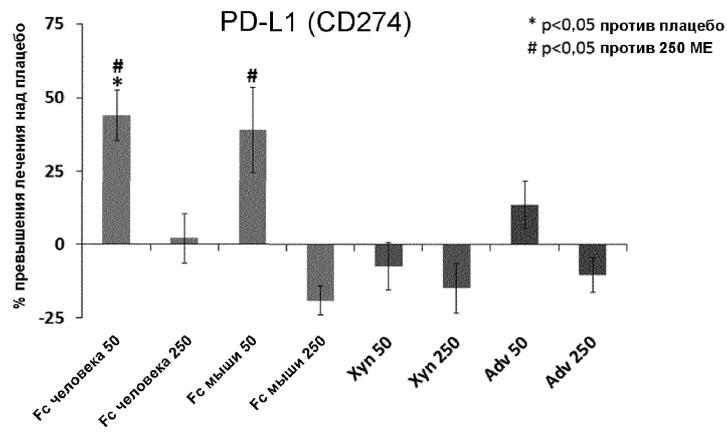
Фиг. 29



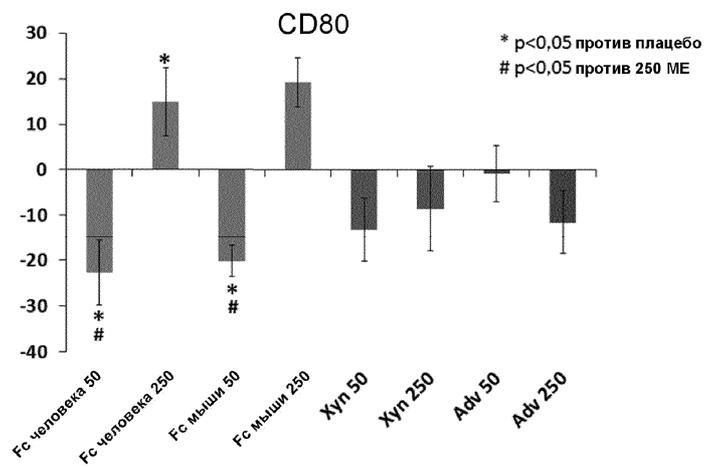
Фиг. 30



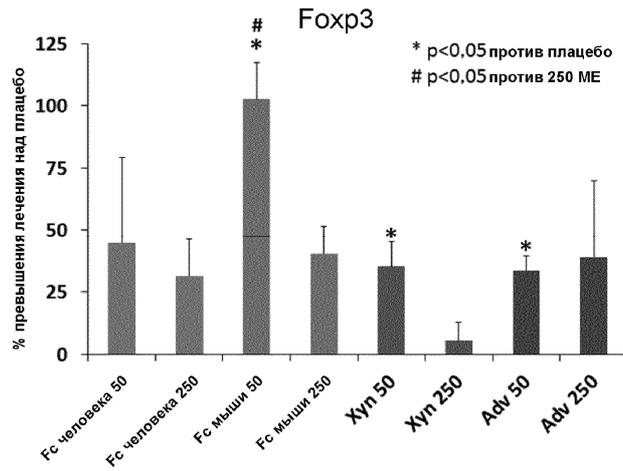
Фиг. 31



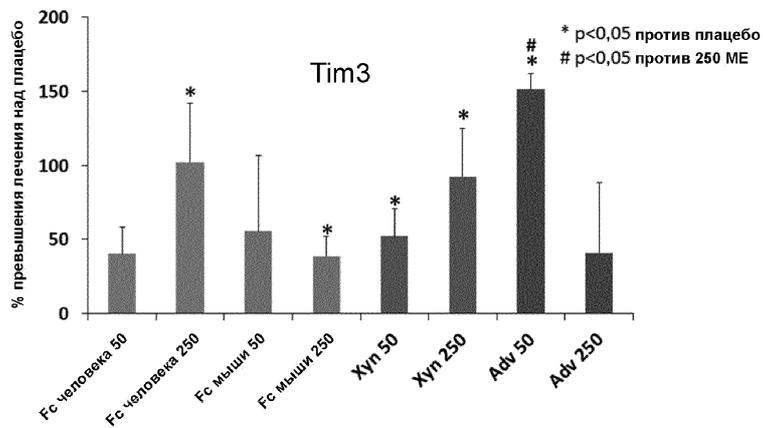
Фиг. 32



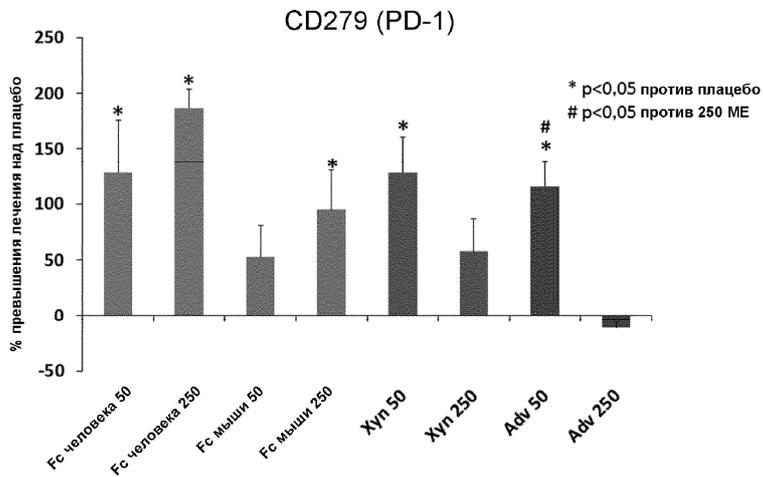
Фиг. 33



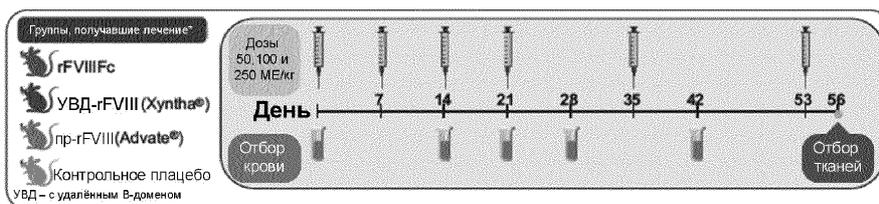
Фиг. 34



Фиг. 35



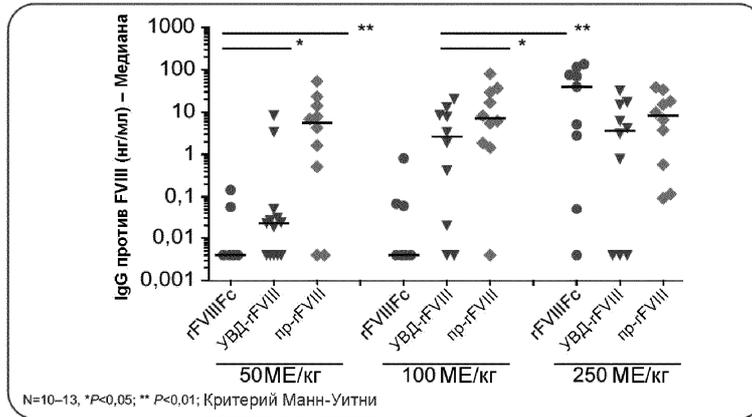
Фиг. 36



