

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202190813** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2021.12.31

(22) Дата подачи заявки
2015.05.26

(51) Int. Cl. *C07K 14/46* (2006.01)
C07K 14/745 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

(54) **ПРОГЕМОСТАТИЧЕСКИЕ БЕЛКИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ КРОВОТЕЧЕНИЙ**

(31) **14169895.1**

(32) **2014.05.26**

(33) **EP**

(62) **201692161; 2015.05.26**

(71) Заявитель:
**АКАДЕМИШ ЗИКЕНХЕЙС ЛЕЙДЕН
(NL)**

(72) Изобретатель:

**Верхуф Даниэль, Рейтсма Питер Х.,
Бос Меттина Х.А. (NL)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к рекомбинантным полипептидам фактора свертывания Ха (F_{ха}), которые можно применять в качестве антитодов для полного или частичного обращения антикоагулянтного эффекта ингибитора свертывания крови у субъекта, предпочтительно прямого ингибитора фактора Ха. В настоящем документе раскрыты рекомбинантные белки фактора Ха и способ полного или частичного обращения антикоагулянтного эффекта ингибитора свертывания крови у субъекта.

202190813
A1

202190813

A1

ПРОГЕМОСТАТИЧЕСКИЕ БЕЛКИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ КРОВОТЕЧЕНИЙ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5 Настоящее изобретение относится к области медицинского лечения. В частности, настоящее изобретение относится к области лечения, предотвращения или облегчения осложнений в виде кровотечений, возникающих в результате измененного гемостатического ответа.

10 УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Миллионы пациентов по всему миру нуждаются в противосвертывающих лекарственных средствах (антикоагулянтах) для профилактики инсульта при фибрилляции предсердий или предотвращения и лечения тромбоза вен. Основным

15 средством профилактики традиционно являются пероральные антикоагулянты на основе кумарина, являющиеся антагонистами витамина К (VKA, АВК), такие как варфарин, аценокумарол и фенпрокумон, которые блокируют синтез факторов свертывания крови, зависящих от витамина К. Другие антикоагулянты включают мишень-специфичные антикоагулянты, такие как дабигатран, которые ингибируют

20 фермент тромбин, являющийся сериновой протеазой, превращающей растворимый фибриноген в нерастворимые нити фибрина. Эффективное обращение антикоагулянтного эффекта с использованием так называемого антидота является необходимым условием для безопасного применения лекарственного средства. Это особенно важно с учетом того, что, только в Нидерландах, ежегодно более 10 000

25 пациентов, получающих лечение антикоагулянтами, страдают от тяжелых эпизодов кровотечения, включающих до 2 000 смертельных исходов (Adriaansen H., с соавт.: «Samenvatting Medische Jaarverslagen van de Federatie van Nederlandse Trombosediensten», 2011; 1–44).

30 Доступными на данный момент парами антикоагулянт-антидот для предотвращения чрезмерного антикоагулянтного эффекта являются гепарин-протамин и варфарин-витамин К. Концентраты протромбинового комплекса (КПК, РСС), содержащие зависимые от витамина К факторы свертывания II, IX, X (трехфакторный КПК) или II, VII, IX, X (четырефакторный КПК), и различные количества белков С и S назначают

35 для обращения связанных с варфарином эффектов (см., например, Frumkin, Ann Emerg Med, 2013, 62: 616-626). Свежезамороженную плазму и рекомбинантный фактор VIIa (rfVIIa) также применяют в качестве неспецифических антидотов у пациентов с

обширной травмой или тяжелым кровотечением, получающих лечение низкомолекулярным гепарином (Lauritzen с соавт., 2005. Blood 106: Abstract 2149, 607A-608A). Также описаны фрагменты протамина (патент США № 6,624,141) и небольшие синтетические пептиды (патент США № 6,200,955) в качестве антидотов к гепарину или
5 низкомолекулярному гепарину, а также мутеины тромбина (патент США № 6,060,300) в качестве антидотов к ингибиторам тромбина. Сообщалось о промежуточных соединениях и производных протромбина в качестве антидотов к гирудину и другим ингибиторам тромбина (патенты США №№ 5,817,309 и 6,086,871). Несмотря на
10 отсутствие надежных клинических данных, связанные с дабигатраном тяжелые кровотечения обычно лечат неспецифичным препаратом обратного действия - концентратом активированного протромбинового комплекса (APCC) (Siegal с соавт., 2014. Blood 123: 1152-1158).

Разработанные недавно прямые ингибиторы фактора Ха (FXa) (DFXI), такие как
15 ривароксабан, апиксабан и эдоксабан, являются антикоагулянтами и могут в недалеком будущем в значительной степени заменить классические ингибиторы витамина К благодаря своему быстрому терапевтическому действию, простоте введения и отсутствию необходимости в мониторинге, обусловленному более слабым взаимодействием между лекарственным средством и пищей и предсказуемой
20 фармакокинетике. Прямые ингибиторы фактора Ха представляют собой низкомолекулярные ингибиторы, которые были специально разработаны для сильного связывания с фактором свертывания крови Ха и блокировки его активности. Фактор свертывания крови Ха является важнейшей сериновой протеазой, которая в норме присутствует в циркулирующей крови в виде неактивного предшественника массой ~60
25 КДа (зимогена) фактора свертывания X (FX), но после повреждения сосуда переходит в форму активной протеазы в результате сложной последовательности этапов активации белка, которая носит общее названия каскада свертывания крови. Основным для этой системы является образование комплекса кофактор-протеаза, известного как протромбиназный комплекс, который состоит из фактора свертывания
30 крови Ха, связанного с кофакторным фактором Va (FVa), который собирается только на отрицательно заряженной фосфолипидной мембране и преобразует неактивный протромбин в активную сериновую протеазу тромбин.

Основным недостатком применения прямых ингибиторов фактора Ха (DFXI) является
35 отсутствие стратегии специфичного и адекватного обращения их эффекта для предотвращения и остановки потенциальных жизнеугрожающих осложнений в виде кровотечений, связанных с их применением в антикоагулянтной терапии.

- Поскольку прямые ингибиторы фактора Ха связывают как свободный фактор свертывания крови Ха, так и связанный с протромбиназой фактор свертывания крови Ха (Европейское агентство по лекарственным средствам, 2008. отчет по оценке препарате Ксарелто (Xarelto) Комитета по лекарственным препаратам для
- 5 медицинского применения (CHMP), процедура № EMEA/H/C/000944. Номер документа: EMEA/543519/2008), для эффективного восстановления гемостаза необходима либо полная замена циркулирующего фактора свертывания крови FХа, либо эффективное удаление ингибиторных соединений из крови.
- 10 В настоящее время не существует стратегий специфичного обращения для предотвращения и остановки потенциальных жизнеугрожающих осложнений в виде кровотечений, связанных с доступной терапией с применением DFXI. Наряду с
- 15 жизнесохраняющими и хирургическими терапевтическими средствами на основании ограниченных свидетельств может рассматриваться неспецифическая обращающая терапия с применением 3-факторного и 4-факторного КПК (Siegal с соавт., 2014. Blood 123: 1152-1158; Levi с соавт., 2014. J Thrombosis Haemostatis, опубликовано онлайн 8
- 20 мая 2014г.; doi: 10.1111/jth.12599). Разрабатывается обращающая стратегия, специфичная для кровотечений, связанных с прямыми ингибиторами фактора Ха, которая основана на каталитически неактивной форме рекомбинантного FХа
- 25 (андексанет альфа), которая служит приманкой для прямых ингибиторов фактора Ха, связывая и удерживая циркулирующие прямые ингибиторы фактора Ха, обеспечивая, таким образом возможность эндогенному фактору свертывания крови Ха нормально участвовать в свертывании крови (Lu с соавт., 2013. Nature Medicine 19: 446).
- 30 Недостатком этого подхода является необходимость вводить высокие дозы андексанета альфа, обусловленная тем, что для достижения ингибирования необходимы стехиометрические концентрации (IV болюс 400мг в испытаниях III фазы; новостной релиз компании Portola, 19 марта 2014г.). Кроме того, поскольку время полужизни прямых ингибиторов фактора Ха частично зависит от почечного клиренса, количество фактора FХа-приманки, необходимое для захвата всех циркулирующих
- 35 ингибиторных молекул, при почечной недостаточности может быть еще более высоким. Эта стратегия обращения не обеспечивает быстрого и прямого прокоагулянтного ответа, поскольку ответ зависит от образования свободного эндогенного фактора свертывания крови Ха.
- 35 В настоящее время не существует доступной адекватной стратегии прямого обращения для предотвращения и остановки потенциальных жизнеугрожающих

осложнений в виде кровотечений, связанных с антикоагулянтной терапией с применением DFXI.

Настоящее изобретение решает эту задачу за счет применения в качестве адекватной
5 стратегии обращения для предотвращения и остановки потенциальных
жизнеугрожающих осложнений в виде кровотечений, связанных с антикоагулянтной
терапией с применением DFXI, рекомбинантного белка, содержащего или состоящего
из полипептида фактора свертывания крови Ха млекопитающего, предпочтительно
примата, более предпочтительно, человека, причем указанный полипептид содержит
10 изменение в области аминокислотных остатков, соответствующей области
аминокислотных остатков между Gly-289 и sp-320 последовательности SEQ ID NO: 1,
предпочтительно между Glu-297 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO:1, более
предпочтительно между Val-305 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO:1, и
наиболее предпочтительно между His-311 и Asp-320 или между His-311 и Tyr-319
15 последовательности SEQ ID NO: 1, при этом указанное изменение представляет собой
вставку и/или замену и/или делецию по меньшей мере одного аминокислотного
остатка, предпочтительно вставку по меньшей мере одного аминокислотного остатка.
В целях ясности, нумерация аминокислотных остатков основана на аминокислотной
последовательности человеческого фактора свертывания крови X, представленной в
20 SEQ ID NO: 1.

Было обнаружено, что каталитически активный человеческий фактор свертывания
крови Ха с измененным аминокислотным составом в области между Gly и Asp,
соответствующими Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1, участвует в
25 каскаде свертывания в качестве прокоагулянта и благодаря этому указанный фактор
обладает более низкой чувствительностью к ингибиторам фактора свертывания Ха,
чем фактор свертывания крови Ха без указанного изменения аминокислотного
состава. Согласно настоящему изобретению предложен прокоагулянтный антидот,
который не зависит от образования свободного, эндогенного фактора свертывания
30 крови Ха и обеспечивает стратегию прямого обращения для предотвращения и
остановки потенциальных жизнеугрожающих осложнений, связанных с
антикоагулянтной терапией с применением DFXI.

Аминокислотная последовательность человеческого фактора свертывания крови X
35 приведена как SEQ ID NO: 1 и ее можно найти в базе данных GENBANK® под номером
«AAH46125.1» по адресу <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAH46125.1>>. Нумерация
аминокислотных остатков в этой последовательности основана на

- последовательности человеческого фактора свертывания крови X (FX). Фактор свертывания крови X с последовательностью, приведенной в SEQ ID NO: 1, представляет собой предшественник, содержащий препролидерную последовательность (аминокислотные остатки с 1 по 40 последовательности SEQ ID NO: 1), за которой следуют последовательности, соответствующие легкой цепи фактора свертывания крови X (аминокислотные остатки с 41 по 179 последовательности SEQ ID NO: 1), триплет RKR (аминокислотные остатки с 180 по 182 последовательности SEQ ID NO: 1), который удаляется в ходе секреции фактора свертывания крови X, и тяжелой цепи фактора свертывания крови X (аминокислотные остатки с 183 по 488 последовательности SEQ ID NO: 1), содержащей пептид активации (AP) (аминокислотные остатки с 183 по 234 последовательности SEQ ID NO: 1) и каталитический домен с активностью сериновой протеазы (аминокислотные остатки с 235 по 488 последовательности SEQ ID NO: 1).
- 15 Созревание человеческого фактора свертывания крови X включает, среди прочего, протеолитическое расщепление и посттрансляционную модификацию в аппарате Гольджи. Зрелый белок FX представляет собой молекулу из двух цепей, состоящую из тяжелой и легкой цепей, которые связаны дисульфидной связью (Uprichard с соавт., 2002. Blood Reviews 16: 97-110). Зрелый человеческий фактор свертывания крови X активизируется в результате расщепления пептидной связи на тяжелой цепи между Arg-20 234 и Ile-235 последовательности SEQ ID NO: 1, в результате чего из тяжелой цепи фактора свертывания крови X высвобождается пептид активации из 52 остатков. Образовавшиеся связанные дисульфидной связью легкая цепь и укороченная тяжелая цепь составляют активированный полипептид FXa.
- 25 Аминокислотная последовательность легкой цепи человеческого фактора свертывания крови Xa представлена в SEQ ID NO: 2. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи человеческого фактора свертывания крови Xa представлена в SEQ ID NO: 3.
- 30 Термин «рекомбинантный» в настоящем документе относится к белку, который получают с использованием технологий рекомбинантной ДНК, известных специалистам в данной области. Рекомбинантный фактор свертывания крови X или полипептид FXa также обозначается как rFX (pFX) или rFXa (pFXa). В предпочтительном варианте рекомбинантный белок не идентичен нативному белку, 35 например, вследствие различий аминокислотного состава и/или вследствие различий в посттрансляционной модификации, такой как гликозилирование.

Термин «изменение» в настоящем документе относится к вставке и/или замене и/или делеции по меньшей мере одного аминокислотного остатка. В предпочтительном варианте указанное изменение представляет собой вставку по меньшей мере одной аминокислоты.

5

Выражение «рекомбинантный белок, содержащий полипептид фактора свертывания крови Ха» в настоящем документе охватывает белок, который содержит рекомбинантный полипептид фактора свертывания крови Ха, предпочтительно происходящий из организма млекопитающего, более предпочтительно примата, и наиболее предпочтительно человека. Это выражение включает, например, рекомбинантный белок-предшественник млекопитающего, такой как человеческий фактор свертывания крови X, который в результате процессинга и/или активации превращается в полипептид рекомбинантного фактора свертывания млекопитающего rFXa. Соответственно, в предпочтительном варианте белок согласно настоящему изобретению представляет собой рекомбинантный фактор свертывания крови X млекопитающего, предпочтительно примата, более предпочтительно человека, содержащий вставку и/или замену и/или делецию, предпочтительно вставку, по меньшей мере одного аминокислотного остатка в области аминокислотных остатков, соответствующей области аминокислотных остатков между Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1, предпочтительно между Glu-297 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO:1, более предпочтительно между Val-305 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO:1 и наиболее предпочтительно между His-311 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1. Дополнительно указанное выражение охватывает белок, который содержит одну или больше дополнительных аминокислотных последовательностей, помимо полипептида фактора свертывания rFXa, например аминокислотные последовательности, которые образуют метку, например метку FLAG, описанную в EP0150126, и/или один или больше идентифицирующих пептидов.

Соответственно, в одном варианте реализации рекомбинантный белок, содержащий полипептид фактора свертывания крови Ха согласно настоящему изобретению представляет собой полипептид фактора свертывания X, причем указанный полипептид содержит изменение в области аминокислотных остатков, соответствующей области аминокислотных остатков между Gly-289 и Asp-320, предпочтительно между His-311 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1; где указанное изменение представляет собой вставку по меньшей мере одного аминокислотного остатка.

Термин «фактор свертывания крови X» (FX) в настоящем документе относится к неактивному белку-предшественнику фактора свертывания крови X. Специалисту известно, что фактор свертывания крови X называется также препробелком FX. В
5 настоящем документе фактор свертывания крови X содержит полипептид фактора свертывания крови X_a.

Термин «зрелый фактор свертывания крови X» в настоящем документе относится к неактивному белку фактора свертывания крови X, который состоит из легкой и тяжелой
10 цепи, которые связаны с дисульфидной связью. Этот белок FX также называется препробелком фактора X (препробелком FX) или зимогеном фактора X (зимогеном FX). В настоящем документе зрелый фактор свертывания крови X содержит полипептид фактора свертывания крови X_a.

15 В предпочтительном варианте белок согласно настоящему изобретению содержит или представляет собой полипептид фактора свертывания крови X_a млекопитающего, предпочтительно примета, более предпочтительно человеческого или гуманизированный полипептид фактора свертывания крови X_a, содержащий вставку
и/или замену и/или делецию, предпочтительно вставку, по меньшей мере одного
20 аминокислотного остатка в области аминокислотных остатков, соответствующей области аминокислотных остатков между Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1.

Термин «гуманизированный» в настоящем документе относится к замене или
25 гуманизации предпочтительно внешних аминокислотных остатков белка одного вида на аминокислотные остатки, которые присутствуют в человеческом гомологе этого белка, благодаря чему белки первого вида будут неиммуногенными или менее иммуногенными при введении человеку. Замена внешних остатков в
предпочтительном варианте незначительно влияет или не влияет на внутренние
30 домены, или на междоменные контакты между легкой и тяжелой цепями. Белок согласно настоящему изобретению нечеловеческого происхождения, предпочтительно происходящий из организма млекопитающего, более предпочтительно, происходящий из организма примета, в предпочтительном варианте гуманизируют для снижения иммуногенности указанного белка в организме человека.

35 В предпочтительном варианте не являющийся человеческим белок согласно настоящему изобретению содержит гуманизированный полипептид фактора

свертывания крови Ха млекопитающего, более предпочтительно примата, поскольку ожидается, что риск антигенного ответа после введения в организм человека будет ниже, чем в случае белка согласно настоящему изобретению, содержащего негуманизированный полипептид фактора свертывания крови Ха.

5

В контексте гуманизированных белков, следует обратить внимание на способ гуманизации, применяемый для антител. В этом способе используют доступную информацию о последовательностях варьируемых доменов человеческих антител, содержащуюся в Kabat с соавт. (1987) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 10 4th ed., Bethesda, Md., National Institutes of Health, обновлениях этой базы данных и других доступных базах данных (как нуклеиновых кислот, так и белков) США и других стран. Неограничивающие примеры способов, применяемых для получения гуманизированных антител, включают EP 519596, патент США № 6,797,492 и описанные в работе Padlan с соавт., 1991. *Mol Immunol* 28: 489-498. Дополнительные 15 примеры способов гуманизации белков, не являющихся белками человека, приведены в статье Sarkar с соавт., 2012, *Journal of Lipids*, Article ID 610937, стр. 1-13, где описано, что параоксаназу 1 успешно гуманизировали путем изменения поверхности фермента для имитации последовательности человека.

20 Термин «полипептид фактора свертывания крови Ха» относится к каталитически активной форме фактора свертывания крови X. Указанный полипептид фактора свертывания крови Ха образуется в результате отщепления пептида активации от тяжелой цепи зрелого фактора свертывания крови X. Полипептид фактора свертывания крови Ха активирует протромбин, и, за счет этого, стимулирует 25 свертывание крови. В контексте настоящего изобретения белок является полипептидом фактора свертывания крови Ха, если он является прокоагулянтной сериновой протеазой, и если полная аминокислотная последовательность указанного белка содержит участки последовательных аминокислотных остатков или отдельные аминокислотные остатки, которые соответствуют участкам последовательных 30 аминокислотных остатков или отдельным аминокислотным остаткам, консервативным для факторов свертывания крови X у различных видов, как показано на фиг. 8. Например, предполагается, что прокоагулянтная сериновая протеаза, которая содержит отрезки последовательных аминокислотных остатков, которые соответствуют аминокислотным остаткам от Cys-246 до Ala-250, от Phe-260 до Leu-266 35 и/или от Asp413 до His-423 последовательности SEQ ID NO: 1, является полипептидом фактора свертывания крови Ха. Указанный полипептид фактора свертывания крови Ха в предпочтительном варианте получают путем местного и/или топического применения

рекомбинантного белка согласно настоящему изобретению. Способы определения, является ли белок сериновой протеазой, известны в данной области, и включают сравнение последовательностей и применение наборов для детектирования протеаз, например, производства Sigma-Aldrich.

5

Термин «полипептид фактора свертывания крови Ха млекопитающего» в настоящем документе относится к полипептиду фактора свертывания крови Ха, который присутствует в качестве эндогенного в организме млекопитающего, предпочтительно, примата, более предпочтительно, человека.

10

Термин «ингибитор свертывания крови» в настоящем документе относится к противосвертывающему средству - антикоагулянту. Термин «ингибитор свертывания» включает (i) агенты, такие как гепарин, которые стимулируют активность антитромбина, (ii) пероральные антикоагулянты на основе кумарина, являющиеся антагонистами витамина К, такие как варфарин, аценокумарол и фенпрокумон и (iii) прямые ингибиторы фактора X (DFXI), но не ограничивается перечисленным.

15

Термин «DFXI» в настоящем документе относится к прямым ингибиторам фактора Ха, например, пероральным прямым ингибиторам FXa. DFXI представляют собой

20

низкомолекулярные ингибиторы, которые связываются с фактором свертывания крови Ха и блокируют его активность. Группа DFXI включает следующие соединения, но не ограничивается ими: ривароксабан (5-хлор-N-[[[(5S)-2-оксо-3-[4-(3-оксо-4-

25

морфолинил)фенил]-5-оксазолидинил]метил]-2-тиофенкарбоксамид), аписабан (1-(4метоксифенил)-7-оксо-6-[4-(2-оксопиперидин-1-ил)фенил]-4,5,6,7-тетрагидро-1Н-пиразоло[3,4-с]пиридин-3-карбоксамид), эдоксабан (N'-(5-хлоропиридин-2-ил)-N-[[1S,2R,4S)-4-(диметилкарбамоил)-2-[(5-метил-6,7-дигидро-4Н-[1,3]тиазоло[5,4-с]пиридин-2-карбонил)амино]циклогексил]оксамид; 4-метилбензолсульфоновая кислота), бетриксабан (N-(5-хлоропиридин-2-ил)-2-[[4-(N,N-

30

диметилкарбамимидоил)бензоил]амино]-5-метоксибензамид), дарексабан (N-[2-[[4-(гексагидро-4-метил-1Н-1,4-дiazепин-1-ил)бензоил]амино]-3-гидроксифенил]-4-метоксибензамид), отамиксабан (метил (2R,3R)-2-[(3-карбамимидоилфенил)метил]-3-[[4-(1-оксидопиридин-1-иум-4-ил)бензоил]амино]бутаноат), эрибаксабан (2R,4R)-1-N-(4-хлорфенил)-2-N-[2-фтор-4-(2-оксопиридин-1-ил)фенил]-4-метоксипирролидин-1,2-дихлоркарбоксамид), летаксабан (1-[1-[(2S)-3-(6-хлорнафталин-2-ил)сульфонил]-2-

35

гидроксипропаноил]пиперидин-4-ил]-1,3-дiazинан-2-он, LY517717 (N-[2-[4-(1-метилпиперидин-4-ил)пиперазин-1-ил]-2-оксо-1-фенилэтил]-1Н-индол-6-карбоксамид) и 813893 (N-циклогексил-N-[2-[(4-метил-1,3-тиазол-2-ил)амино]-2-оксоэтил]фуран-2-

карбоксамид). Термины «DOAC» (прямой пероральный антикоагулянт) и «DFXI» в настоящем тексте используются взаимозаменяемо.

- 5 Термин «гомологичный» в настоящем документе относится к идентичности аминокислотной последовательности между двумя аминокислотными последовательностями, выраженной как процентная доля от полной длины этих двух аминокислотных последовательностей. Идентичность последовательностей определяют путем сравнения идентичности отдельных аминокислотных остатков аминокислотной последовательности с соответствующими аминокислотными
- 10 остатками в другой аминокислотной последовательности.
- Термин «область» в настоящем документе относится к отрезку из последовательных аминокислотных остатков, ограниченному двумя аминокислотными остатками. Нумерация аминокислотных остатков, применяемая в настоящем тексте, основана на аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.
- 15 Термин «вставка» или «встроенный» в настоящем документе относится к добавлению аминокислотных остатков в определенной области нативного полипептида фактора свертывания крови Ха, которое приводит к увеличению числа аминокислотных остатков в указанной области, по сравнению с числом аминокислотных остатков в этой
- 20 области в нативном полипептиде фактора свертывания FХа.
- Термин «замена» или «замененная» в настоящем документе относится к замене одного или более аминокислотных остатков в определенной области или в определенном сайте полипептида фактора свертывания Ха, что приводит к изменению
- 25 аминокислотной последовательности, но не числа аминокислотных остатков в указанной области. Замена является результатом удаления какого-либо аминокислотного остатка с последующей вставкой другого аминокислотного остатка в том же положении.
- 30 Термин «делеция» или «делетированный» в настоящем документе относится к делеции одного или больше аминокислотных остатков в конкретной области или в конкретном сайте полипептида фактора свертывания Ха, в результате которой число аминокислотных остатков в указанной области указанного полипептида уменьшается.
- 35 Термин «нативный полипептид фактора свертывания крови Ха» в настоящем документе относится к эндогенному полипептиду фактора свертывания крови Ха, который присутствует в природных условиях в организме животного, предпочтительно

в организме млекопитающего, более предпочтительно в организме примата, более предпочтительно в организме человека.

5 Термин «аминокислотный состав» в настоящем документе относится к аминокислотной последовательности и длине отрезка из последовательных аминокислотных остатков, где длина определяется числом аминокислотных остатков в этом отрезке.

10 Вставку, замену и/или делецию, предпочтительно вставку одного или больше аминокислотных остатков можно осуществить с использованием технологий рекомбинантной ДНК, которые хорошо известны специалистам в данной области. Например, специалист может применять технологии синтетической ДНК, ПЦР и молекулярного клонирования для получения рекомбинантных ДНК-конструктов, имеющих последовательность ДНК, которая кодирует белок согласно настоящему
15 изобретению. Подходящие средства и методы описаны в источнике Green, Sambrook, «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», CSHL Press, 2012г.

20 Выражение «соответствующий области аминокислотных остатков между», например применительно к области аминокислотных остатков, соответствующей области аминокислотных остатков между His-311 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1» в настоящем документе обозначает, что номер остатка консервативных (сохраняющихся) остатков His и Asp другого фактора свертывания крови Ха, соответствующих His-311 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1, может отличаться от номера остатка, присвоенному указанному остатку His и Asp в
25 последовательности SEQ ID NO: 1 (см. фигуру 8). Различия в номерах аминокислотных остатков могут быть обусловлены, например, различиями в методе нумерации аминокислотных остатков. Также различия в номерах аминокислотных остатков могут быть обусловлены различиями между длиной полипептида фактора свертывания крови Ха и длиной человеческого полипептида фактора свертывания крови Ха, как показано на фиг. 8. Также аминокислотные остатки Gly-289, Glu-297, Val-305 и Tyr-319, последовательности SEQ ID NO: 1 являются консервативными у полипептидов фактора свертывания крови Ха различных видов (см. фигуры 1 и 8). Соответственно, можно идентифицировать аминокислотные остатки, которые соответствуют указанным аминокислотным остаткам в другом полипептиде фактора
30 свертывания крови Ха. Соответственно, для специалиста в данной области понятно, что нумерация аминокислотных остатков, применяемая в данном документе, не ограничивает настоящее изобретение, и применяется лишь в целях ясности.

Специалисту известно, как идентифицировать область аминокислотных остатков, которая соответствует области аминокислотных остатков между указанными консервативными аминокислотными остатками последовательности SEQ ID NO: 1, 5
которые ограничивают область, описанную в настоящем документе. Если аминокислотные остатки 289-322 последовательности SEQ ID NO: 1 выровнять с соответствующими аминокислотными остатками в полипептидах фактора свертывания крови Ха различных видов, будет видно, что аминокислотные остатки в положениях 289, 297, 305, 311, 313, 314, 318, 319, 320 и 322 последовательности SEQ ID NO: 1
10 консервативны, хотя и не идентичны в полипептидах фактора свертывания крови Ха различных видов, особенно у млекопитающих, причем Asp-322 последовательности SEQ ID NO: 1 представляет собой высококонсервативный каталитический остаток (Asp-102 в нумерации для химотрипсिनогена; Bode с соавт., 1989. EMBO Journal 8: 3467-3475; Messier с соавт., 1996. Blood Coagulation and Fibrinolysis 7: 5-14 and figures 1
15 and 8).

Благодаря высококонсервативной природе аминокислотных остатков в положениях Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1 и вокруг них, или в положениях соответствующих остатков Gly и Asp нечеловеческих факторов свертывания крови Ха, 20
и вокруг них, специалист в данной области может идентифицировать область аминокислотных остатков, соответствующую области аминокислотных остатков между Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1. Этот же общий принцип справедлив для других аминокислотных остатков, которые ограничивают область, описанную в настоящем документе. Другими словами, консервативная природа
25 конкретных аминокислотных остатков является для специалиста однозначным признаком того, какие аминокислотные остатки образуют эту область.

Для специалиста в данной области понятно, что настоящее изобретение относится к аминокислотному составу области аминокислотных остатков, соответствующей 30
области аминокислотных остатков между Gly-289 и Asp-320, наиболее предпочтительно между His-311 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1. Соответственно, специалист в данной области поймет, что аминокислотная последовательность остального белка согласно настоящему изобретению может варьировать, при условии, что указанный белок остается прокоагулянтным
35 полипептидом FХа с пониженной чувствительностью к прямым ингибиторам фактора Ха или преобразуется такой полипептид в результате активации. Таким образом, указанная остальная часть белка согласно настоящему изобретению может

варьировать, как она, например, варьирует у полипептидов фактора свертывания крови X или фактора свертывания крови Xа у различных видов.

5 Количество аминокислотных остатков в области, соответствующей области между Gly-289 и Asp-320, предпочтительно между His-311 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1 консервативно среди белков фактора свертывания крови X различных видов, в частности, среди видов, принадлежащих к группе млекопитающих или к группе приматов. Эта область также присутствует в белке-зимогене FX и полипептиде FXа. Следовательно, число аминокислотных остатков также консервативно у белка-зимогена FX и полипептида FXа и в соответствующих областях белка-зимогена FX и полипептида FXа. Указанное консервативное число аминокислотных остатков в области аминокислотных остатков, соответствующей области между Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1, равно тридцати, не включая Gly-289 и Asp-320. Указанное консервативное число аминокислотных остатков в области аминокислотных остатков, соответствующей области между His-311 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1, равно восьми, не включая His-311 и Asp-320.

20 Было обнаружено, что вставка и/или замена и/или делеция, предпочтительно вставка, по меньшей мере одного аминокислотного остатка в области аминокислотных остатков, соответствующей области аминокислотных остатков между Gly-289 и Asp-320, предпочтительно между His-311 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1 в белке согласно настоящему изобретению дает каталитически активный фактор свертывания крови Xа с пониженной чувствительностью к ингибированию прямыми ингибиторами фактора Xа.

25 Было показано, что Tyr-319 человеческого FXа является остатком, координирующим DFXI (Roehrig с соавт., 2005. J Med Chem 48: 5900–5908; Pinto с соавт., 2007. J Med Chem 50: 5339–5356), а Asp-322 последовательности SEQ ID NO: 1 присутствует в каталитическом сайте с активностью сериновой протеазы (Messier с соавт., 1996. Blood Coagulation and Fibrinolysis 7: 5-14). Без ограничения теоретическим объяснением, возможно, что близость измененного аминокислотного остатка, такого как вставка по меньшей мере одного аминокислотного остатка в области между Gly-289 и Asp-320, к координирующему DFXI остатку Tyr-319 последовательности SEQ ID NO: 1, или соответствующему тирозину, и/или близость к каталитическому домену отвечает за сниженную чувствительность к DFXI. Оказывается, в области аминокислотных остатков, соответствующей области аминокислотных остатков между Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1, в белке согласно настоящему изобретению

число аминокислотных остатков и аминокислотная последовательность могут быть изменены таким образом, что это приведет к образованию каталитически активного фактора свертывания крови Ха с пониженной чувствительностью к прямым ингибиторам фактора Ха.

- 5 Указанное изменение выбирают из вставки, замены и/или делеции, и в предпочтительном варианте оно представляет собой вставку, более предпочтительно, вставку в комбинации с изменением по меньшей мере одной аминокислоты в области между Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1.
- 10 Особенно предпочтительным является белок согласно настоящему изобретению, в котором вставка содержит 1-50, предпочтительно 1-20 аминокислотных остатков. Вставка в области аминокислотных остатков, соответствующей области аминокислотных остатков между Gly-289 и Asp-320, предпочтительно между His-311 и Asp-320, последовательности SEQ ID NO: 1 в белке согласно настоящему изобретению
- 15 содержит или состоит из от 1 до 50, предпочтительно от 1 до 20, аминокислотных остатков. В предпочтительном варианте вставка содержит, или состоит из по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных остатков, что дает в целом 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 или 28, соответственно, аминокислот между His-311 и Asp-320. Особенно
- 20 предпочтительной является вставка по меньшей мере 5 аминокислотных остатков, такая как вставка 9, 12 или 13 аминокислотных остатков. Специалист в данной области поймет, что аминокислотные остатки могут быть встроены в любом положении в области аминокислотных остатков, соответствующей области аминокислотных остатков между Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1. Аминокислотный
- 25 остаток, подходящий для вставки, выбирают из группы из двадцати аминокислотных остатков, перечисленных в Таблице 1. Специалисту в данной области понятно, что указанные встроенные аминокислотные остатки могут подвергаться посттрансляционным химическим изменениям *in vivo* или *in vitro*. Как указано выше в настоящем документе, специалист в данной области сможет использовать технологии
- 30 синтеза ДНК, ПЦР и молекулярного клонирования для получения рекомбинантных ДНК-конструкций, последовательность ДНК которых кодирует белок согласно настоящему изобретению, содержащий вставку от 1 до 50 аминокислотных остатков в области аминокислотных остатков, соответствующей области между Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1.
- 35 Вставка в области аминокислотных остатков, соответствующей области аминокислотных остатков между Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1

в белке согласно настоящему изобретению в предпочтительном варианте расположена между Thr-315 и Lys-316, между Lys-316 и Glu-317, между Glu-317 и Thr-318 и/или между Thr-318 и Tyr-319 последовательности SEQ ID NO: 1 или между двумя аминокислотными остатками, соответствующими этим аминокислотным остаткам в полипептиде фактора свертывания крови Ха, не являющемся человеческим.

Особенно предпочтительным является белок согласно настоящему изобретению, в котором замена содержит 1-30, предпочтительно 1-8, более предпочтительно 6 или 7 аминокислотных остатков. Замена аминокислотных остатков в области аминокислотных остатков, соответствующей области аминокислотных остатков между Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1, в белке согласно настоящему изобретению в предпочтительном варианте содержит, или состоит из, от 1 до 30 аминокислотных остатков в области, соответствующей области аминокислотных остатков между Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1. В предпочтительном варианте указанная замена содержит, или состоит из, 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 или 30 аминокислотных остатков. В предпочтительном варианте консервативные аминокислотные остатки, такие как, например, Glu-297, Val-305 и/или His-311, показанные SEQ ID No:1, не подвергаются замене. Особенно предпочтительной является замена 6 или 7 аминокислотных остатков.

В предпочтительном варианте аминокислотный остаток, присутствующий в области, соответствующей области аминокислотных остатков между Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1, белка согласно настоящему изобретению заменяют любым из аминокислотных остатков, перечисленных в Таблице 1, предпочтительно аминокислотой из той же группы в соответствии с колонками «полярность боковой цепи» и «заряд боковой цепи» в Таблице 1. В предпочтительном варианте один или больше из Asn-312, Arg-313, Phe-314, Thr-315, Lys-316, Glu-317, Thr-318 и Tyr-319 последовательности SEQ ID NO: 1 или соответствующих и аминокислотных остатков в не являющемся человеческим белке согласно настоящему изобретению, заменяют на любой из аминокислотных остатков, приведенных в Таблице 1. Asn-312 последовательности SEQ ID NO: 1 в предпочтительном варианте заменен на остаток Thr или Lys. Arg-313 в предпочтительном варианте заменен на аминокислотный остаток с основной полярностью и положительно заряженной боковой цепью (см. Таблицу 1), более предпочтительно на остаток Lys. Аминокислотный остаток Thr-315 в предпочтительном варианте заменен на полярный аминокислотный остаток с нейтральной боковой цепью, более предпочтительно на остаток Val. Lys-316

последовательности SEQ ID NO: 1 в предпочтительном варианте заменен на остаток Pro. Glu-317 последовательности SEQ ID NO: 1 в предпочтительном варианте заменен на остаток Val. Thr-318 в предпочтительном варианте заменен на полярный аминокислотный остаток с нейтральной боковой цепью, более предпочтительно на остаток Ser или Ala.