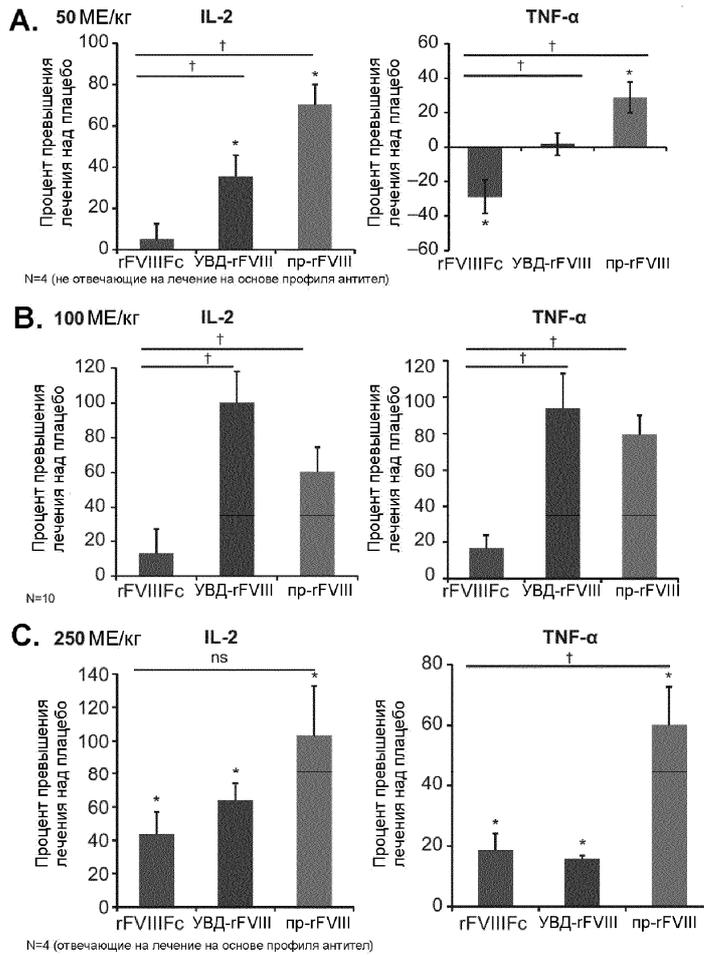
Фиг. 37



Фиг. 38

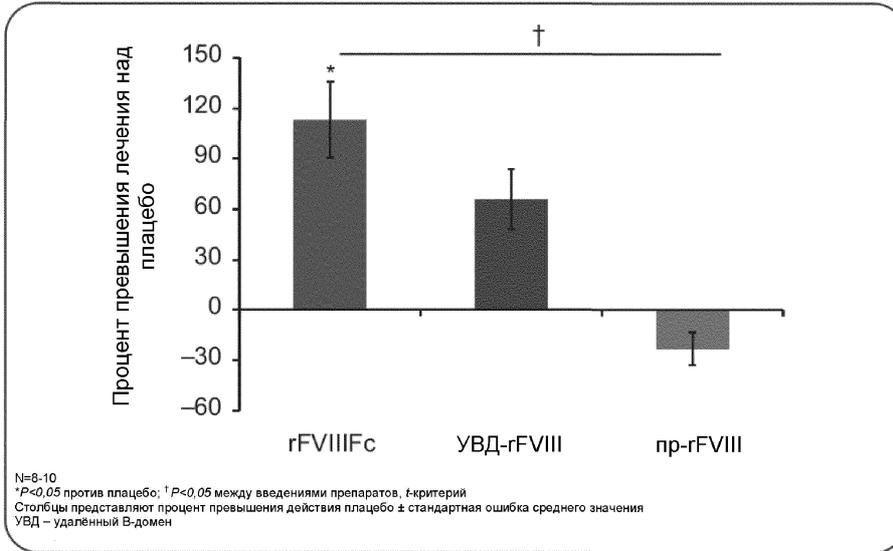


Фиг. 39

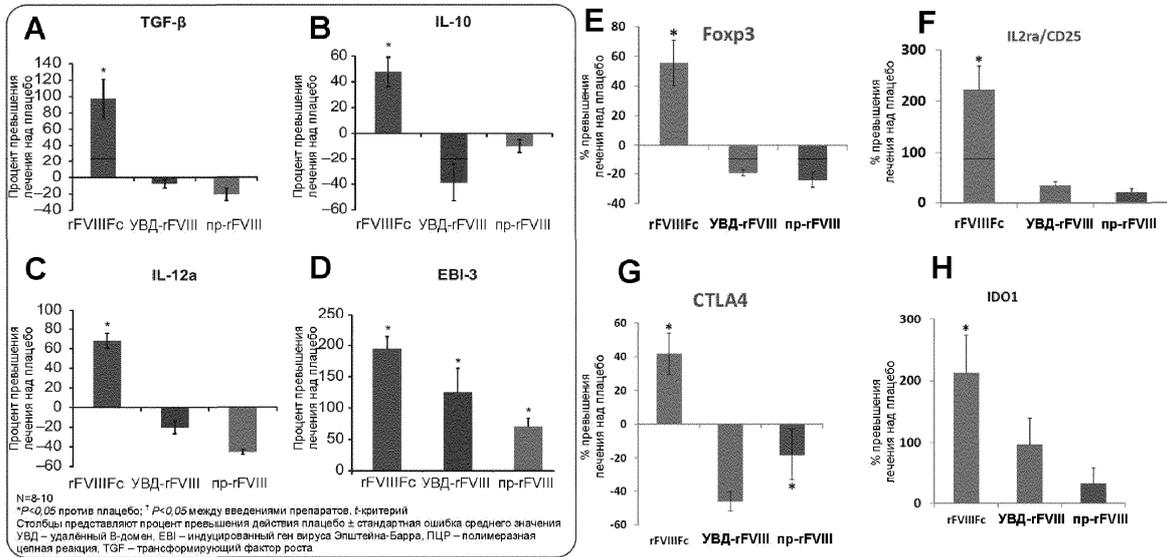


\*P<0,05 против плацебо; † P<0,05 между введениями препаратов, t-критерий  
 Столбцы представляют процент превышения действия плацебо ± стандартная ошибка среднего значения  
 УВД – удалённый В-домен; IL – интерлейкин; TNF – фактор некроза опухолей

Фиг. 40

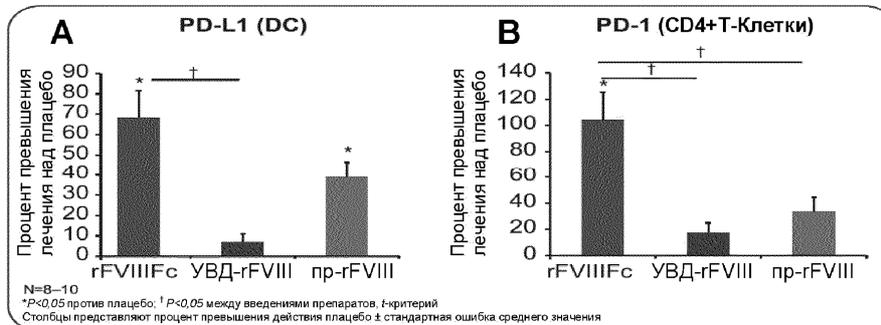


Фиг. 41

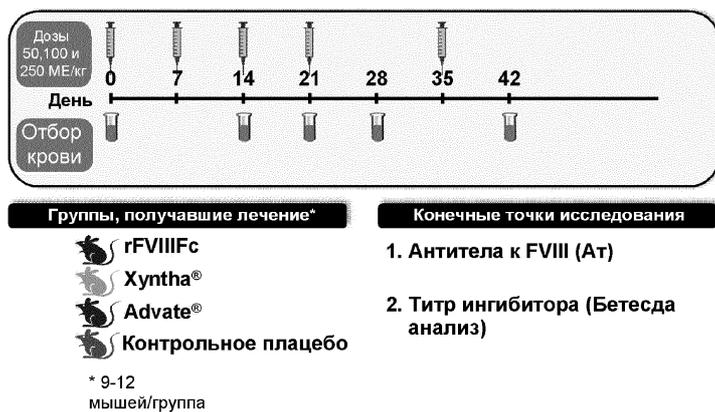


100 МЕ/кг  
n= 8-10

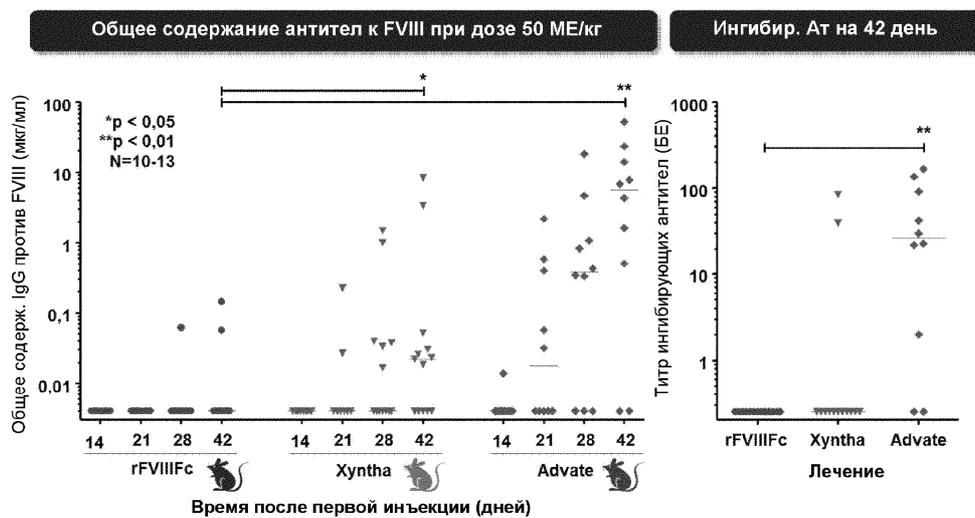
Фиг. 42



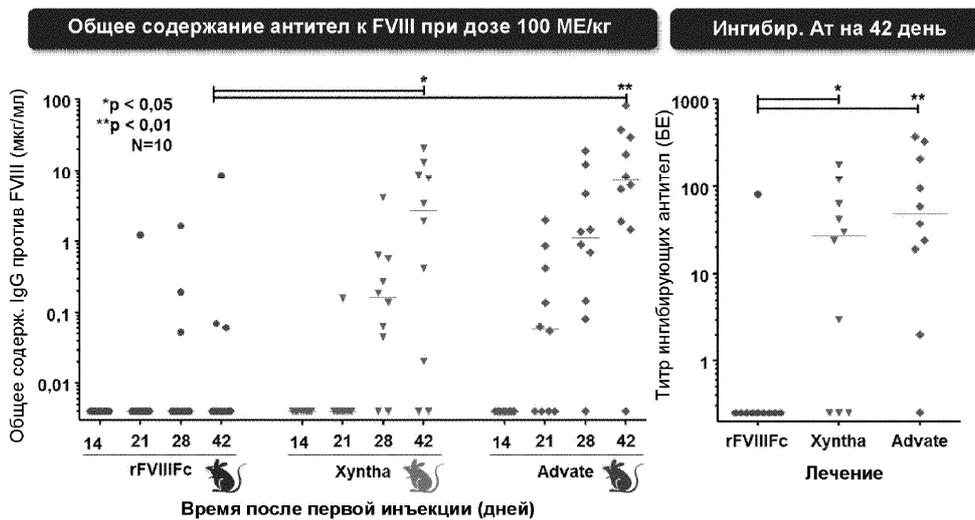
Фиг. 43



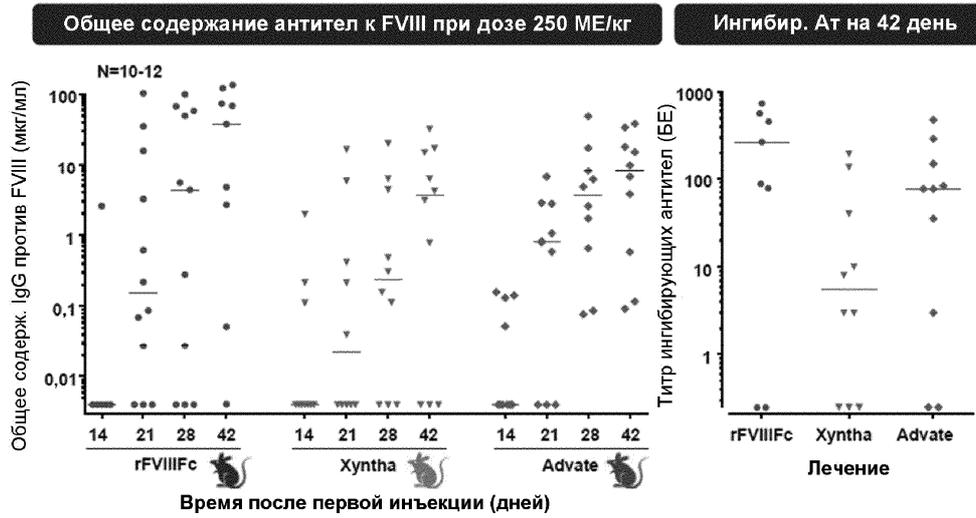
Фиг. 44



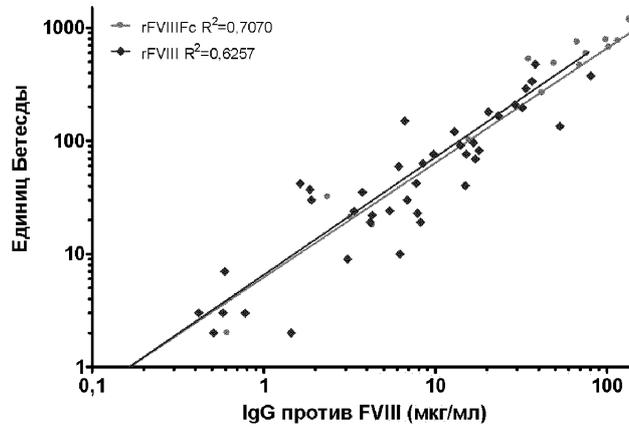