Замена аминокислотных остатков в области аминокислотных остатков, соответствующей области аминокислотных остатков между Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1 в белке согласно настоящему изобретению в предпочтительном варианте содержит, или состоит из по меньшей мере двух аминокислотных остатков. Настоящее изобретение предусматривает любую комбинацию по меньшей мере двух аминокислотных остатков, например, замену Asn-312 последовательности SEQ ID NO: 1 и Lys-316 последовательности SEQ ID NO: 1 остатком Pro и остатком Ala, соответственно, или замену Asn-312, Arg-313, Thr-315, Lys-316, Glu-317, Thr-318 и Tyr-319 последовательности SEQ ID NO: 1 одним из аминокислотных остатков, перечисленных в Таблице 1. Особенно предпочтительным является белок согласно настоящему изобретению, содержащий замену (i) Asn-312, (ii) Arg-313, (iii) Thr-315, (iv) Lys-316, (v) Glu-317 и (vi) Thr-318 последовательности SEQ ID NO: 1 на (i) остаток Thr или Pro, (ii) остаток Lys, (iii) остаток Val, (iv) остаток Pro, (v) остаток Val и (vi) остаток Ser или Ala, соответственно.

Специалисту в данной области понятно, что в случае замены аминокислотных остатков в области аминокислотных остатков, соответствующей области между Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1 не являющегося человеческого белка согласно настоящему изобретению, заменяют только те аминокислотные остатки, которые до этого еще не присутствовали в предпочтительном белке согласно настоящему изобретению. Специалисту в данной области будет понятно, что вышеупомянутая отсылка к SEQ ID NO: 1 сделана исключительно в качестве примера замены аминокислотных остатков в указанной области аминокислотных остатков. Благодаря этому он будет знать, каким или какими аминокислотными остатками он может заменить другой аминокислотный остаток или остатки в не являющемся человеческим факторе свертывания крови Ха.

Белок согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать делецию по меньшей мере одного аминокислотного остатка в области аминокислотных остатков, соответствующей области аминокислотных остатков между Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO:1. Особенно предпочтительным является белок

согласно настоящему изобретению, содержащий делецию по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20 или 30 аминокислотных остатков.

- Предпочтительный белок согласно настоящему изобретению содержит комбинацию вставки и замены или комбинацию вставки, замены и/или делеции. Вставки и делеции могут присутствовать независимо друг от друга и возможны варианты, когда, например, вставка 5 аминокислотных остатков и делеция 5 аминокислот присутствуют в различных положениях аминокислот в области аминокислотных остатков, соответствующей области аминокислотных остатков между Gly-289 и Asp-320
- 5 последовательности SEQ ID NO: 1, и при этом общее число аминокислотных остатков в факторе свертывания крови X не изменяется. Специалисту понятно, что вставка или делеция изменяют нумерацию аминокислотных остатков в белке. С точки зрения удобства оценки того, где расположено изменение и в чем заключается это изменение, специалист может осуществить несколько выравниваний аминокислотных
- 10 последовательностей различных белков фактора свертывания крови X, как показано на фиг. 8. На основании этих выравниваний специалист сможет определить, какие аминокислотные остатки изменены. Специалист может использовать консервативные аминокислотные остатки, например, Glu-297, Val-305 и/или His-311 в качестве маркеров для оценки номера аминокислотного остатка, который был изменен.
- 15
- Особенно предпочтительным является белок согласно настоящему изобретению, в котором вставка содержит 1-50, предпочтительно 1-20, аминокислотных остатков, и в котором замена содержит 1-7, предпочтительно 6 аминокислотных остатков.
- Указанный предпочтительный белок содержит вставку от 1 до 50, предпочтительно от
- 20 1 до 20 аминокислотных остатков в комбинации с заменой от 1 до 8, предпочтительно 6 или 7 аминокислотных остатков в области аминокислотных остатков, соответствующей области аминокислотных остатков между Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1
- 25
- Более предпочтительный белок согласно настоящему изобретению содержит вставку по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислотных остатков и замену по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислотных остатков в области аминокислотных остатков, соответствующей области аминокислотных остатков между Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ
- 30 ID NO: 1, что означает, что вставку по меньшей мере 1-20 аминокислотных остатков комбинируют с заменой по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 аминокислотных остатков. Настоящее изобретение относится ко всем возможным комбинациям
- 35

вышеупомянутых вставок и замен. Особенно предпочтительным является белок, содержащий вставку 12-13 аминокислотных остатков и замену 6 аминокислотных остатков в области аминокислотных остатков, соответствующей области аминокислотных остатков между Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1.

5

В наиболее предпочтительном варианте белок согласно настоящему изобретению содержит область аминокислотных остатков, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11 между аминокислотными остатками, соответствующими аминокислотным остаткам His-311 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1.

10

Кроме того, изменение Arg-366, Glu-369, Phe-396, Asp-413, Ala-414, Cys-415, Gln-416, Ser-419, Val-437, Ser-438, Trp-439, Gly-440, Glu-441, Gly-442, Cys-443, Gly-450, Ile-451 и Tyr-452 последовательности SEQ ID NO:1 вероятно ведет к образованию белка, нечувствительного к DFXI. Без ограничения теоретическим обоснованием, Arg-366, Glu-369, Phe-396, Asp-413, Ala-414, Cys-415, Gln-416, Ser-419, Val-437, Ser-438, Trp-439, Gly-440, Glu-441, Gly-442, Cys-443, Gly-450, Ile-451 и Tyr-452 последовательности SEQ ID NO: 1 вероятно являются остатками, координирующими прямые ингибиторы фактора Ха. Литературные данные косвенно подтверждают эту точку зрения,

15

поскольку они демонстрируют, что по меньшей мере некоторые из этих остатков участвуют в связывании DFXI (Roehrig с соавт., 2005. J Med Chem 48: 5900–5908; Pinto с соавт., 2007. J Med Chem 50: 5339–5356). Белок согласно настоящему изобретению в предпочтительном варианте содержит замену или делецию аминокислотного остатка, соответствующего Arg-366, Glu-369, Phe-396, Asp-413, Ala-414, Cys-415, Gln-416, Ser-419, Val-437, Ser-438, Trp-439, Gly-440, Glu-441, Gly-442, Cys-443, Gly-450, Ile-451 или Tyr-452 последовательности SEQ ID NO:1. Аминокислотные остатки Arg-366, Glu-369, Phe-396, Asp-413, Ala-414, Cys-415, Gln-416, Ser-419, Val-437, Ser-438, Trp-439, Gly-440, Glu-441, Gly-442, Cys-443, Gly-450, Ile-451 и/или Tyr-452 последовательности SEQ ID NO:1 последовательности SEQ ID NO:1, или соответствующие аминокислотные

20

25

30

остатки в родственном белке в предпочтительном варианте заменены на любой один аминокислотный остаток, приведенный в Таблице 1. Также белок согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит вставку по меньшей мере одного аминокислотного остатка, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 аминокислотных остатков в области аминокислотных остатков, соответствующей области между аминокислотными остатками, расположенными на расстоянии 15 аминокислотных остатков в направлении N-конца и 15 аминокислотных остатков в направлении C-конца от Arg-366, Glu-369, Phe-396, Asp-413, Ala-414, Cys-

35

415, Gln-416, Ser-419, Val-437, Ser-438, Trp-439, Gly-440, Glu-441, Gly-442, Cys-443, Gly-450, Ile-451 и/или Tyr-452. Указанное изменение Phe-396, Arg-366, Glu-369, Asp-413, Ala-414, Cys-415, Gln-416, Ser-419, Val-437, Ser-438, Trp-439, Gly-440, Glu-441, Gly-442, Cys-443, Gly-450, Ile-451 и/или Tyr-452 последовательности SEQ ID NO:1. В

- 5 предпочтительном варианте указанную вставку в области, указанной в этом абзаце, комбинируют с изменением в области между Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1, определенным выше.

- 10 Настоящее изобретение также охватывает белки, которые по существу гомологичны белку согласно настоящему изобретению и биологически эквивалентны ему. В предпочтительном варианте белок согласно настоящему изобретению имеет аминокислотную последовательность, которая более чем на 60%, предпочтительно более чем на 70%, более предпочтительно более чем на 80% и наиболее предпочтительно более чем на 90% гомологична последовательности SEQ ID NO: 1,
- 15 или его каталитически активированную форму, где указанный белок является каталитически активным (прокоагулянт) или становится каталитически активным после процессинга/активации, и обладает пониженной чувствительностью к прямым ингибиторам фактора свертывания Ха (DFXI), предпочтительно к DFXI, выбранному из группы, состоящей из ривароксабана, аписабана, эдоксабана и бетриксабана.
- 20 Специалисту в данной области известно, каким образом препробелок или пробелок фактора свертывания крови X преобразуется в его каталитически активную форму. В базе данных UniProt под номером доступа P00742 приведен обзор процессинга человеческого фактора свертывания крови X с образованием активированного человеческого фактора свертывания крови Ха. Соответственно, специалист сможет
- 25 определить, какие аминокислотные остатки присутствуют или отсутствуют в факторе свертывания крови Ха.

- Термин «сниженная чувствительность к прямым ингибиторам фактора свертывания Ха (DFXI)» в контексте настоящего изобретения относится к концентрации DFXI,
- 30 необходимой для обеспечения 50% максимального ингибирования (K_i), которая выше для полипептида согласно настоящему изобретению, чем для нативного фактора свертывания крови Ха, причем в предпочтительном варианте указанный нативный фактор свертывания крови Ха выделен из плазмы крови или получен рекомбинантным путем. В предпочтительном варианте K_i прямого ингибитора фактора свертывания Ха
- 35 (DFXI) измеряют путем предварительной инкубации белка согласно настоящему изобретению с 0,001 до 100 мкМ DFXI с последующим приведением эксперимента, в котором измеряют каталитическую активность в отношении Spectrozyme Ха (Sekisui

- Diagnostics; Stamford, CT, США) по превращению пептидил-субстрата. В предпочтительном варианте K_i белка согласно настоящему изобретению повышена более чем в 2 раза, более предпочтительно повышена в от 50 до 100 раз, и наиболее предпочтительно повышена в более чем 100 раз по сравнению с K_i указанного
- 5 нативного фактора свертывания крови Ха без изменения по меньшей мере одного аминокислотного остатка в области аминокислотных остатков, соответствующей области аминокислотных остатков между Gly-298 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1.
- 10 Неожиданно было обнаружено, что белок согласно настоящему изобретению обладает повышенной аффинностью связывания в отношении фактора свертывания FVa – партнера фактора свертывания крови Ха по связыванию в протромбиназном комплексе, по сравнению с аффинностью связывания нативного фактора свертывания
- 15 человеческого или гуманизированного белка согласно настоящему изобретению в отношении FVa по меньшей мере в два раза выше, чем аффинность связывания нативного человеческого FXa в отношении FVa.
- Методы анализа для определения аффинности связывания известны в данной
- 20 области, например, основанные на применении партнера по связыванию (такого как FVa или FXa) с радиоактивной меткой. Количество радиации, испускаемое после связывания, можно применять для расчета аффинности связывания. Также можно применять нерадиоактивные методы, такие как поверхностный плазмонный резонанс и двойная поляризационная интерферометрия, для измерения аффинности связывания
- 25 по анализам, основанным на концентрации, а также по кинетике ассоциации и диссоциации и, в последнем случае, конформационным изменениям после связывания. Недавно был разработан метод микромасштабного термофореза (Microscale Thermophoresis, MST) без иммобилизации, который обеспечивает возможность определения аффинности связывания между двумя белками (Wienken с
- 30 соавт., 2010. Nature Communications 1: 100). В предпочтительном варианте аффинность комплекса факторов свертывания FVa-FXa определяют по кинетике протромбина или преобразованию производных протромбина (претромбина-1, претромбина-2) (Bos с соавт., 2009. Blood 114: 686-692), измеряемых по интенсивности флуоресценции/анизотропии (Bos et al, 2012. J Biol Chem 287: 26342-51) или методом
- 35 изометрической калориметрии титрования (ITC). Согласно настоящему изобретению также предложена молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность ДНК, которая кодирует белок согласно настоящему

изобретению. Специалисту в данной области понятно, как получить последовательность ДНК, которая кодирует аминокислотную последовательность белка согласно настоящему изобретению, и как получить и выделить молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую указанную последовательность ДНК, с применением общеизвестных технологий рекомбинантной ДНК. В предпочтительном варианте последовательность молекулы нуклеиновой кислоты подвергают кодон-оптимизации для экспрессии в клетке-хозяине согласно настоящему изобретению. В этом случае используют кодоны, которые способствуют высоким уровням экспрессии в конкретной клетке-хозяине.

10

Согласно настоящему изобретению также предложен вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению.

15

В предпочтительном варианте молекулы нуклеиновой кислоты встраивают в вектор экспрессии с использованием методик рекомбинантной ДНК, известных специалистам в данной области. Векторы экспрессии в контексте настоящего изобретения относятся к экспрессии белка согласно настоящему изобретению в клетке-хозяине. В

20

предпочтительном варианте эти векторы-экспрессии реплицируются в клетке-хозяине, либо в виде эписом, либо в виде части хромосомной ДНК. Далее, в случае экспрессии белка в эукариотических клетках вектор экспрессии предпочтительно содержит (i) сильный промотор/энхансер, такой как промотор цитомегаловируса (CMV) или промотор SV40, (ii) оптимальную последовательность инициации трансляции, такую как сайт связывания рибосомы и старт-кодон, предпочтительно консенсусную последовательность KOZAK, и (iii) последовательность терминации транскрипции,

25

включая сигнальную последовательность поли(А). Подходящие векторы экспрессии включают плазмиды и вирусные векторы, такие как аденовирусы, аденоассоциированные вирусы и ретровирусы. Специалист в данной области поймет, что применяемый вектор экспрессии зависит от клетки-хозяина, применяемой для экспрессии рекомбинантного белка. В предпочтительном варианте вектор экспрессии

30

согласно настоящему изобретению подходит для экспрессии молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению в прокариотической клетке, включая бактериальную клетку, или, в более предпочтительном варианте, в эукариотической клетке-хозяине, такой как клетка дрожжей и клетка млекопитающего. Особенно предпочтительным является вектор экспрессии для экспрессии в клетках

35

млекопитающих рCMV4.

В альтернативном варианте молекула нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению может быть встроена в геном клетки-хозяина. Указанная вставка

предпочтительно находится в локусе или в области, которая обеспечивает экспрессию молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению в клетке-хозяине.

5 Согласно настоящему изобретению также предложена клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению. В предпочтительном варианте осуществления согласно настоящему изобретению предложена клетка-хозяин, экспрессирующая молекулу нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению, в результате чего продуцируется белок согласно настоящему изобретению. Указанный белок продуцируется либо внутри клетки-хозяина, либо, в предпочтительном варианте, секретируется из клетки-хозяина.

15 Подходящие клетки-хозяева для применения в настоящем изобретении включают прокариотические и эукариотические клетки, такие как клетки бактерий, клетки дрожжей, клетки насекомых, клетки животных, клетки млекопитающих, клетки мыши, клетки крысы, клетки овцы, клетки обезьяны и клетки человека. Примеры подходящих эукариотических клеток включают следующие, но не ограничиваются ими: клетки НЕК 293, линии клеток хомяка CHO и ВНК-21, мышинные клетки-хозяева NIH3T3, NSO и C127, клетки-хозяева обезьяны COS и Vero. и человеческие клетки-хозяева HeLa, PER.C6, U-937 и Hep G2. Подходящие клетки можно достать в общедоступных источниках, таких как Американская коллекция типовых культур (ATCC) и Life Technologies. В данной области известен ряд методик трансфекции, см., например, Graham с соавт., 1973. *Virology* 52: 456, Green с соавт., 2012. «Molecular Cloning: A Laboratory Manual», CSHL Press, Davis с соавт., «Basic Methods in Molecular Biology», 1986, Elsevier и Chu с соавт., 1981. *Gene* 13: 197. В предпочтительном варианте 25 специалисты в данной области применяют методики, описанные в этих источниках для введения одной или более эндогенных молекул нуклеиновой кислоты в подходящие клетки-хозяева.

30 Особенно предпочтительной клеткой-хозяином для получения белка согласно настоящему изобретению является клетка НЕК 293.

35 Согласно настоящему изобретению также предложена фармацевтическая композиция, содержащая белок согласно настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество. В предпочтительном варианте фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению содержит один или более разбавителей, наполнителей, солей, буферов, стабилизаторов, солюбилизаторов и других материалов, известных в

данной области. Как известно специалистам, характеристики носителя будут зависеть от пути введения. Для снижения потенциального риска тромбообразования при введении сериновой протеазы FXa фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению в предпочтительном варианте содержит белок согласно
5 настоящему изобретению, который после введения субъекту инактивируется.

Термин «субъект» относится к группе млекопитающих, предпочтительно людям.

Термин «фармацевтическая композиция» в контексте настоящего изобретения
10 относится к комбинации белка согласно настоящему изобретению с носителем, инертным или активным, который делает композицию подходящей для терапевтического применения *in vivo* или *ex vivo*.

Термин «фармацевтически приемлемый» в настоящем документе относится к
15 нетоксичному материалу, который совместим с физическими и химическими характеристиками белка согласно настоящему изобретению и не снижает эффективность биологического действия указанного белка.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть
20 приспособлена для введения композиции энтеральным путем, при котором композиция всасывается через пищеварительный тракт, например, путем перорального проглатывания или ректального введения. Указанные композиции в предпочтительном варианте инкапсулированы, например, с использованием липосом, для предотвращения протеолитического расщепления.