Фиг. 45



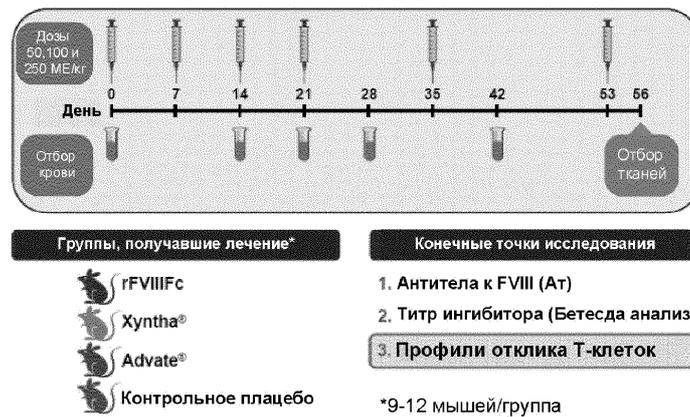
Фиг. 46



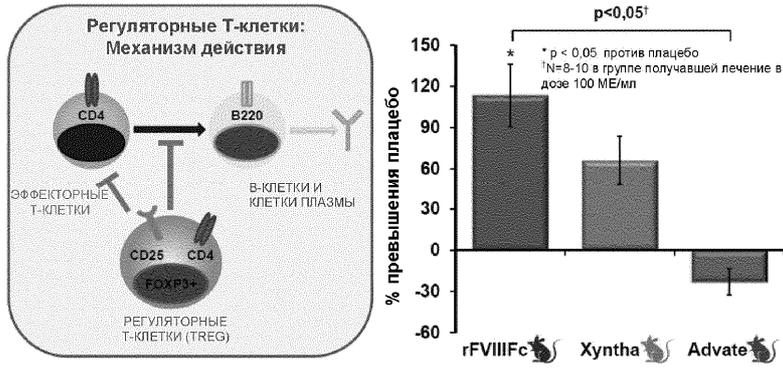
Фиг. 47



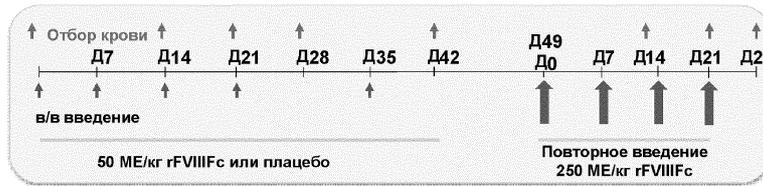
Фиг. 48



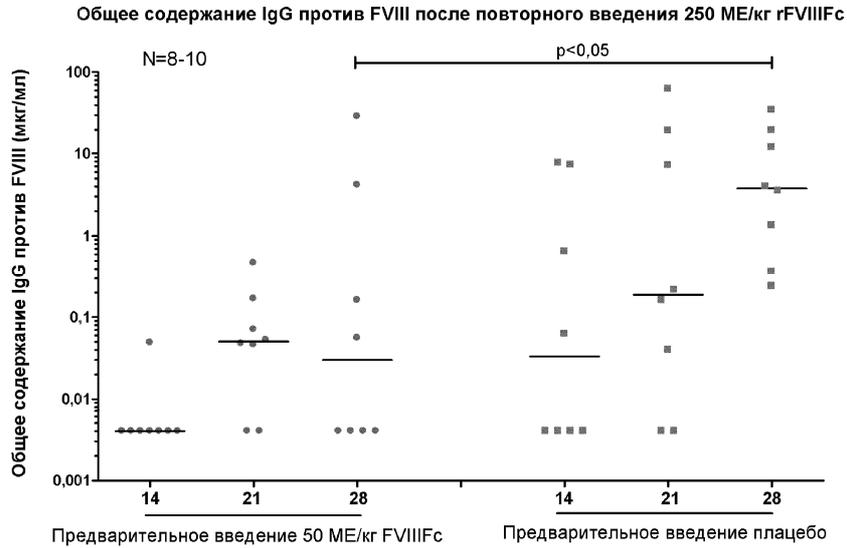
Фиг. 49



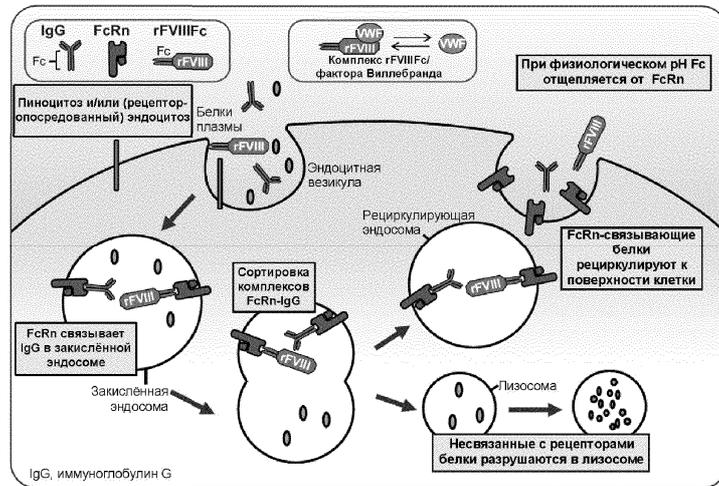
Фиг. 50



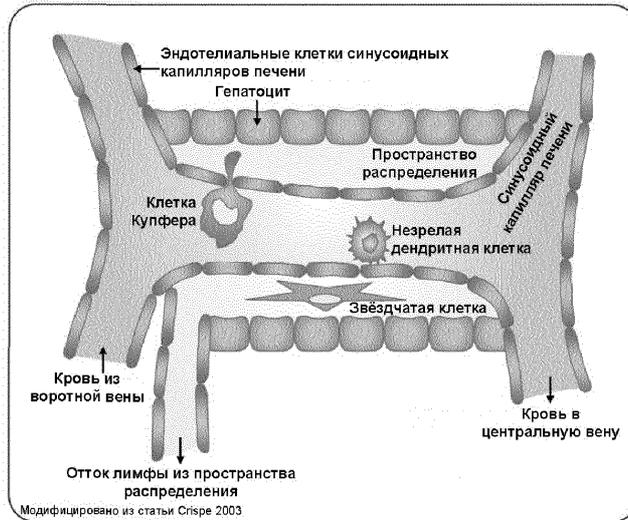
Фиг. 51



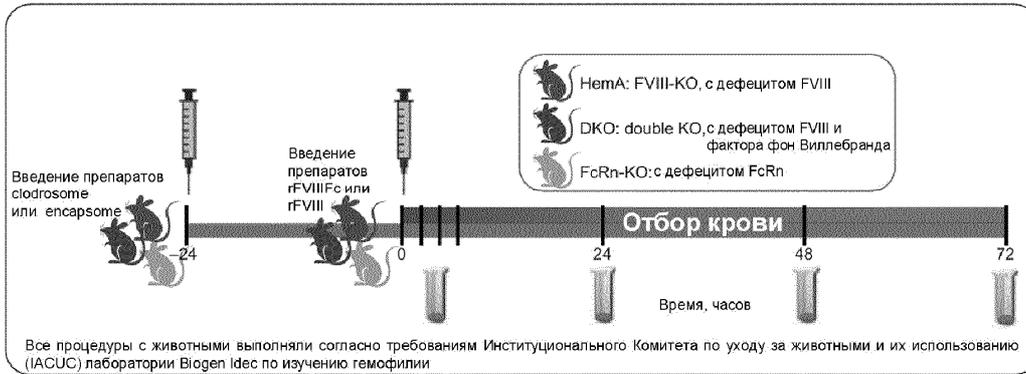
Фиг. 52



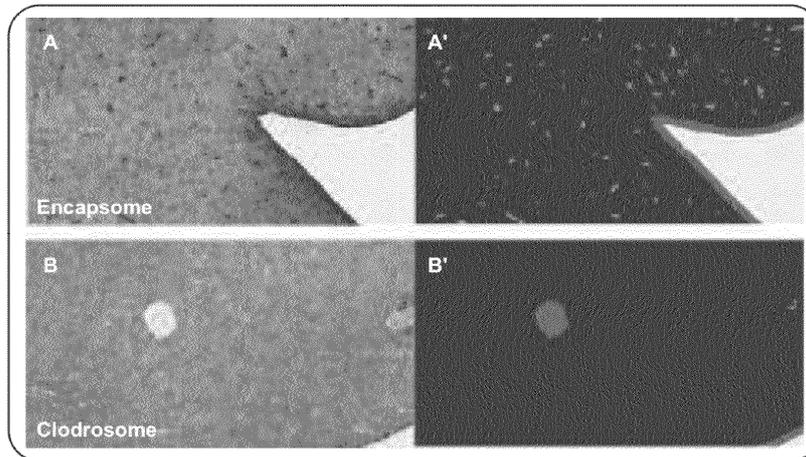
Фиг. 53



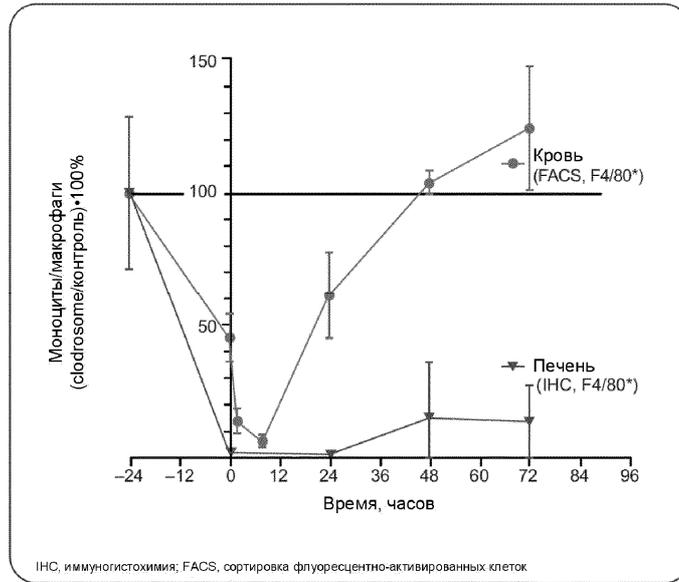
Фиг. 54



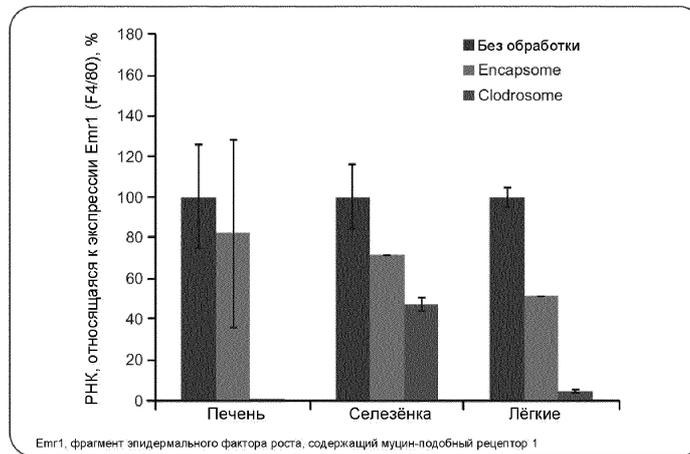
Фиг. 55



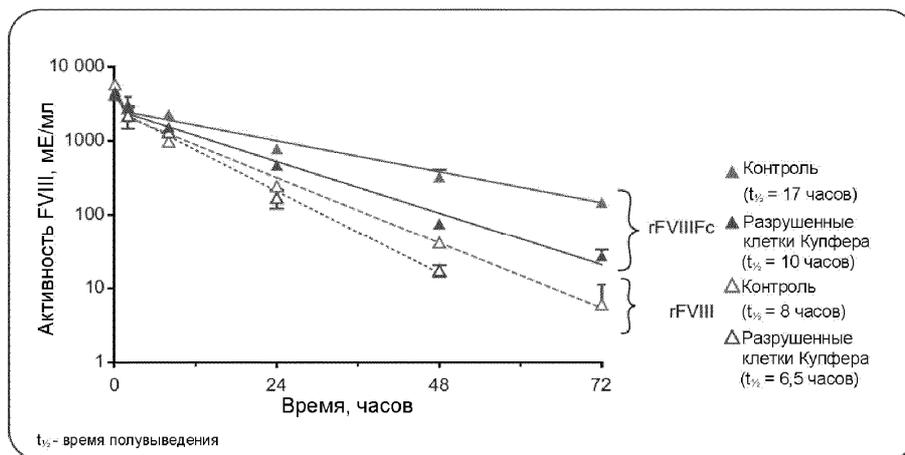
Фиг. 56



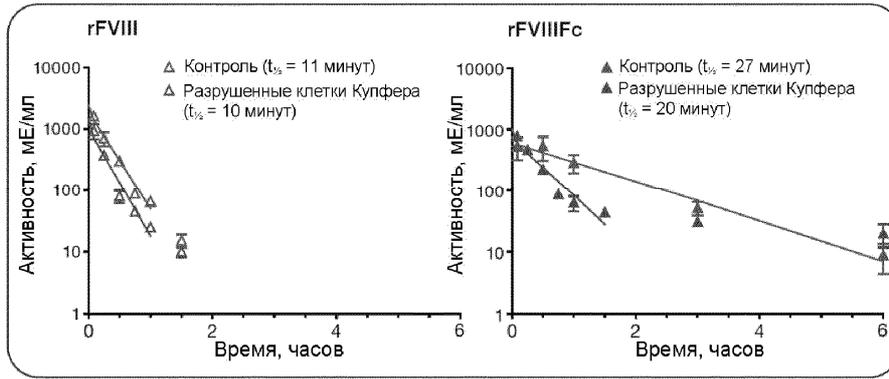