25 Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению в предпочтительном варианте применяют местно, например, на или в ране или в кровеносном сосуде, предпочтительно, артерии, которая снабжает кровью область раны. Указанное местное введение представляет собой топическое введение,
30 например, в форме крема, пенки, геля, лосьона или мази, или парентеральное введение, например, путем инъекции или вливания, для получения местного или системного терапевтического эффекта. Топическое введение белка согласно настоящему изобретению для получения местного эффекта снижает риск возможного системного тромбообразования.

35 Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению, предпочтительно содержащую фактор свертывания крови X или зрелый фактор свертывания крови X,

который содержит измененный полипептид фактора свертывания Ха, в предпочтительном варианте вводят системно, предпочтительно парентеральным путем. Системное введение неактивного препробелка или неактивного пробелка приводит к образованию активного протромбиназного комплекса, который состоит из фактора свертывания крови Ха, связанного с FVa, на отрицательно заряженных фосфолипидных мембранах, где он превращает неактивный протромбин в активную сериновую протеазу тромбин.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению в предпочтительном варианте приспособлена для парентерального введения, при котором композицию вводят внутривенно, внутриартериально, подкожно и/или внутримышечно. Парентеральное введение включает введение фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению путем инъекции или вливания в ткань тела или физиологическую жидкость, для чего предпочтительно применять шприц, иглу или катетер. В альтернативном варианте в качестве средства парентерального введения может применяться введение под высоким давлением без применения игл. Для инъеклируемых композиций (например, композиций для внутривенного введения), носитель может представлять собой водный или масляный раствор, дисперсию, эмульсию и/или суспензию. В предпочтительном варианте носитель представляет собой водный раствор, предпочтительно дистиллированную стерильную воду, солевой раствор, буферный солевой раствор или другое фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество для инъекций.

В предпочтительном варианте фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению применяют в различных терапевтических приложениях. Например, фармацевтическую композицию можно применять в качестве препарата шунтирующего действия в лечении или облегчении нарушений, при которых нарушено нормальное свертывание крови, таких как гемофилия А и В, в том числе в группах пациентов с ингибиторной гемофилией А или при дефиците фактора X.

Согласно настоящему изобретению также предложен белок согласно настоящему изобретению или фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению для применения в способе полного или частичного обращения антикоагулянтного эффекта ингибитора свертывания крови у субъекта.

35

Термин «антикоагулянтное действие» относится к терапевтическому действию, такому как предотвращение свертывания крови, которое является результатом действия ингибиторов свертывания крови.

- 5 Согласно настоящему изобретению также предложено применение белка согласно настоящему изобретению для изготовления лекарственного средства для полного или частичного обращения антикоагулянтного эффекта ингибитора свертывания крови у субъекта.
- 10 В предпочтительном варианте ингибитор свертывания крови представляет собой прямой ингибитор фактор Ха (DFXI), более предпочтительно прямой ингибитор FXa, выбранный из группы, состоящей из ривароксабана (5-хлор-N-[[[(5S)-2-оксо-3-[4-(3-оксо-4-морфолинил)фенил]-5-оксазолидинил]метил]-2-тиофенкарбоксамид], аписабана (1-(4-метоксифенил)-7-оксо-6-[4-(2-оксопиперидин-1-ил)фенил]-4,5,6,7-тетрагидро-1H-пиразоло[3,4-с]пиридин-3-карбоксамид), эдоксабана (N'-(5-хлоропиридин-2-ил)-N-[(1S,2R,4S)-4-(диметилкарбамоил)-2-[(5-метил-6,7-дигидро-4H-[1,3]тиазоло[5,4-с]пиридин-2-карбонил)амино]циклогексил]оксамид, 4-метилбензолсульфоновой кислоты) и/или бетриксабана (N-(5-хлоропиридин-2-ил)-2-[[4-(N,N-диметилкарбамимидоил)бензоил]амино]-5-метоксибензамида).
- 20 Далее согласно настоящему изобретению предложен способ полного или частичного обращения антикоагулянтного эффекта ингибитора свертывания крови у субъекта, причем указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества белка согласно настоящему изобретению или
- 25 фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению. В предпочтительном варианте способ согласно настоящему изобретению применяют для предотвращения или облегчения осложнений в виде кровотечений, которые связаны с антикоагулянтной терапией.
- 30 Термин «терапевтически эффективное количество» в настоящем документе означает, что количество активного ингредиента, содержащееся в фармацевтической композиции для введения, имеет достаточное значение для достижения предполагаемой цели, такой как, в данном случае, полностью или частично обратить антикоагулянтное действие ингибитора свертывания крови. В предпочтительном
- 35 варианте количество активного ингредиента, т.е. белка согласно настоящему изобретению в фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению лежит в диапазоне от приблизительно 50 мг до приблизительно 600 мг. В

предпочтительном варианте фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят только однократно, дважды или три раза, предпочтительно только однократно, субъекту, нуждающемуся в полном или частичном обращении антикоагулянтного эффекта ингибитора свертывания крови.

5

Для целей ясности и точности описания признаки описаны в настоящем документе в составе одного или разных вариантов осуществления; однако подразумевается, что объем настоящего изобретения может включать варианты реализации, содержащие комбинации всех или некоторых описанных признаков.

10

SEQ ID NO: 1 (белок человеческого фактора свертывания X)

1 mgrplhivll saslaglll geslfirreq annilarvtr ansfleemkk ghlerecmee
 61 tcsyeearev fedsdktnef wnkykdgdqc etspcqnqgk ckdglgeytc tclegfegkn
 121 celfrklcs ldngdcdqfc heeqnsvvcs cargytladn gkaciptgpy pcgkqtlerr
 181 krsvaqatss sgeapdsitw kpydaadldp tenpfdlldf nqtqpergdn nltrivggqe
 241 ckdgecpwqa llineenegf cggtilsefy iltaahclyq akrfkvrvgd rnteqeegge
 301 avhevevvik hnrftketyd fdiavlrlkt pitfrmnvap aclperdwae stlmtqktgi
 361 vsqfgrthek grqstrklml evpyvdrnsc klsssfliitq nmfcagydtk qedacqgdsg
 421 gphvtrfkdt yfvtagivswg egcarkgkyg iytkvtaflk widrsmktrg lpkakshape
 481 vitssplk

20

SEQ ID NO: 2 (легкая цепь человеческого фактора свертывания X_a)

25 1 ansfleemkk ghlerecmee tcsyeearev fedsdktnef wnkykdgdqc etspcqnqgk
 61 ckdglgeytc tclegfegkn celfrklcs ldngdcdqfc heeqnsvvcs cargytladn
 121 gkaciptgpy pcgkqtlerr 139

SEQ ID No: 3 (тяжелая цепь человеческого фактора свертывания X_a)

30

1 ivggqeckdg ecpwqallin eenegfcggt ilsefyilta ahclyqakrf kvrvgdrnte
 61 qeeggeavhe vevvikhrf tketydfdia vlrlktpitf rmnvapacp erdwaestlm
 121 tqktgivsgf grthekgrqs trlkmlevpy vdrnscklss sfiitqnmfc agydtkqeda
 181 cqgdsggphv trfkdyfvt givswgegca rkgkygiytk vtaflkwidr smktrglpka
 241 kshapevits splk

35

SEQ ID NO: 4

1 tkfvppnyyyvhqndrvay

SEQ ID NO: 5

5 1 kkfvppkksqefyekfdlvsy

SEQ ID NO: 6 (ген человеческого фактора свертывания крови X; 1-1473 п.о.)

atggcgacgtccgaggctgcagctgcctggctgcctggccctggctgcctgtgtagccttgtgcacagccagcatgtgttctg
 10 gctcctcagcaagcacggtcgctgctccagcgggtccggcgagccaattcctttctgaagagatgaagaaaggacacctcgaa
 agagagtgcattggaagagacctgctcatacgaagaggcccgcgaggtctttgaggacagcgaagacgaatgaattctgga
 ataaatacaaagatggcgaccagtgtgagaccagtccctgccaagaaccagggcaaatgtaaagacggcctcggggaatacac
 ctgcacctgtttagaaggattcgaaggcaaaaactgtgaattattcacacggaagctctgcagcctggacaacggggactgtgac
 cagttctgccacgaggaacagaactctgtggtgtgctcctgcgcccgcgggtacaccctggctgacaacggcaaggcctgcatt
 15 cccacagggccctaccctgtgggaaacagaccctggaacgcaggaagaggtcagtgcccaggccaccagcagcagcg
 gggaggcccctgacagcatcacatggaagccatatgatgcagccgacctggaccccaccgagaaccccttcgacctgttgac
 ttcaaccagacgcagcctgagagggcgacaacaacctcacgcgtatcgtgggaggccaggaatgaaggacggggagtgt
 ccctggcagggccctgctcatcaatgaggaaaacgagggttctgtggtggaactattctgagcaggttctacatcctaacggcagc
 ccactgtctctaccaagcaagagattcaagtgagggtaggtgaccggaacacggagcaggaggaggcgggtgaggcggt
 20 gcacgaggtggaggtggtcatcaagcacaaccggttcacaaaggagacctatgacttcgacatcgccgtgctccggctcaaga
 cccccatcacctccgcatgaacgtggcgctgcctgctccccgagcgtgactgggcccaggtccacgctgatgacgcagaag
 acggggattgtgagcggctcgggcgacccacgagaaggccggcagtcaccaggctcaagatgctggagggtgccttacg
 tggaccgcaacagctgcaagctgtccagcagcttcatcatcaccagaacatgttctgtgccggctacgacaccaagcaggag
 gatgcctgccagggggacagcggggcccgcacgtcaccgcttaaggacacactctctgtgacaggcatcgctcagctggg
 25 gagagggtgtgccgtaaggggaagtacgggatctacaccaaggtcaccgcttctcaagtgatcgacaggtccatgaaa
 accaggggctgcccaggccaagagccatgccccggaggtcataacgtccttccattgaaa

SEQ ID NO: 7 (последовательность ДНК модифицированного человеческого фактора X
 типа A; 1-1509 п.о.)

Atggcgacgtccgaggctgcagctgcctggctgcctggccctggctgcctgtgtagccttgtgcacagccagcatgtgttctg
 30 gctcctcagcaagcacggtcgctgctccagcgggtccggcgagccaattcctttctgaagagatgaagaaaggacacctcgaa
 agagagtgcattggaagagacctgctcatacgaagaggcccgcgaggtctttgaggacagcgaagacgaatgaattctgga
 ataaatacaaagatggcgaccagtgtgagaccagtccctgccaagaaccagggcaaatgtaaagacggcctcggggaatacac
 35 ctgcacctgtttagaaggattcgaaggcaaaaactgtgaa.ttattcacacggaagctctgcagcctggacaacggggactgtga
 ccagttctgccacgaggaacagaactctgtggtgtgctcctgcgcccgcgggtacaccctggctgacaacggcaaggcctgcatt
 tcccacagggccctaccctgtgggaaacagaccctggaacgcaggaagaggtcagtgcccaggccaccagcagcagcg

gggaggcccctgacagcatcacatggaagccatatgatgcagccgacctggaccccaccgagaacccttcgacctgttgac
 ttcaaccagacgcagcctgagaggggcgacaacaacctcacgcgatcgtgggaggccaggaatgcaaggacggggagtgt
 ccctggcaggccctgctcatcaatgaggaaaacgagggtttctgtggtggaactattctgagcgagttctacatcctaacggcagc
 ccactgtctctaccaagccaagagattcaaggtgagggtaggtgaccggaacacggagcaggaggagggcggtgaggcggt
 5 gcacgaggtggaggtggtcatcaagcacaccaagttcgtgccccctaactactattacgtccaccagaattttgaccgggt
ggccatgacttcgacatcgccgtgctccggctcaagacccccatcaccttccgcatgaacgtggcgctgcctgcctccccgag
 cgtgactgggcccaggtccacgctgatgacgcagaagacggggattgtgagcggcttcgggcgacccacgagaagggccgg
 cagtcaccaggctcaagatgctggaggtgcctacgtggaccgcaacagctgcaagctgtccagcagcttcatcatccccag
 aacatgttctgtccggctacgacaccaagcaggaggatgctgccagggggacagcggggggcccgcacgtcaccgcttca
 10 aggcacactactcgtgacagggcatcgtcagctgggagagggctgtgccgtaaggggaagtacgggatctacccaaggtc
 accgcttctcaagtgatcgacaggtccatgaaaaccaggggcttgcceaaggccaagagccatgccccggaggtcataa
 cgtcctctccattgaaa

SEQ ID NO: 8 (последовательность ДНК модифицированного человеческого фактора X
 15 типа В; 1-1512 п.о.)

atggcgacgtccgaggcttcagctgcctggctgcctggccctggctgcctgtgtagccttgtgcacagccagcatgtgttctcgt
 gctcctcagcaagcacggtcgtgctccagcgggtccggcgagccaattccttctgaagagatgaagaaaggacacctcgaa
 agagagtgcattggaagagacctgctcatacgaagaggcccgcgaggtctttgaggacagcgacaagacgaatgaattctgga
 20 ataaatacaaagatggcgaccagtgtgagaccagtccctgccaagaaccagggcaaatgtaaagacggcctcggggaatacac
 ctgcacctgtttagaaggattcgaaggcaaaaactgtgaattattcacacggaagctctgcagcctggacaacggggactgtgac
 cagttctgccacgaggaacagaactctgtggtgtgctcctgcgcccgcgggtacaccctggctgacaacggcaaggcctgcatt
 cccacagggccctaccctgtgggaaacagaccctggaacgcaggaagaggtcagtgggccaggccaccagcagcagcg
 gggaggcccctgacagcatcacatggaagccatatgatgcagccgacctggaccccaccgagaacccttcgacctgttgac
 25 ttcaaccagacgcagcctgagaggggcgacaacaacctcacgcgatcgtgggaggccaggaatgcaaggacggggagtgt
 ccctggcaggccctgctcatcaatgaggaaaacgagggtttctgtggtggaactattctgagcgagttctacatcctaacggcagc
 ccactgtctctaccaagccaagagattcaaggtgagggtaggtgaccggaacacggagcaggaggagggcggtgaggcggt
 gcacgaggtggaggtggtcatcaagcacaagaaattcgtgccccctaagaaaaagccaggagttctacgaaaagttgac
ctggtctccatgacttcgacatcgccgtgctccggctcaagacccccatcaccttccgcatgaacgtggcgctgcctgcctccc
 30 cgagcgtgactgggcccaggtccacgctgatgacgcagaagacggggattgtgagcggcttcgggcgacccacgagaaggg
 ccggcagtcaccaggctcaagatgctggaggtgcctacgtggaccgcaacagctgcaagctgtccagcagcttcatcatcac
 ccagaacatgttctgtccggctacgacaccaagcaggaggatgctgccagggggacagcggggggcccgcacgtcaccg
 ctcaaggacacactactcgtgacagggcatcgtcagctgggagagggctgtgccgtaaggggaagtacgggatctaccca
 aggtcaccgcttctcaagtgatcgacaggtccatgaaaaccaggggcttgcceaaggccaagagccatgccccggaggt
 35 cataacgtcctctccattgaaa

SEQ ID NO: 9

1 kkfvppkksqefyekfdlaay

SEQ ID NO: 10

1 kkfvppnyuyvhqnfdaay

SEQ ID NO: 11

5 1 kkfvppqkaykfdlaay

ОПИСАНИЕ ФИГУР

- Фигура 1.** Структура фактора свертывания крови Ха. А: Схематичная структура доменов γ -карбокситглютамата ('GLA'), EGF-1 -2 ('EGF') и сериновой протеазы ('SP') фактора свертывания крови Ха. В: Кристаллическая структура сериновой протеазы FXa человека (pdb 2W26). Показана каталитическая триада His-276, Asp-322, Ser-419, остатки области контакта с ривароксабаном/апиксабаном Tyr-319 и Phe-396, положение остатков 316-317 (в кружках) и остатки Gly-289, Glu-297, Val-305, и His-311. С: Выравнивание области 311-322 в плазматических факторах FX различных видов с показанными консервативными остатками (выделены), остатком области контакта Tyr-319 и каталитическим остатком Asp-322. * обозначает фактор свертывания крови X из яда со вставкой в области, соответствующей области между Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1.
- Фигура 2.** Ингибирование хромогенной активности фактора FXa прямыми ингибиторами FXa. А: превращение пептидильного субстрата (SpecFXa, 250 мкМ) рекомбинантного человеческого фактора свертывания крови Ха (hFXa, 2 нМ, кружки) или фактора свертывания крови Ха из яда *P. textilis* (vptFXa, 10 нМ, треугольники) в присутствии повышающихся концентраций (1нМ – 10мкМ) ривароксабана ('riva', значки с заливкой) или апиксабана ('ari', значки без заливки). Превращение субстрата показано на графике в виде % от инкубаций в отсутствие ингибитора. В,С: Образование тромбина в плазме с дефицитом фактора свертывания крови X инициировали при помощи 0.5 нМ человеческого фактора Ха (hFXa, изображение В) или фактора Ха яда змеи (vptFXa, рисунок С) в отсутствие (серая линия / серый столбик) или в присутствии 0.4 мкМ ривароксабана ('riva', черная линия / черный столбик) или 2 мкМ апиксабана ('ari', штрихованная линия / белый столбик). Образование тромбина оценивали с использованием флюорогенного субстрата, на врезках показаны пиковые концентрации тромбина в различных инкубациях.