Фиг. 57



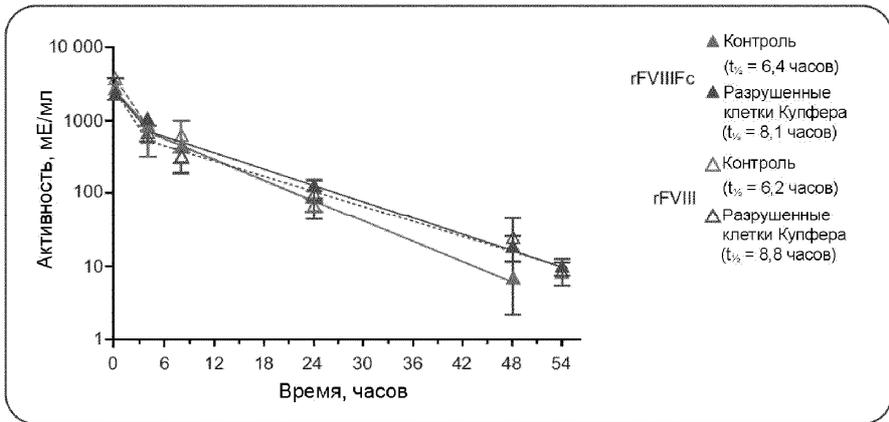
Фиг. 58



Фиг. 59

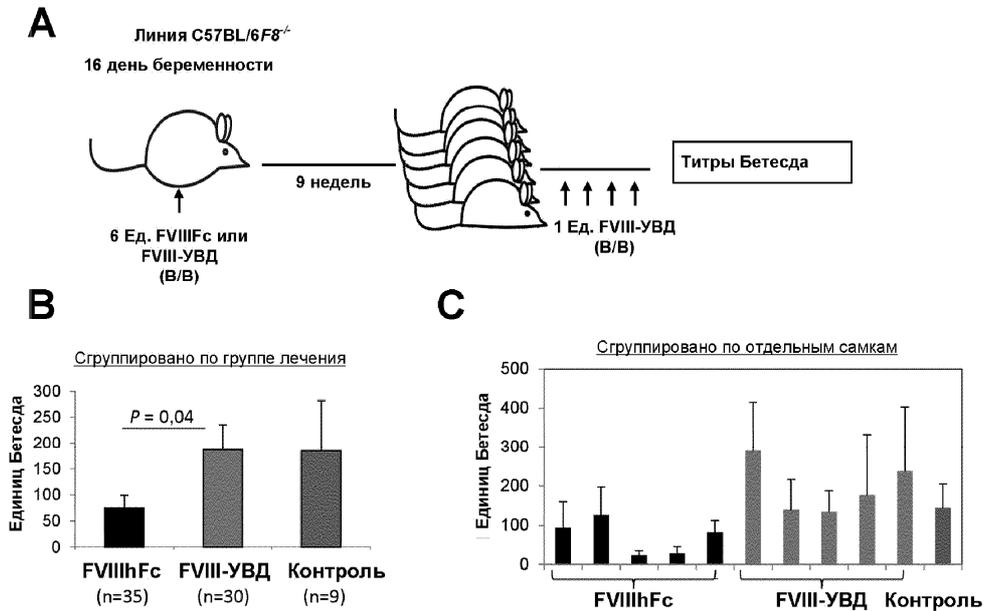


Фиг. 60



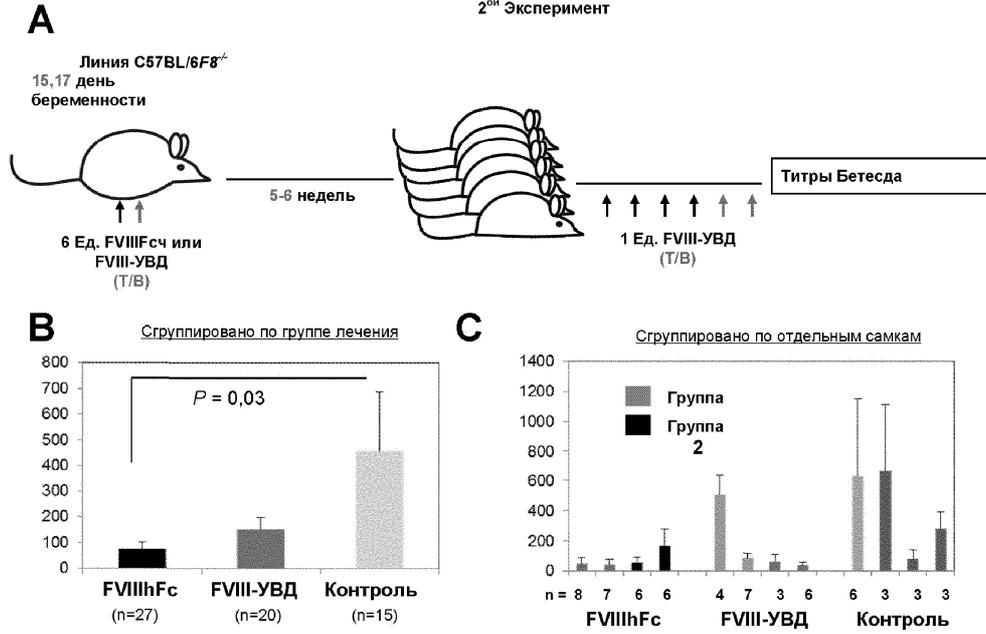
Фиг. 61

Лечение самок препаратом FVIIIhFc снижает титры ингибиторов у иммунизированного против FVIII потомства  
 1<sup>st</sup> Эксперимент