Фигура 3. (А) Флуоресцентный вестерн-блоттинг рекомбинантного FX (200 нг), полученного из клеточных линий НЕК293, которые стабильно экспрессируют рекомбинантный человеческий FX (r-hFX, дорожки 1, 5), модифицированный человеческий FX-A (mod A, дорожка 2, 6), или модифицированный человеческий FX-B (mod B, дорожки 3, 7), до (дорожки 1,2, 3) или после (дорожки 5, 6, 7) инкубации с активатором RVV-X. Тяжелая цепь эндогенного FXа плазмы человека мигрирует при ~29 КДа (дорожка 9). Показана относительная масса (КДа) белковых маркеров (дорожки 4, 8). **(В)** Рекомбинантный FX в кондиционированной среде из клеточных линий НЕК293, стабильно экспрессирующих человеческий рекомбинантный FX (черный столбик), или модифицированный FX–А (белый столбик), или модифицированный человеческий FX-B (серый столбик) измеряли с использованием FX-специфичного ИФА (ELISA). Каждый отдельный столбик представляет одну стабильную клеточную линию с максимальной достигнутой экспрессией варианта FX.

Фигура 4. Активация макромолекулярного субстрата. Превращение тромбина (1.4 мкМ) в присутствии 50 мкМ PCPS , 20 нМ FV (FV810, рекомбинантного FV, укороченного по В-домену) и 0.1 нМ модифицированного человеческого фактора свертывания крови Ха типа А (m-hFXа А), типа В (m-hFXа В), рекомбинантного (r-hFXа) или полученного из плазмы (pd-hFXа) FXа. Превращение субстрата отложено на графике в нМ/мин/нМ фермента, данные представляют собой среднее значения по двум независимым экспериментам ± стандартное отклонение.

Фигура 5. Ингибирование химерного FXа типа А прямыми ингибиторами фактора Ха. Превращение пептидильного субстрата (SpecFXа, 250 мкМ) RVV-X-активированного модифицированного человеческого фактора свертывания крови Ха типа А (m-hFXа А, 1 нМ) в сравнении с рекомбинантным человеческим фактором свертывания крови Ха (r-hFXа, 3 нМ), полученным из плазмы человеческого фактором свертывания крови Ха (pd-FXа, 2 нМ) и FXа из яда *P. textilis* (vptFXа, 1 нМ). Скорости превращения определяли в присутствии 0.001 – 100 мкМ ривароксабана (рисунок А) или апиксабана (рисунок В). Данные приведены в виде среднего значения по двум независимым экспериментам, за исключением r-hFXа (n=1).

Фигура 6. Ингибирование модифицированного человеческого FX –А модифицированного человеческого FX –В прямыми ингибиторами фактора Ха. Превращение пептидильного субстрата (SpecFXа, 250 мкМ) RVV-X-активированным модифицированным человеческим FX –А (m-hFXа А, 1 нМ) и модифицированным человеческим FX –В (m-hFXа В, 7 нМ, в сравнении с RVV-X активированным

рекомбинантным человеческим фактором свертывания крови Ха (r-hFXa, 6 нМ). Скорости превращения определяли 0.001 – 100 мкМ ривароксабана (рисунок А) и апиксабана (рисунок В). Данные представляют собой средние значения по двум независимым экспериментам.

5

Фигура 7. Ингибирование модифицированного человеческого FX –А или модифицированного человеческого FX –В прямыми ингибиторами фактора Ха в присутствии кофактора Va и фосфолипидов. Превращение пептидильного субстрата (SpecFXa, 250 мкМ) RVV-X-активированным модифицированным человеческим FX –А (m-hFXa A, 2 нМ) и активированным модифицированным человеческим FX –В (m-hFXa B, 4 нМ) в сравнении с RVV-X-активированным рекомбинантным человеческим фактором свертывания крови Ха (r-hFXa, 3 нМ), в присутствии 50 мкМ PCPS и 30 нМ FV (FV810, рекомбинантный, укороченный по В-домену В). Скорости превращения определяли в присутствии 0.001 – 100 мкМ ривароксабана (рисунок А) или апиксабана (рисунок В). Данные представляют собой средние значения по двум независимым экспериментам.

20

Фигура 8. Множественное выравнивание белков фактора свертывания крови X различных видов. Аминокислотную последовательность человеческого фактора свертывания крови X (№ доступа в Genbank: AAN46125.1) (HUM) сравнивают с аминокислотными последовательностями фактора свертывания крови X *M. musculus* ((№ доступа в Genbank: AAC36345.1) (MUS), фактора свертывания крови X *X. tropicalis* (Genbank Accession No.: NP_001015728) (Xtr), фактора свертывания крови X *D. rerio* (№ доступа в Genbank: AAM88343.1) (Dre), фактора свертывания крови X *T. rubripes* (№ доступа в Genbank: NP_001027783.1) (Tru), изоформы 1 фактора свертывания крови X *P. textilis* (№ доступа в UniprotKB: Q1L659) (Pte1), изоформы 2 фактора свертывания крови X *P. textilis* (№ доступа в UniprotKB: Q1L658) (Pte2), фактора свертывания крови X *P. textilis* (предшественник каталитической субъединицы псеутарина С; № доступа в Genbank: AAP86642.1) (Pte3) и фактора свертывания крови X *N. scutatus* (№ доступа в UniprotKB P82807.2) (Nsc). На этой фигуре жирным шрифтом и подчеркиванием показаны Gly-289, Asp-320, Tyr-319, Glu-297, Val-305 и His-311 последовательности SEQ ID NO: 1. Эта фигура показывает, что области аминокислотных остатков, соответствующей области между Gly-289 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1, различаются у белков фактора свертывания крови X различных видов.

35 Аминокислотные остатки, консервативные у всех видов, показаны в консенсусной последовательности.

Фигура 9. Аминокислотный состав эндогенного hFX и химерных вариантов FX. Остатки Histidine91 и Tyrosine99 домена, обладающего активностью сериновой протеазы (нумерация по химотрипсину; соответствуют His 311 и Tyrosine 319, соответственно, фактора FX, представленного последовательностью SEQ ID NO:1) эндогенного

5 человеческого (hFX) при выравнивании с химерным FX типа А (с-FX А, в середине; последовательность между His 311 и Asp 320 соответствует SEQ ID NO:9), типа В (с-FX В; последовательность между His 311 и Asp 320 соответствует SEQ ID NO:10), и типа С (с-FX С; последовательность между His 311 т Asp 320 соответствует SEQ ID NO:11).

10

Фигура 10. Исследование FXa: А: Окрашивание красителем кумасси 5 мкг вариантов FXa на 4-12% Bis-Tris-гелях. слева направо: фактор Ха из плазмы (pd-FXa), r-hFXa, химерный фактор Ха типа А, В и С (– А, – В, – С). В: Превращение протромбина (1.4мкМ) в присутствии 50 мкМ PCPS (75% фосфатидилхолина, 25%

15 фосфатидилсерина) и 20нМ FV (FV810, рекомбинантный, укороченный по В-домену, FV) и 0.1нМ pd-FXa, r-hFXa, с-FXa – А, с-FXa – В и с-FXa – С. Отложенные значения представляют среднее значение по двум независимым экспериментам.

20

Фигура 11. Ингибирование вариантов FXa прямыми пероральными антикоагулянтами. Нормированное превращение протромбина под действием 1 нМ pd-FXa (треугольники), r-hFXa (кружки), химерного FXa – А (квадратики), – В (ромбы) и – С (крестики) оценивали в присутствии 0.001 – 100 мкМ аписабана (слева, значки с заливкой) или эдоксабана (справа, значки без заливки). Константы ингибирования (определенные с использованием программного пакета Graphpad Prism 6) аписабана

25 для pd-FXa: 2нМ, r-hFXa: 4нМ, с-FXa – А: 130нМ, – В: 760нМ – С: 1270нМ и эдоксабана для r-hFXa: 0.5нМ, с-FXa – А: 3нМ, – В: 140нМ– С: 270нМ.

30

Фигура 12. Профили инициированного фактором FXa образования тромбина (TG) для вариантов FXa. Образование тромбина в плазме в отсутствие (А) и в присутствии (В) прямого перорального антикоагулянта аписабана (2мкМ). Инициация образования тромбина вариантами pd-FXa, r-hFXa, с-FXa – А, с-FXa – В и с-FXa – С в плазме с дефицитом FX. Кривые представляют среднее по меньшей мере по 3 независимым

экспериментам.

35

Фигура 13. Профиль инициированного тканевым фактором (TF) образования тромбина для r-hFX и с-FX – С. А: Образование тромбина в плазме при низком уровне TF (2пМ) в отсутствие и в присутствии 2 мкМ прямого перорального антикоагулянта аписабана

(Arix) на 1 единицу r-hFX, r-hFX плюс апиксабан, с-FXa – C или с-FXa – C плюс апиксабан. Одну единицу r-hFX (7 мкг/мл) или с-FXa – C (16 мкг/мл) определяли в анализе свертывания на основе протромбинового времени с использованием нормальной человеческой плазмы для сравнения. Кривые представляют среднее по 5 меньшей мере по 3 независимым экспериментам. В: Образование тромбина в плазме при высоком уровне TF (20пМ).

Фигура 14. Профиль инициированного тканевым фактором (TF) образования тромбина для - r-hFX и с-FX – C. (верхний график): Образование тромбина в плазме при низком уровне TF (2пМ) в отсутствие (пунктирная линия) и в присутствии 200 нМ (светло-серая), 600 нМ (темно-серая) 2000 нМ (черная) прямого перорального антикоагулянта эдоксабана на 1 единицу r-hFX (7 мкг/(мл)). (Нижний график): Образование тромбина в плазме при низком уровне TF (2пМ) с близкими концентрациями эдоксабана на 1 единицу с-FXa – C (16 мкг/мл). Кривые представляют среднее по 2 независимым экспериментам.

15

Таблица 1

Аминокислота	3-буквенное обозначение ^[114]	1-буквенное обозначение ^[114]	Полярность боковой цепи ^[114]	Заряд боковой цепи (рН 7,4) ^[114]	Индекс гидрофобности ^[115]	Поглощение λ _{макс} (нм) ^[114]	ε при λ _{макс} (×10 ⁻³ М ⁻¹ см ⁻¹) ^[116]
Аланин	Ala	A	неполярная	нейтральный	1,8		
Аргинин	Arg	R	полярная, основная	положительный	-4,5		
Аспарагин	Asn	N	полярная	нейтральный	-3,5		
Аспарагиновая кислота	Asp	D	полярная, кислотная	отрицательный	-3,5		
Цистеин	Cys	C	неполярная	нейтральный	2,5	250	0,3
Глутаминовая кислот	Glu	E	полярная, кислотная	отрицательный	-3,5		
Глутамин	Gln	Q	полярная	нейтральный	-3,5		
Глицин	Gly	G	неполярная	нейтральный	-0,4		
Гистидин	His	H	полярная, основная	положительный(10%) отрицательный(90%)	-3,2	211	5,9
Изолейцин	Ile	I	неполярная	нейтральный	4,5		
Лейцин	Leu	L	неполярная	нейтральный	3,8		
Лизин	Lys	K	полярная, основная	положительный	-3,9		
Метионин	Met	M	неполярная	нейтральный	1,9		
Фенилаланин	Phe	F	неполярная	нейтральный	2,8	257,200,188	0,2, 9,3, 00,0
Пролин	Pro	P	неполярная	нейтральный	-1,6		
Серин	Ser	S	полярная	нейтральный	-0,8		
Треонин	Thr	T	полярная	нейтральный	-0,7		
Триптофан	Trp	W	неполярная	нейтральный	-0,9	280,219	5,6, 47,0
Тирозин	Tyr	Y	полярная	нейтральный	-1,3	274,222,193	1,4, 8,0, 48,0
Валин	Val	V	неполярная	нейтральный	2.4		

ПРИМЕРЫ

Пример 1

5 Материалы и методы

Ривароксабан и аписабан получали из Alsachim (Иллкирш, Франция) и растворяли в ДМСО (~30 мг/мл). Пептидильный субстрат метоксикарбонилциклогексилглицилглициларгинин-п-нитроанилид (Спец-Ха) получали из Sekisui Diagnostics (Стэмфорд, Коннектикут, США). Все реагенты для культур тканей были из Life Technologies (Карлсбад, Калифорния), за исключением инсулин-трансферрин-селенита натрия (ITS, который получали из Roche (Базель, Швейцария). Малые однослойные фосфолипидные везикулы (PCPS), состоящие из 75% (об./об.) L-фосфатидилхолина куриных яиц и 25% (об./об.) L-фосфатидилсерина из мозга свиньи (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), получали и исследовали как было описано ранее (Higgins и др., 1983. J Biol Chem 258: 6503–6508). Плазму человека без FX получали из Diagnostica Stago (Париж, Франция). Все функциональные исследования проводили в буферном солевом растворе с HEPES (20 mM Hepes, 0,15 M NaCl, pH 7,5), содержащем 5 mM CaCl₂ и 0,1% полиэтиленгликоль 8000 (буфер для исследований). Вектор pCMV4 для экспрессии в млекопитающих (Andersson и др., 1989. J Biol Chem. 264: 8222-8229), содержащий рекомбинантный FX человека (r-hFX) был получен в дар от Rodney M. Camire (Camire и др., 2000. Biochemistry 39: 14322-14329). Вектор pcDNA3 получали из Invitrogen, а кДНК PACE была получена в дар от Genetics Institute, Бостон, Массачусетс. Вектор, содержащий фурин, - конвертазу белков-предшественников, описан в патенте США № 5,460,950.

Рекомбинантный фактор V человека (FV) получали, очищали и характеризовали как описано ранее (Bos и др., 2009. Blood 114: 686-692). Рекомбинантный *P. textilis* змеи FXa (vpt-FXa) получали, очищали и характеризовали как описано ранее (Verhoef и др., Toxin Reviews (2013) (doi:10,3109/15569543,2013,844712). Фактор Ха человека, полученный из плазмы (pd-hFXa), DAPA, протромбин человека и моноклональный IgG мыши против фактора X человека (АНХ-5050) получали из Haematologic Technologies (Эссекс Джанкшн, Вермонт, США). Парные антитела против антигена FX для иммуноферментного анализа ELISA получали из Cedarlane (Берлингтон, Канада). Активатор RVV-X получали из Diagnostica Stago (Париж, Франция), или Haematologic Technologies. Эндонуклеазу рестрикции *ApaI* получали из New England Biolabs (Ипсвич,

Массачусетс, США). ДНК лигазу T4 получали из Roche (Roche Applied Science, Индианаполис, Индиана, США).

Последовательность ДНК, кодирующая модифицированный FX –А человека, 5 представлена как SEQ ID NO: 7. Последовательность ДНК, кодирующая модифицированный FX –В человека, представлена как SEQ ID NO: 8. Нуклеотидную последовательность, кодирующую SEQ ID NO: 4 (для получения модифицированного FX –А человека) или SEQ ID NO: 5 (для получения модифицированного FX –В человека), содержащую на концах участки узнавания *ApaI* синтезировали в Genscript 10 (*Piscataway*, Нью-Джерси, США), субклонировали в вектор pCMV4 для экспрессии в млекопитающих с использованием *ApaI* и ДНК лигазы T4- и секвенировали для подтверждения соответствия. Модифицированный FX – А человека и модифицированный FX – В человека также обозначали как mod-hFX-A и mod-hFX-B, соответственно. Стабильные линии клеток HEK293, экспрессирующие r-hFX или 15 модифицированный hFX, получали как описано ранее (Larson и др., 1998. *Biochemistry* 37, 5029-5038). Клетки HEK293 совместно трансфицировали векторами pCMV4 и pсDNA-PACE с использованием Липофектамина 2000 в соответствии с инструкциями производителя. Экспрессию FX трансфицированными клетками оценивали с помощью модифицированного одностадийного теста на свертываемость с использованием 20 плазмы человека без FX. Трансфицированные клетки с наивысшими уровнями экспрессии переносили в колбы с культурой T175 и выращивали 24 часа в среде для экспрессии (питательная среда DMEM-F12 без фенолового красного, содержащая: пенициллин/стрептомицин/фунгизон, 2 mM L-глутамин, 10 мкг/мл ITS, 100 мкг/мл генетицин-418 сульфат и 6 мкг/мл витамин К). Среду после выращивания собирали, 25 центрифугировали при 10 000 g для удаления осадка клеток, концентрировали с помощью фильтра с ограниченной полосой пропускания в 10 кДа (Millipore, Дармштадт, Германия), промывали буферным солевым раствором с HEPES и хранили в 50% глицерине при -20°C. Уровни антигена FX в растворах для хранения в глицерине оценивали с помощью твердофазного иммуноферментного анализа ELISA в 30 соответствии с инструкциями производителя с использованием собранной плазмы человека в качестве стандартного образца, предполагая концентрацию FX в плазме, равную 10 мкг/мл.

Среду для экспрессии добавляли на 24 часа к стабильным линиям клеток, экспрессирующим либо r-hFX, либо модифицированный FX–А человека, либо 35 модифицированный FX–В человека. Аликвоту среды после культивирования инкубировали с RVV-X (10 нг/мкл; Haematologic Technologies) в течение 120 минут при 37°C. Модифицированный FX–А человека или модифицированный FX–В человека

после активации также обозначается как m-hFXa A или m-hFXa B, соответственно. Предполагая, что все варианты FXa имеют близкие аффинности в отношении субстратов, последовательно определяли концентрацию FXa в среде по превращению пептидильного субстрата (Sпес-Ха, 250 мкМ) с использованием известных

5 концентраций rd-hFXa в качестве стандарта. Стационарные начальные скорости расщепления макромолекулярного субстрата определяли с интервалами при 25°C как описано ранее (Camire, 2002. *J Biol Chem* 277: 37863-70). Вкратце, кривые реакций активации протромбина получали при инкубации PCPS (50 мкМ), DAPA (10 мкМ) и протромбина (1,4 мкМ) с рекомбинантным FV-810 человека (укороченным по домену B,

10 константно активный) и указанные реакции инициировали либо с использованием 0,1 нМ rd-hFXa, r-hFXa, m-hFXa B, либо 0,033 нМ m-hFXa A. Скорость превращения протромбина измеряли как описано ранее (Krishnaswamy и др., 1997. *Biochemistry* 36, 3319–3330).

15 Рекомбинантный FX и модифицированный FX–A человека и модифицированный FX–B человека (200 нг) активировали с помощью RVV-X (0,5 U/мл) в течение 60 минут при 37°C и подвергали электрофорезу в восстанавливающих условиях (30 мМ дитиотреитол) с использованием готовых гелей с градиентом 4-12% и буферной системы MES (Life Technologies), и переносили на нитроцеллюлозную мембрану с

20 использованием системы Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния, США). Мембрану обрабатывали антителами против тяжелой цепи FX и визуализировали дорожки белков с использованием флюоресцентных антител Dyelight-800 против мыши антител (Thermo Scientific, Рокфорд, Иллинойс, США). В качестве стандарта использовали hFXa (200 нг), полученный из плазмы.

25 Образование тромбина осуществляли с помощью адаптированных протоколов, описанных ранее (Nemker и др., 2003. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 33: 4-15). Вкратце, плазму без FX смешивали с кукурузным трипсиновым ингибитором (70 мкг/мл), буфером (25 мМ HEPES, 175 мМ NaCl, 5 мг/мл БСА, pH 7,5) и PCPS (20 мкМ) и

30 инкубировали в течение 10 минут при 37°C в 96-луночном микропланшете. Образование тромбина инициировали путем добавления rd-hFXa (0,5 нМ) или vpt-FXa (0,5 нМ), предварительно инкубированных с ривароксабаном (0,4 мкМ) или аликсабаном (0,2 мкМ), содержащих FluCa, и немедленно переносили в смесь с плазмой. Конечный объем реакции составлял 120 мкл, из которых 64 мкл составляла

35 плазма без FX. Образование тромбина определяли каждые 20 секунд в течение 30 минут и корректировали с помощью калибратора с использованием программного обеспечения (Thrombinoscope, версия 5.0). Средний потенциал эндогенного тромбина

(площадь под кривой образования тромбина) рассчитывали по, по меньшей мере, двум независимым экспериментам. Калибратор и флуоресцентный субстрат (FluCa) приобретали в Thrombinoscope (Маастрихт, Нидерланды).

- 5 Превращение пептидильного субстрата (Спес-Ха, конечная концентрация 250 мкМ) для каждого варианта FXa осуществляли в отсутствие и в присутствии прямых ингибиторов FXa ривароксабана и аписабана (конечная концентрация 0,001 мкМ – 100 мкМ) при температуре окружающей среды. Исходные растворы pd-hFXa (конечная концентрация 2 нМ) или vpt-FXa (конечная концентрация 10 нМ) без кальция разбавляли буфером
- 10 для исследования и инкубировали в 96-луночном микропланшете в присутствии буфера для исследования или ингибитора в течение 2 минут. Превращение субстрата инициировали с помощью Спес-Ха и измеряли абсорбцию в течение 10 минут при 405 нМ на планшетном ридере SpectraMax M2e, оснащённом программным обеспечением Softmax Pro (Molecular Devices, Саннивэйл, Калифорния, США). Для того, чтобы
- 15 оценить чувствительность к DFXI каждого рекомбинантного варианта FX, исходные растворы в глицерине (5-40 мкл) r-hFX, модифицированного FX-A человека и модифицированного FX-B человека разбавляли буфером для исследования и инкубировали с RVV-X (0,5 U/мл) в течение 60 минут при 37°C. Активированные исходные растворы последовательно разбавляли буфером для исследования,
- 20 инкубировали в течение 2 минут в 96-луночном микропланшете в присутствии буфера для исследования или ингибитора и определяли превращение субстрата, как описано ранее. Относительные концентрации rhFX, m-hFXa A и m-hFXa B оценивали по скорости превращения субстрата в отсутствие ингибитора с использованием известных концентраций pd-hFXa в качестве стандарта.

25

Результаты

(Vpt)-FXa, полученный из яда змеи P. textilis, устойчив к ингибированию прямыми ингибиторами фактора Ха DFXI.

- Биохимическая характеристика очищенного рекомбинантного FXa (vptFXa),
- 30 полученного из яда змеи *P. textilis*, выявила, что эта протеаза, в отличие FXa всех других видов, известных в настоящее время, устойчива к ингибированию прямыми антикоагулянтами ривароксабаном и аписабаном, которые были сконструированы для обратимого блокирования активного сайта FXa. В соответствии с предыдущими
- наблюдениями, K_i ингибирования FXa человека (hFXa) составляла примерно 1 нМ
- 35 (Perzborn, 2005. J Thromb Haemost, 3, 514-521), при этом ингибирование vptFXa было по меньшей мере в 1000 раз снижено (Фиг. 2A). Эти наблюдения подтвердились в системе с плазмой, имитирующей образование фибрина *in vivo*, демонстрируя, что

физиологические концентрации ингибиторов FXa практически не оказывали влияние на образование тромбина, инициированное vptFXa, в то время как в присутствии hFXa наблюдалось его значительное снижение (Фиг. 2B,C).

5 *Химерные FXa человека и яда змеи P. textilis.*

Обнаруженный структурный элемент, который не только ограничен vptFXa, но также присутствует в FX из яда австралийской змеи *Notechis scutatus*, составляет измененный аминокислотный состав в положении рядом с активным сайтом hFXa (Фиг. 1C). С учетом его расположения, мы предположили, что эта уникальная спираль может модулировать взаимодействие не только с ривароксабаном и/или аписабаном, но и с FVa, поскольку указанный сайт связывания FVa является C-концевым в этой спирали (Lee и др., 2011. J Thromb Haemost 9: 2123-2126). Для проверки этой гипотезы, мы создали две кодирующие белок конструкции ДНК, обозначенные как SEQ ID NO: 7 и 8. Химера mod-hFX-A, обозначенная как SEQ ID NO: 7, содержит соответствующую последовательность ДНК *N. scutatus* (обозначенную жирным шрифтом и подчеркнутую), а химера mod-hFX-B, обозначенная как SEQ ID NO: 8, содержит соответствующую часть последовательности *P. textilis* (обозначенную жирным шрифтом и подчеркнутую).

20 С использованием этих конструкций ДНК мы создали линии клеток HEK293, которые стабильно продуцировали оба химерных белка, и последовательно определяли уровни экспрессии модифицированного FX человека в клетках HEK293 посредством культивирования указанных клеток в среде для экспрессии в течение 24 часов. Анализ методом Вестерн-блот выявил экспрессию полноразмерного FX для обоих химерных вариантов, сходную с экспрессией природного FX (Фиг. 3A). Инкубация с активатором из яда гадюки Рассела (RVV-X) приводила к протеолитической активации примерно 30% зимогена FX в FXa, проявлявшейся в появлении дорожки тяжелой цепи размером ~29 кДа. Тяжелая цепь как модифицированного FXa-A человека, так и модифицированного FXa-B человека, двигалась как белок несколько большей массы, что соответствует введению последовательности из змеи, которая на 12 или 13 остатков длиннее, по сравнению с последовательностью FXa человека, соответственно. Анализ уровней антигена FX в среде для выращивания показал, что в то время как экспрессия mod-hFX-A была снижена примерно в 7 раз, экспрессия mod-hFX-B была близка к экспрессии природного FX человека (Фиг. 3B). Низкие уровни FX антигена mod-hFX-A коррелировали с такими же низкими уровнями активности FX, которые мы наблюдали при использовании модифицированного анализа коагулирующей активности. Это указывает на то, что экспрессия белка mod-hFX-A

является близкой к оптимальной по сравнению с экспрессией других вариантов FX, его функция FX не нарушается.

Для проверки активности зимогена FX мы превращали rFX и модифицированный FX–А человека и модифицированный FX–В человека в FXа с использованием активатора FX из яда гадюки Рассела (RVV-X). Как модифицированный FXа–А человека, так и модифицированный FXа–В человека продемонстрировали протеазную активность при активации RVV-X, что определили по превращению низкомолекулярного пептидильного субстрата SpectroZyme Xa, специфичного к FXа. В дополнение, скорости протромбинового превращения в присутствии кофактора FVa человека были близки к скоростям в присутствии FXа человека (как rd-hFXа, так и r-hFXа) (Фиг. 4). В совокупности, эти наблюдения позволяют предположить, что вставки последовательности змеи не вызывают значительных изменений ферментативных свойств FX человека

15

Ингибирование химер FXа прямыми ингибиторами фактора Xa.

Для оценки константы ингибирования (K_i) ривароксабана и апиксабана для модифицированного FX–А человека, активированного RVV-X, активированный рекомбинантный белок предварительно инкубировали с 0,001 до 100 мкМ ингибитора и затем изучали его каталитическую активность в отношении SpectroZyme Xa. Хотя инкубация с 0,5 мкМ ривароксабана приводила к полному ингибированию r-hFXа и rd-hFXа, mod-hFXа-А оставался полностью активным в этих условиях (Фиг. 5А). Более того, указанный химерный вариант демонстрировал частичную хромогенную активность после инкубации с 100 мкМ ривароксабана, также как и FXа змеи *P. textilis*. Эти данные указывают на то, что K_i при ингибировании mod-hFXа-А по меньшей мере в 100 раз выше, чем константа FXа человека. Мы наблюдали сходное снижение чувствительности к ингибированию апиксабаном (Фиг. 5В).

20

Оценка ингибирования mod-hFXа–В ривароксабаном и апиксабаном показала, что K_i близка к значению этой константы для mod-hFXа–А (Фиг. 6А и 6В). Таким образом, была продемонстрирована сниженная чувствительность к ингибированию апиксабаном и ривароксабаном. И наконец, ингибирование прямыми ингибиторами фактора Xa химерных FXа вариантов не изменялось в присутствии кофактора FVa и отрицательно заряженных фосфолипидных везикул, что позволяет предположить, что как свободная протеаза, так и протеаза, связанная в комплексе FVa-FXа-липиды, в равной степени устойчива к ингибированию ривароксабаном и апиксабаном (Фиг. 7А, В).

25

Пример 2

Материалы и методы

Если не указано иное, материалы и методы, использованные в настоящем Примере, совпадали с материалами и методами, указанными в Примере 1, или были аналогичны им.

Конструкции для экспрессии рекомбинантного FX: ДНК, кодирующую химерный FX–A (с-FX A), химерный FX–B (с-FX B) и химерный FX–C (с-FX C), синтезировали в Genscript (Пискатауэй, Нью-Джерси, США), субклонировали в вектор pCMV4 для экспрессии в млекопитающих с использованием *ApaI* и ДНК лигазы T4 и секвенировали для проверки. Стабильные линии клеток HEK293, экспрессирующих рекомбинантный FX человека или рекомбинантный химерный FX, получали, как было описано ранее (Larson и др., 1998. *Biochemistry* 37, 5029-5038). Клетки HEK293 одновременно трансфицировали векторами pCMV4 и pcDNA-PACE с помощью Lipofectamine2000 в соответствии с инструкциями производителя.

Очистка химерного FX(a): Рекомбинантные химерные продукты FX A, B и C получали, очищали и исследовали, в соответствии с описанной ранее процедурой (Camire и др., 2000), за исключением того, что иммуноаффинную очистку заменяли очисткой FX в градиенте кальция на сефарозной колонке POROS HQ20. Обычный выход полностью γ -карбоксилированного рекомбинантного FX составлял 0,9 мг/л среды для выращивания. Очищенный рекомбинантный химерный FX активировали RVV-X (0,1 U/мг FX), выделяли гель-фильтрацией на колонке Sephacryl S200 HR (Vt 460 мл) и хранили при -20°C в HBS, содержащем 50% об./об. глицерина. Очищенные продукты визуализировали окрашиванием кумасси.

Активация макромолекулярного субстрата: Стационарные начальные скорости реакции расщепления макромолекулярного субстрата определяли прерывисто при 25°C как описано ранее (Camire, 2002). Вкратце, кривые реакций активации протромбина получали при инкубации PCPS (50 мкМ), DAPA (10 мкМ), и протромбина (1,4 мкМ) с рекомбинантным FV-810 человека (20 нМ, с укороченным доменом B, константно активный FV), и реакцию инициировали с использованием 0,1 нМ pd-hFXa, r-hFXa, с-FXa A, с-FXa B или с-FXa C. Скорость превращения протромбина измеряли как описано ранее (Krishnaswamy и др., 1997). Превращение протромбина исследовали в отсутствие или в присутствии прямых ингибиторов FXa эдоксабана (регистрационный номер CAS 912273-65-5; произведенный Daiichi Sankyo, продающийся как Savaysa) и

апиксабана (конечная концентрация 0,001 мкМ – 100 мкМ) для определения чувствительности DOAC каждого рекомбинантного варианта FXa.

Исследования образования тромбина: Протокол образования тромбина адаптировали на основании ранее описанного протокола (Nemker и др., 2003). Вкратце, кривые образования тромбина получали путем добавления в плазму, не содержащую FX, тканевого фактора (TF, конечная концентрация 2 или 20 пМ), ингибитора трипсина из кукурузы (70 мкг/мл), препарата фосфолипидов PCPS (20 мкМ) и 1 Ед (протромбиновая активность свертывания к определенному времени) r-hFX (7 мкг/мл) или химерного FX-C (16 мкг/мл). Образование тромбина инициировали добавлением субстратного буфера (Fluca) к плазме. Кривые образования тромбина в присутствии FXa получали путем добавления в плазму, не содержащую FX, кукурузного трипсинового ингибитора (70 мкг/мл), буфера для исследования и PCPS (20 мкМ). Образование тромбина инициировали путем добавления FXa, предварительно смешанного с ривароксабаном или апиксабаном, буфером для исследования без кальция и буфером Fluca. Конечный объем реакции составлял 120 мкл, из которых 64 мкл составляла плазма без FX. Образование тромбина определяли каждые 20 секунд в течение 30 минут и корректировали с помощью калибратора с использованием программного обеспечения Thrombinoscope. Время задержки, средний потенциал эндогенного тромбина (площадь под кривой образования тромбина), время удерживания и пик образования тромбина рассчитывали на основании по меньшей мере 3 независимых экспериментов.

Результаты

Вставка 9-13 остатков в доменах сериновой протеазы змеи *P. textilis*, изоформы FXa змей *P. textilis* и *N. scutatis* побудила к конструированию химерных FX человека и змеи. Авторы создали три конструкции ДНК, кодирующие белки, включающие каждую из этих вставок в FXa человека (Фиг. 9). С использованием этих конструкций ДНК создали линии клеток HEK293, которые стабильно продуцируют один из: нормального рекомбинантного FX человека (r-hFX) и трех типов химерного FX (с-FX A, с-FX B и с-FX C). Уровни экспрессии рекомбинантного FX человека и химерных FX в клетках HEK293 определяли путем выращивания этих клеток в среде для экспрессии в течение 24 часов, после чего активность свертывания среды оценивали с помощью модифицированного одностадийного исследования свертывания PT в плазме без FX. Рекомбинантный γ -карбоксилированный FX очищали от среды для выращивания последовательными стадиями ионообменной хроматографии. Фракции растворов FX последовательно активировали активатором FX из яда гадюки Рассела, выделяли

гель-фильтрацией и охарактеризовали с помощью SDS-ПААГ. Тяжелая цепь очищенного фактора Ха, выделенного из плазмы, двигалась как смесь 50/50 с FXa-α и FXa-β размером ~34-31 кДа. Хотя автопротеолитическое отщепление С-концевого участка FXa-α (остатки 436–447) приводит к образованию β формы FXa, обе изоформы функционально являются сходными в отношении образования комплекса с протромбиназой, активации протромбина, узнавания антитромбина и превращения пептидильного субстрата (Pryzdial и Kessler, 1996).

Очищенные продукты r-hFXa и химерные FXa – В и – С двигались главным образом как FXa-β, в то время как химерный FXa – А двигался как смесь 50/50 α и β FXa (Фиг. 10А). Кинетика активации макромолекулярного субстрата с помощью r-hFXa и химерных FXa (А/В/С) в отрицательно заряженных фосфолипидных везикулах (PCPS) в присутствии кофактора FVa продемонстрировала, что все химерные варианты включаются в комплекс протромбиназы. Однако, скорость катализа химерных вариантов FXa – А, – В и – С в , соответственно, 8,2–, 6,8–, и 2,3 раза ниже по сравнению с рекомбинантным FXa человека. Более того, рекомбинантно полученный FXa человека демонстрирует незначительное снижение эффективности катализа по сравнению с FXa, полученным из плазмы (Фиг. 10В).

Для определения константы ингибирования (K_i) DOACs (апиксабан, эдоксабан) для химерных FXa (А/В/С), исследовали кинетику активации протромбина в присутствии 0,001 - 100 мкМ DOAC. Несмотря на то, что FXa, полученный из плазмы и рекомбинантный FXa человека полностью ингибировались близкими к эквимоллярным концентрациями DOAC, все химерные варианты FXa были способны осуществлять превращение протромбина при значительно более высоких концентрациях ингибиторов FXa (K_i апиксабана: 130-1270 нМ, K_i эдоксабана: 3-270 нМ) (Фиг. 11). Учитывая то, что химерные варианты FXa содержат сходным образом расположенные вставки различной длины и различного состава аминокислот, авторы предположили что сниженная чувствительность к разным DOAC является прямым следствием расположения этих вставок в непосредственной близости к остатку Tyr99, координирующему DOAC, и/или активному центру.

Для оценки потенциала химерного FXa в восстановлении образования тромбина в плазме, обогащенной прямыми пероральными антикоагулянтами, проводили исследование образования тромбина (TG). Образование тромбина в плазме человека без FX, иницированное FXa (5нМ), продемонстрировало нормальный профиль TG для варианта с-FXa С, и близкие к нормальным профили для вариантов с-FXa А и В А и В.