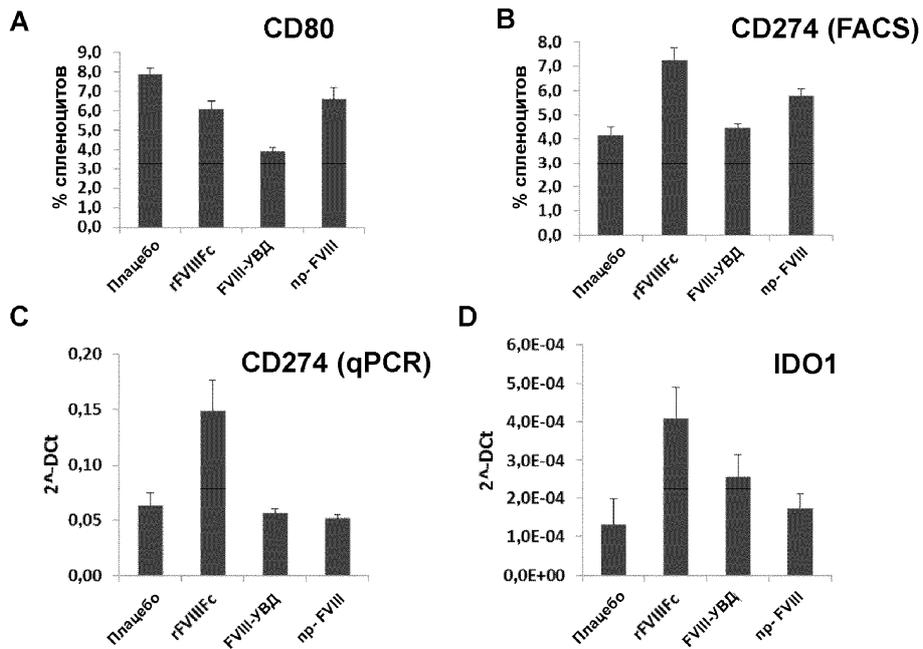


Фиг. 62

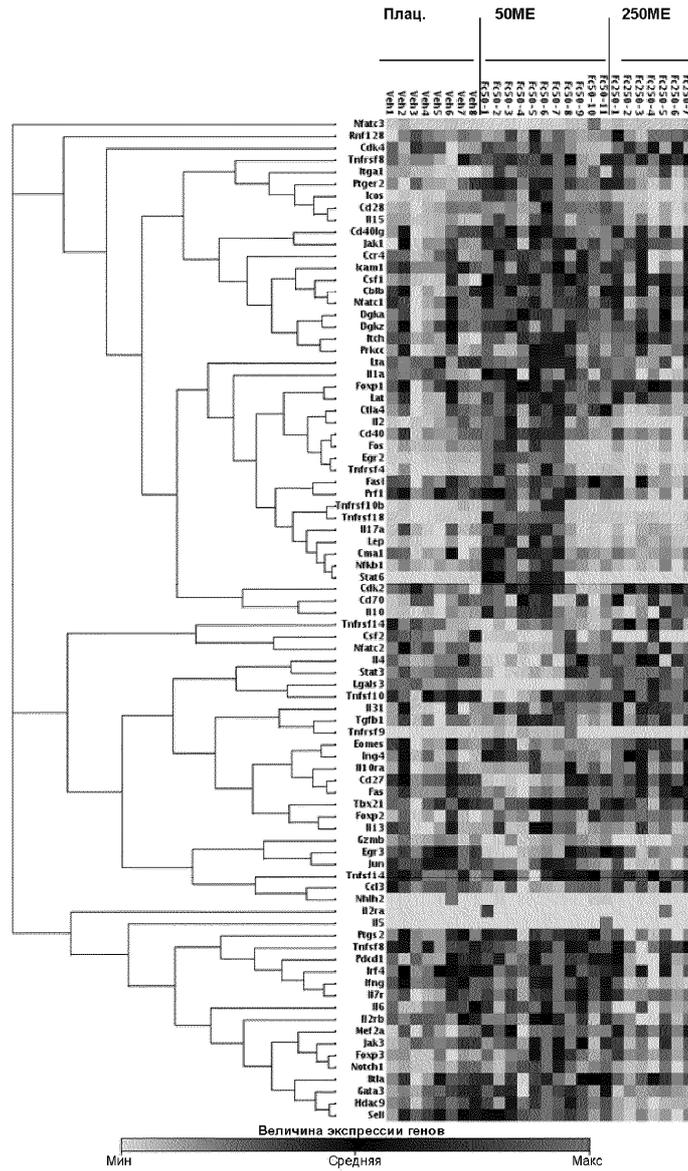
Лечение самок препаратом FVIIIhFc снижает титры ингибиторов у иммунизированного против FVIII потомства  
2<sup>ой</sup> Эксперимент