(Фиг. 12А). Несмотря на то, что апиксабан (2 мкМ) существенным образом увеличивал время запаздывания и снижал пик образования тромбина в исследовании образования тромбина, инициированного pd-FXa- и r-hFXa, эти параметры не изменялись в присутствии химерных вариантов FXa (Фиг. 12В) (Таблица 2). Эти результаты

5 показывают, что химерные варианты FXa способны восстанавливать гемостаз в плазме, содержащей прямые пероральные антикоагулянты. В дополнение, зимогенная форма химерного FX–С также способна поддерживать образование тромбина плазме без FX. Инициация коагуляции низкими концентрациями тканевого фактора (TF, 2 пМ) приводило к получению устойчивой кривой TG для химерного FX–С, не подверженной

10 влиянию апиксабана, в отличие от TG для r-hFX (Фиг. 13). При низких концентрациях TF химерный FX–С демонстрирует короткое запаздывание в начале TG и время для пика, в дополнение, химерный FX–С имеет более высокий эндогенный тромбиновый потенциал (ЭТП) и более высокий пик образования тромбина (Таблица 3). Однако, эти значения нормализуются при высоких концентрациях TF (20 пМ) (Фиг. 13) (Таблица 3).

15 Основываясь на наблюдениях, сделанных в исследовании образования тромбина, инициированном FXa, мы ожидаем, что зимогенные формы химерных вариантов FX A и B также поддерживают образование тромбина, инициируемое тканевым фактором, в плазме, обогащенной прямыми пероральными антикоагулянтами. Фиг. 14 в комбинации с

Таблицей 4 обеспечивают дальнейшие доказательства влияния химерных вариантов

20 FXa на восстановление гемостаза в плазме, содержащей ингибиторы прямых пероральных антикоагулянтов. Суммируя вышесказанное, эти результаты демонстрируют, что химерный FX(a) способен восстанавливать гемостаз в плазме, содержащей ингибиторы DOAC, как в виде зимогенной формы, так и в форме протеазы.

25

Таблица 2. Влияние апиксабана на параметры образования тромбина, инициированного FXa. Приведенные значения обозначают значения образования тромбина, полученные в присутствии апиксабана с поправкой на значения образования тромбина, полученные в отсутствие апиксабана.

	pd-FXa	r-hFXa	c-FXa-A	c-FXa-B	c-FXa-C
Блокировка времени запаздывания, сек	299	293	61	12	3
Задержка времени появления пика, сек	515	467	120	30	7

Пик образования тромбина, % от опыта без аписабана	26	33	78	85	99
Площадь под кривой, % от опыта без аписабана	67	76	89	92	101

Таблица 3. Суммарные данные экспериментов по образованию тромбина, инициированных низкой и высокой концентрациями TF.

Низкая концентрация TF, 2 п/М	r-hFXa	r-hFXa + аписабан	c-FXa-C	c-FXa-C + аписабан
Время запаздывания, сек	132 ± 5	696 ± 162	185 ± 12	186 ± 6
Время появления пика, сек	324 ± 6	нет пика	480 ± 24	492 ± 23
Пик тромбина нМ	61 ± 4	8 ± 4	78 ± 1	72 ± 4
ЭТП, нМ	567 ± 61	нет ЭТП	830 ± 131	756 ± 38

5

Высокая концентрация TF, 20 п/М	r-hFXa	r-hFXa + аписабан	c-FXa-C	c-FXa-C + аписабан
Время запаздывания, сек	48 ± 1	138 ± 12	72 ± 2	78 ± 2
Время появления пика, сек	114 ± 6	804 ± 36	138 ± 6	144 ± 9
Пик тромбина нМ	338 ± 8	32 ± 4	334 ± 15	321 ± 15
ЭТП, нМ	973 ± 18	694 ± 67	1027 ± 19	1012 ± 33

Таблица 4. Влияние эдоксабана на параметры TG, инициированного TF, для r-hFX и c-FX – C. Приведенные значения обозначают экспериментальные значения TG, полученные в присутствии повышающихся концентраций эдоксабана.

10

r-hFX									
Эдоксабан, нМ	контроль	50	100	200	400	600	1000	2000	
Время запаз- дывания, сек		115	247	297	397	538	679	874	1180
Оставшийся ЭТП	100 %	99,3	87,1	нет ЭТП	нет ЭТП	нет ЭТП	нет ЭТП	нет ЭТП	нет ЭТП
Высота пика, %	100 %	41,2	30,8	23,1	15,9	13,0	10,1	7,1	
Время появ- ления пика, сек		265	618	756	1290	1890	1932	2472	2562
с-FX-C									
Эдоксабан, нМ	контроль	50	100	200	400	600	1000	2000	
Время запаз- дывания, сек		188	161	161	12	182	197	212	232
Оставшийся ЭТП	100 %	87,9	92,5	88,3	92,7	96,8	92,7	82,0	
Высота пика, %	100 %	109,3	112,3	101,0	94,6	88,7	77,5	65,3	
Время появ- ления пика, сек		433	382	388	418	448	483	538	578

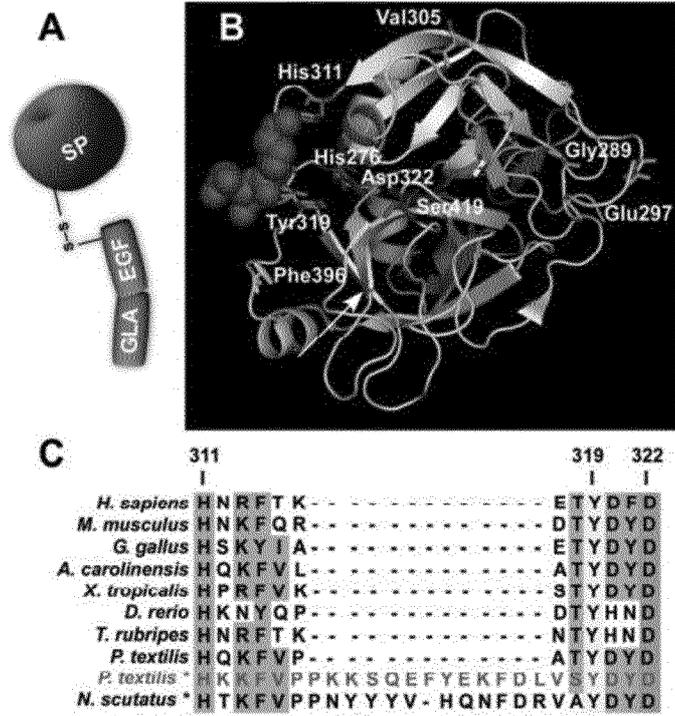
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный белок, содержащий полипептид фактора свертывания Ха млекопитающего, причем указанный полипептид имеет изменение или делецию
5 аминокислотного остатка, соответствующего аминокислотному остатку Phe-396, как показано в последовательности SEQ ID NO: 1, причем указанный измененный белок каталитически активен и имеет сниженную чувствительность к ингибированию прямым ингибитором фактора Ха.
- 10 2. Белок по п. 1, отличающийся тем, что изменение или делеция аминокислотного остатка, соответствующего аминокислотному остатку Phe-396, скомбинирован с вставкой 1-50 аминокислотных остатков в области, соответствующей области аминокислотных остатков между Gly-289 и Asp-320, предпочтительно между His-311 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1.
- 15 3. Белок по п. 2, дополнительно содержащий замену от 1 до 8 аминокислотных остатков в области аминокислотных остатков между His-311 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1.
- 20 4. Белок по п. 2 или п. 3, отличающийся тем, что область аминокислотных остатков, соответствующая области аминокислотных остатков между His-311 и Asp-320 последовательности SEQ ID NO: 1, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, или SEQ ID NO: 11.
- 25 5. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая последовательность ДНК, которая кодирует рекомбинантный белок по любому из пп. 1-4.
6. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 5.
- 30 7. Клетка-хозяин, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 5 или вектор экспрессии по п. 6.
8. Фармацевтическая композиция, содержащая белок по любому из пп. 1-4 и фармацевтически приемлемый носитель для лечения кровотечений.

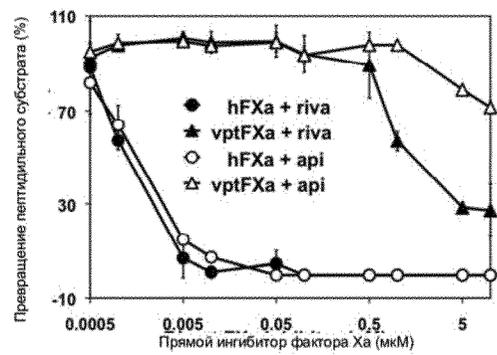
35

9. Применение белка по любому из пп. 1-4 для лечения или предотвращения осложнений в виде кровотечений, связанных с антикоагулянтной терапией с применением прямого ингибитора фактора Ха.
- 5 10. Применение белка по любому из пп. 1-4 для приготовления лекарственного средства для полного или частичного обращения осложнений в виде кровотечений, связанных с антикоагулянтной терапией с применением прямого ингибитора фактора Ха у субъекта.
- 10 11. Применение по п. 9 или 10, отличающееся тем, что прямой ингибитор фактора Ха представляет собой ривароксабан (5-хлор-N-[[[(5S)-2-оксо-3-[4-(3-оксо-4-морфолинил)фенил]-5-оксазолидинил]метил]-2-тиофенкарбоксамид), апиксабан (1-(4метоксифенил)-7-оксо-6-[4-(2-оксопиперидин-1-ил)фенил]-4,5,6,7-тетрагидро-1H-пиразоло[3,4-с]пиридин-3-карбоксамид), эдоксабан (N'-(5-хлоропиридин-2-ил)-N-
15 [(1S,2R,4S)-4-(диметилкарбамоил)-2-[(5-метил-6,7-дигидро-4H-[1,3]тиазоло[5,4-с]пиридин-2-карбонил)амино]циклогексил]оксамида, 4-метилбензолсульфоновая кислота) и/или бетриксабан (N-(5-хлоропиридин-2-ил)-2-[[4-(N,N-диметилкарбамимидоил)бензоил]амино]-5-метоксибензамид).
- 20 12. Применение фармацевтической композиции по п. 8 для лечения или предотвращения осложнений в виде кровотечений, связанных с антикоагулянтной терапией с применением прямого ингибитора фактора Ха.
- 25 13. Применение фармацевтической композиции по п. 8 для приготовления лекарственного средства для полного или частичного обращения осложнений в виде кровотечений, связанных с антикоагулянтной терапией с применением прямого ингибитора фактора Ха у субъекта.
- 30 14. Применение по п. 12 или п. 13, отличающееся тем, что прямой ингибитор фактора Ха представляет собой ривароксабан (5-хлор-N-[[[(5S)-2-оксо-3-[4-(3-оксо-4-морфолинил)фенил]-5-оксазолидинил]метил]-2-тиофенкарбоксамид), апиксабан (1-(4метоксифенил)-7-оксо-6-[4-(2-оксопиперидин-1-ил)фенил]-4,5,6,7-тетрагидро-1H-пиразоло[3,4-с]пиридин-3-карбоксамид), эдоксабан (N'-(5-хлоропиридин-2-ил)-N-
35 [(1S,2R,4S)-4-(диметилкарбамоил)-2-[(5-метил-6,7-дигидро-4H-[1,3]тиазоло[5,4-с]пиридин-2-карбонил)амино]циклогексил]оксамида, 4-метилбензолсульфоновая кислота) или бетриксабан (N-(5-хлоропиридин-2-ил)-2-[[4-(N,N-диметилкарбамимидоил)бензоил]амино]-5-метоксибензамид).

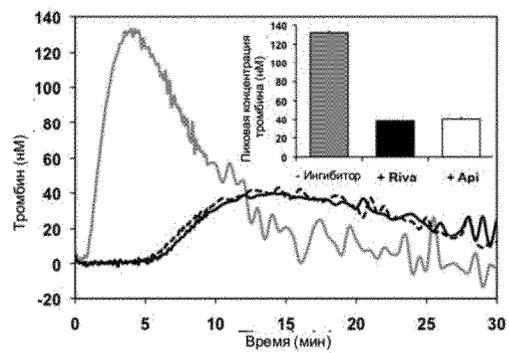
15. Способ полного или частичного обращения антикоагулянтного эффекта прямого ингибитора фактора Ха у субъекта, причем указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества белка по любому из пп. 5 1-4 или фармацевтической композиции по п. 8.
16. Способ по п. 15, отличающийся тем, что прямой ингибитор фактора Ха представляет собой ривароксабан (5-хлор-N-[[[(5S)-2-оксо-3-[4-(3-оксо-4-морфолинил)фенил]-5-оксазолидинил]метил]-2-тиофенкарбоксамид), апиксабан (1-10 (4метоксифенил)-7-оксо-6-[4-(2-оксопиперидин-1-ил)фенил]-4,5,6,7-тетрагидро-1H-пиразоло[3,4-с]пиридин-3-карбоксамид), эдоксабан (N'-(5-хлоропиридин-2-ил)-N-[(1S,2R,4S)-4-(диметилкарбамоил)-2-[(5-метил-6,7-дигидро-4H-[1,3]тиазоло[5,4-с]пиридин-2-карбонил)амино]циклогексил]оксамида, 4-метилбензолсульфоновая кислота) или бетриксабан (N-(5-хлоропиридин-2-ил)-2-[[4-(N,N-15 диметилкарбамимидоил)бензоил]амино]-5-метоксибензамид).