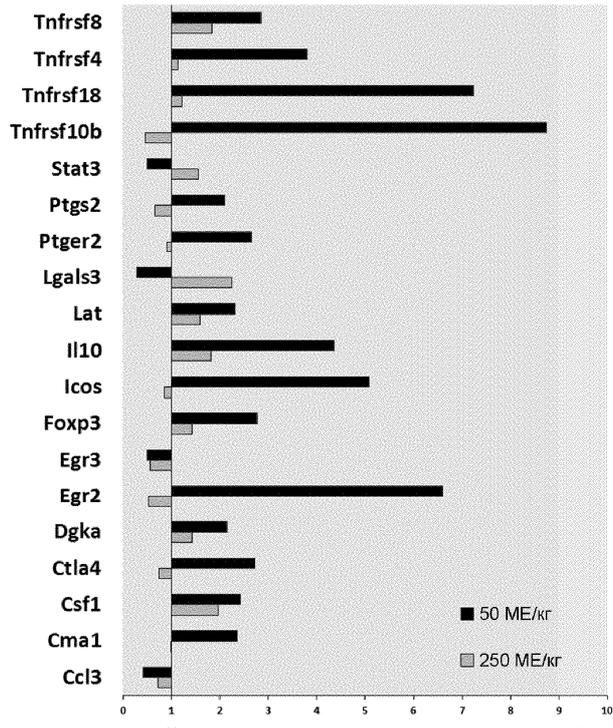
Фиг. 63



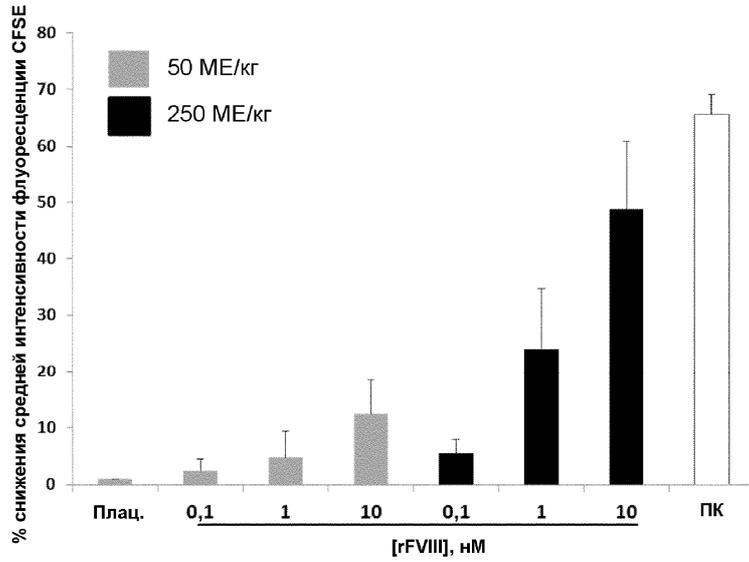
Фиг. 64



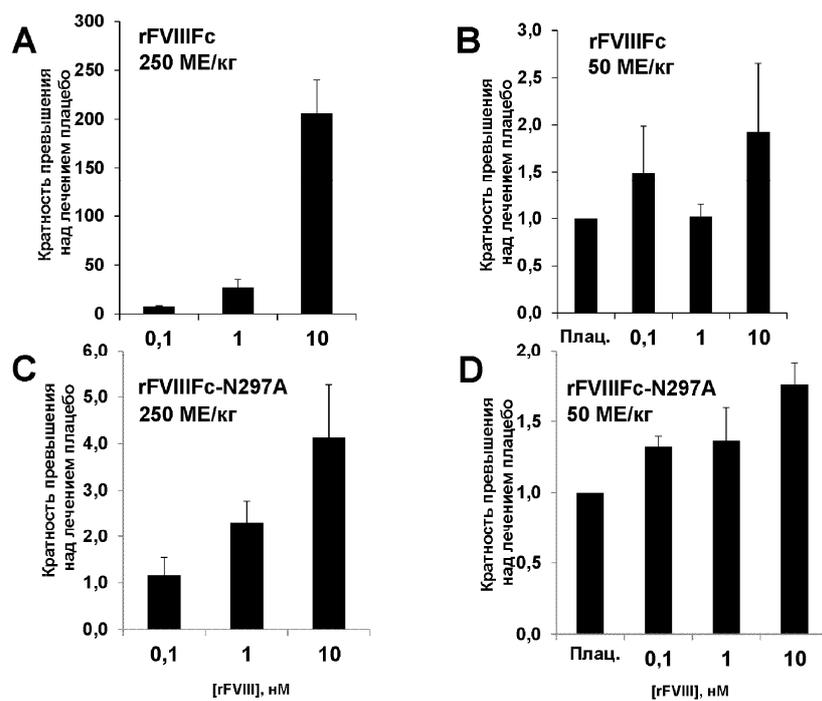
Фиг. 65



Кратность превышения над лечением плацебо  
Фиг. 66



Фиг. 67



Фиг. 68