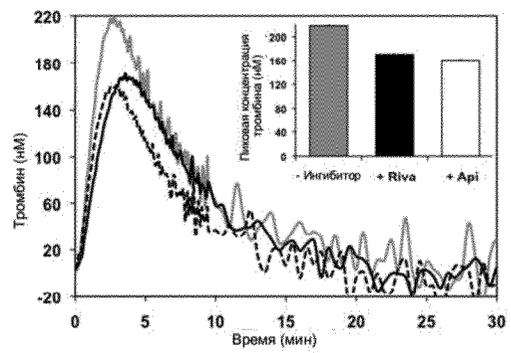
Фиг. 1



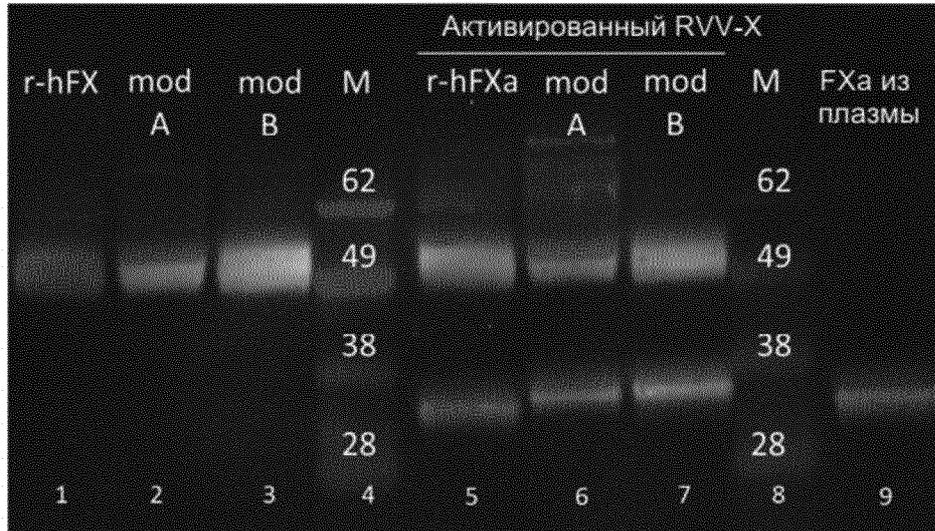
Фиг. 2А



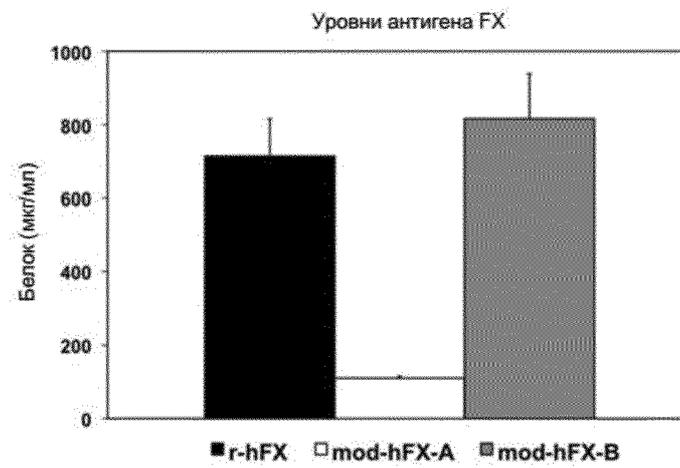
Фиг. 2В



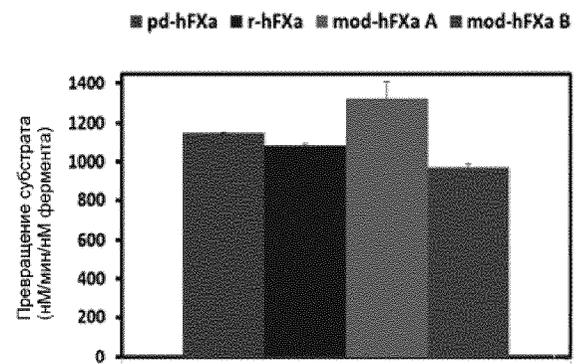
Фиг. 2С



Фиг. 3А

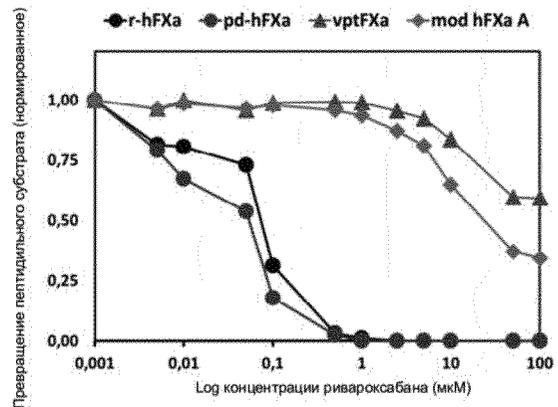


Фиг. 3В

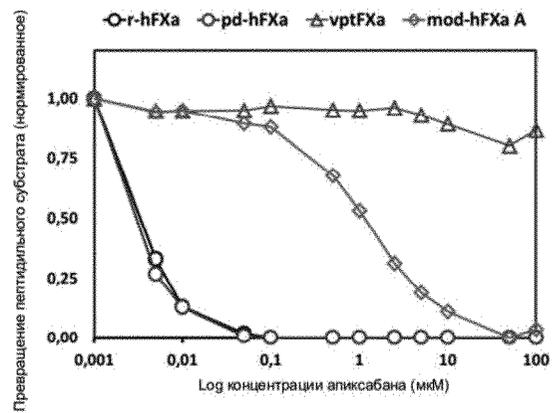


Фиг. 4

6/17

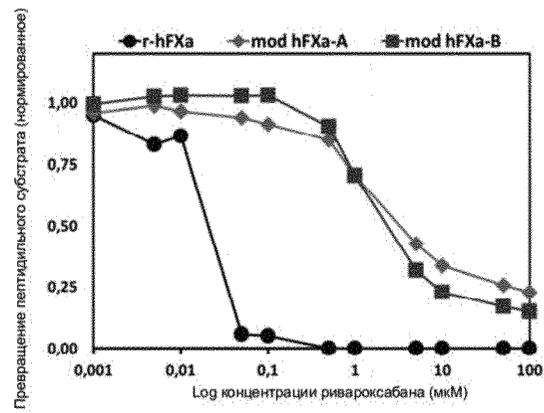


Фиг. 5А

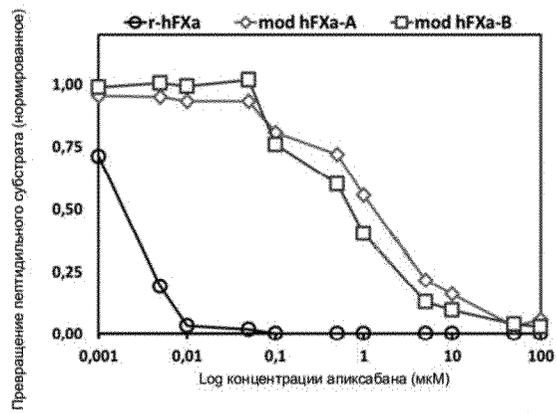


Фиг. 5В

7/17

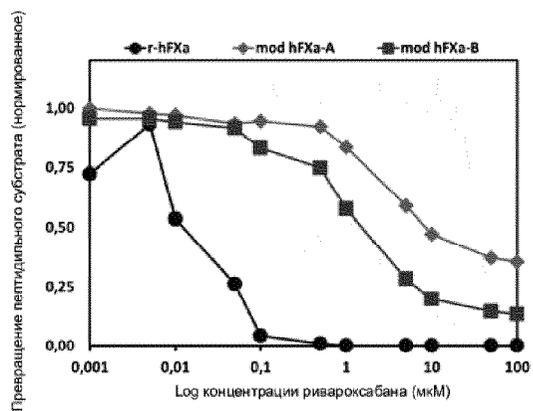


Фиг. 6А

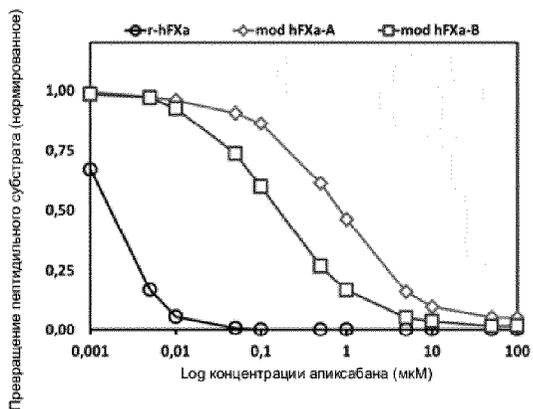


Фиг. 6В

8/17



Фиг. 7А



Фиг. 7В

HUM MORPLHLVLLSASLAGLLLLGESLFIRREQANNILARVTRANSFLEEMKKGHLERECMEETCSYEEAREVFEEDSDKTNEF 80
 MUS MGSEVQLSLLCVVLASLLLPKGVFINRERANNVLARTRRANSFPEEFKKNLERECMEBICSYEEVREIFEDDEKTKEY 80
 Xtr MAGQTCIIILIALPAVLLQQSPNVFLKHENAHNIL RAKRANSAFEEFKKNLERECYEERCSLEEAREVFEENEQTREF 79
 Dre MS WVFVNFISLFTVTHSVCAE VFLNTRDANQVLRQRANSLFPEEMKGNMERECEIERRCNVEEAREIFEDVKKTDEF 77
 Tru MFRLF FIA FLDKGTASQLLSRQRANSLFEEVKQGNMERECEEHCSEEAREIFEDDDQITNEF 64
 Pte1 MAPQLLLCLILTLFVLSLPEAESNVFLKSKVANRFLQRTKRANSLFEEFKSGNIERECIEERCSKEEAREAFEDDEKTTF 80
 Pte2 MAPQLLLCLILTLFVLSLPEAESNVFLKSKVANRFLQRTKRANSLVEEFKSGNIERECIEERCSKEEAREAFEDDEKTTF 80
 Pte3 MAPQLLLCLILTLFVLSLPEAESNVFLKSKVANRFLQRTKRANSLVEEFKSGNIERECIEERCSKEEAREAFEDDEKTTF 80
 Nac MAPQLLLCLILTLFVLSLPEAESNVFLKSKVANRFLQRTKRANSLFEEIRPGNIERECIEEKCSKEEAREVFEEDNEKTTF 80
 Консенсусная F A L R R NS EE G EREC EE C EE RE FE T

WNKYKDG DQCETSPCQNGKCKDGLGEYTCCTLEGFEGKNCELFTRKLCSLDNGDCDQFCHEEQNSVVCSCARGYTLADNGKACIPTGP 169
 WTKYKDG DQCESSPCQNGACRDGIGGYTCTCSGFEFGKNCELFVRKLCRLDNGDCDQFCREEQNSVVCSCASGYPLGNDGKSCISTAP 169
 WSKYFDG DQCQSNPCQYGGSCNDGINEYTCCLNAGFEGKNCEIVKQLCCLNNGECDQYCKAVDRDVVCSCTNGYILGNGKSCLPTEK 168
 WHKYVDGKNAICLSHPCVNGGQCKDAIGPYTCFCQQGFKGYNCEIIVIPQLCENENGGCEHFCKVVRGNVRCSCADGYELGPDDKSCQSNET 167
 WAIYYDG DACKSTPCVNGRCKDGIYSYTCFCLSGYQGFNCEIIVIPQLCENENGGCEHFCKVVRGNVRCSCADGYELGPDDKSCQSNET 153
 WNVYVDG DQCSSNPFCHYRGICKDGIGSYTCCLSGYEGKNCEYVLYKSCRVDNGDCWHFCKPVQNGIQCSCAESYLLGEDGHSCVAGGD 169
 WNVYVDG DQCSSNPFCHYRGICKDGIGSYTCCLSGYEGKNCEYVLYKSCRVDNGDCWHFCKPVQNGIQCSCAESYLLGEDGHSCVAGGD 169
 WNVYVDG DQCSSNPFCHYRGICKDGIGSYTCCLSGYEGKNCEYVLYKSCRVDNGDCWHFCKPVQNGIQCSCAESYLLGEDGHSCVAGGD 169
 WNVYVDG DQCSSNPFCHYRGICKDGIGSYTCCLPNYEGKNCEKVLVYQSCRVDNGDCWHFCKRVQSETQCSCAESYLLGEDGHSCVAEGD 169
 W Y DG C PC G C D YTC C G NCE C NG C CSC Y L C

9/17

Фиг. 8

YPCG	KQTLERRKRSVAQATS	SSGEAPDSITWKPYDAADLD	PTENPFLLDFNQTPERGDNNLTRIVGGQECKD	243
FPCG	KITTGRRKRSVALNTS	DSELDLEDALL DEDFLS	PTENPIELLNLNETQPERSSDDLVRIVGGRECKD	240
YSCG	RRHMKRERRETKLHEN	DKKNHTDSQNEVKMNQTGTL	PERNVGTGINILN P NDPNVRIVGGRECSQ	236
FKCGVIYP	KKTRSIFFHTEFNITSENEEETELEATIEFVYNHSNPLNNQTDSM		FGLHELEIIQEEFILPVVSTAGDGRIVNGVECPF	254
PRCGGIIT	ENVRTILRYRPNTNTNGTKSDNSSSTNSTEQEDEFSSGTSQ		RKAHAASDHEMSTMT RIVNGEDCPP	228
FSCG	RNIKTRNKREANLPDPQTDFSDDYDEIDENNFBVETPTNFSGLVLTV		QSQNATLLKKSNDPSPD IRVNGTDCKL	247
FSCGRNIKTRNKREANLPDF			VQSQNATLLKKSNDPSPD IRVNGMDCKL	218
FSCGRNIKTRNKREASLPDF			VQSQNAPLLKISNDPSPD IRVNGMDCKL	218
FSCGRNIKARNKREASLPDF			VQSQKATLLKKSNDPSPD IRVNGMDCKL	218
CG			R V G C	
GECPWQALLINEENEGFCGGTILSEFYILTAACHLYQAKRFKVRVGDNRNTEQEBEGGEAVHEVEVVIKHNRFKE				TYD 320
GECPWQALLINEDNEGFCGGTILNEFYILTAACHLHQARRFKVRVGDNRNTEKEEGNEMVHEVDVVIKHNKFPQRD				TYD 317
GECPWQALLVSDEDEGFCGGTILSREFILTAACHMNQTKYFKVVVGE LN TKI SEGTESIHKVEKIIMHPRFVKS				TYD 313
GDCPWQALLINENMGMFCGGTILTEHFILSAAHCMNESLSIRVVVGEYDTLVPEGREATHDVDEILIHKNVQPD				TYH 331
GECPWQAVLLNEEHHWFCCGGTILNPNYILTAACHMNETRYFYIRLGESDMLNENEGTEAMYEVEVETILAHYVVKPN				TYH 305
GECPWQALLNDEGDGFCGGTILSPIYVLTAAHCINQTKYITVVVGEIDISSKKTGR LHSVDKIYVHVKFVPA				TYD 323
GECPWQAALVDEKEGVFCGGTILSPIYVLTAAHCINETETISVVVGEIDKSRLETGP LLSVDKIYVHKKFVPPQKAYKFDLA				AYD 303
GECPWQAALVDDKKGVFCGGTILSPIYVLTAAHCINETETISVVVGEIDRSRAETGP LLSVDKVYVHKKFVPPKKSQEPYKFDLVSYD				307
GECPWQAVLINEKEGVFCGGTILSPIHVLTAAHCINQTKSVSVIVGEIDISRKETRR LLSVDKIYVHTKFVPPNYIYVHQNFDRV				AYD 306
G CPWQA L	FCGGTIL	L AAHC	<u>G</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>H</u>	<u>YD</u>

10/17

Фиг. 8, продолж.

```

FDIAVLRRLKTPITFRMNVAPACLPERDWAESTLMTQKTGIVSGFGRTHEKGRQSTRLKMLEVYVDRNSCKLSSSFIITQNMFCAGYDTK 410
YDIAVLRRLKTPITFRMNVAPACLQKDWAEESTLMTQKTGIVSGFGRTHEKGRQSNILKMLEVYVDRNTCKLSTSPSITQNMFCAGYEAK 407
YDIAVIKLEAINFTENIIPACIPDFEFADQVLMNEPDAMVSGFGRHERGRQASTLQMLQVPYIKRHSCKESSTFAITENMFCAGFDTE 403
NDIALIKLSKPIKFTKYIIPACLPEMKFAERVLMOQDDGLVSGFGRVREGGLSSTILQKLTVPYVNRACIESSNFKISGRMPCAGYDQE 421
NDIALIKLTKPIKYSRFLPACIPBQEFAESVLMQQSDGMISGFGRLLGGNRQTSPIILKRLTIPYVERRTCMESTSLRISARMFCAGYDEI 395
YDIAIIQLKTPIQFSENVVPACLPTADFANQVLMKQNFIVSGFGRTRERGRKTSNTLKVVTLPYVDRHTCMLSSNFPITQNMFCAGYDTL 413
YDIAIIQMKTPIQFSENVVPACLPTADFANQVLMKQDFIVSGFGRIFEKGPKSKTLKVLKVPYVDRHTCMVSSETPITPMFCAGYDTL 393
YDIAIIQMKTPIQFSENVVPACLPTADFANQVLMKQDFIVSGFGRIFERGPNSKTLKVLKVPYVDRHTCMLSSNFPITPMFCAGYDTL 397
YDIAIIRMKTPIQFSENVVPACLPTADFANEVLMKQDSGIVSGFGRIRFKEPTSNLTKVITVPYVDRHTCMLSSDFRITQNMFCAGYDTL 396
DIA      I      PAC P      A      LM      SGFG      L      PY R C S      I      MPCAG

QEDACQDSSGGPHVTRFKDITYFVTGIVSWGEGCARKGKYGIYTKVTAFLKWIDRSMKTRGLPKAKSHAPEVITSSPLK      488
LEDACQDSSGGPHVTRFKNTYYVVTGIVSWGEGCARKGKYGIYTKVTTFLKWIDRSMKARVGPETAET      PRTA      GPPN      481
VKDACQDSSGGPHVTPFKGTYYFVTGIVSWGEGCARKGKFGVYTKVSKLHRWLKGVLLKKNQV      464
EKDACQDSSGGPHVTRFKNTWPFITGVVVLGRRVRAQ      GE      IRRLHTGLQIHVVQ      474
AKDACQDSSGGPHVTRYSTYFITGIVSWGEGCAQKGYGVYTVQVSKYIRWIRDGINTLIPKQSTRLKRHYGPIRRIVG      475
PQDACQDSSGGPHITAYRDTHFITGIVSWGEGCAQTGKYGVYTKVSKFILWIKRIIRQKQPSTESSTGRL      483
PRDACQDSSGGPHITVYRDTHFITGIVSSGEGCARKGKYGIYTKLSKFIPIWIKRIMRQKLPSTESSTGRL      463
PQDACQDSSGGPHITAYRDTHFITGIVSWGEGCARKGKYGIYTKLSKFIPIWI      449
PQDACQDSSGGPHITAYRDTHFITGIIISWGEGCARKGKYGVYTKVSRFIPWIKKIMSLK      455
DACQDSSGGPH      T      T      TG      G      G

```

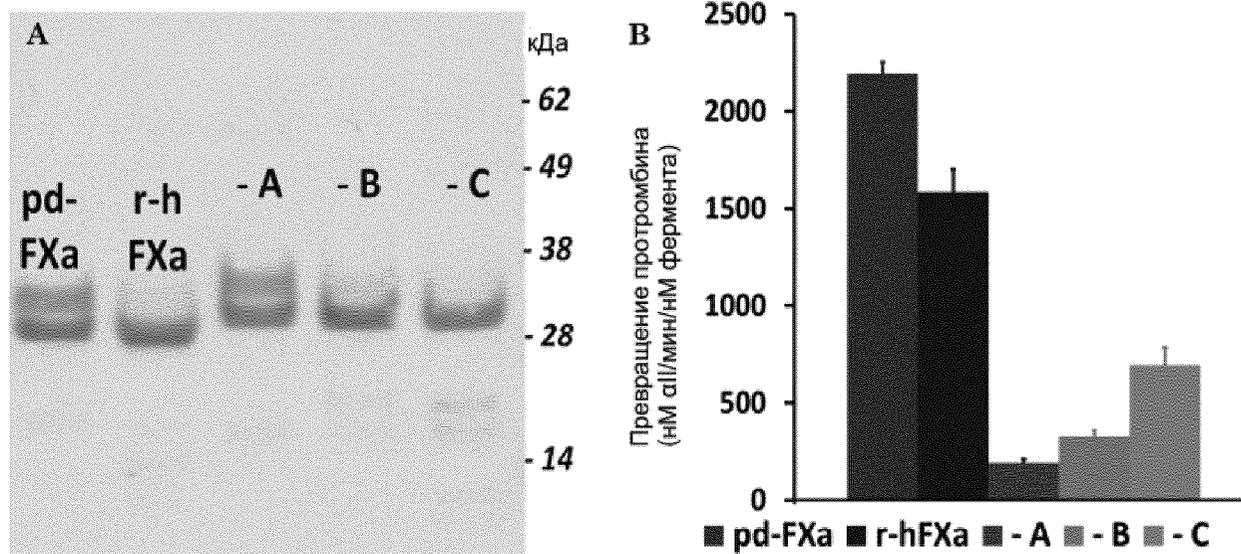
11/17

Фиг. 8, продолж.

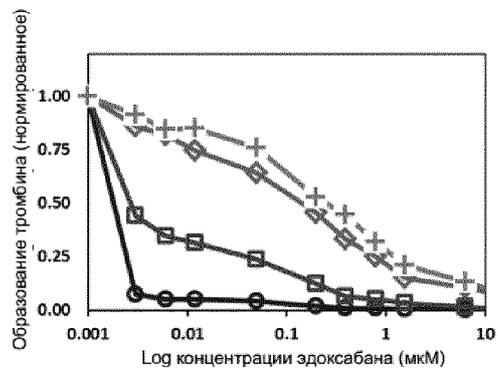
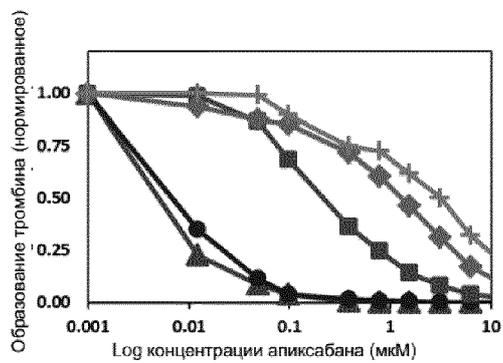
Фиг. 9

hFX: H₉₁ - NRFTK-----ET - Y₉₉
c-FX A: H₉₁ - KKFVPPKKSQEFYEKFDLAA - Y₉₉
c-FX B: H₉₁ - KKFVPPNYYYV-HQNFDLAA - Y₉₉
c-FX C: H₉₁ - KKFVPPQKAYK----FDLAA - Y₉₉

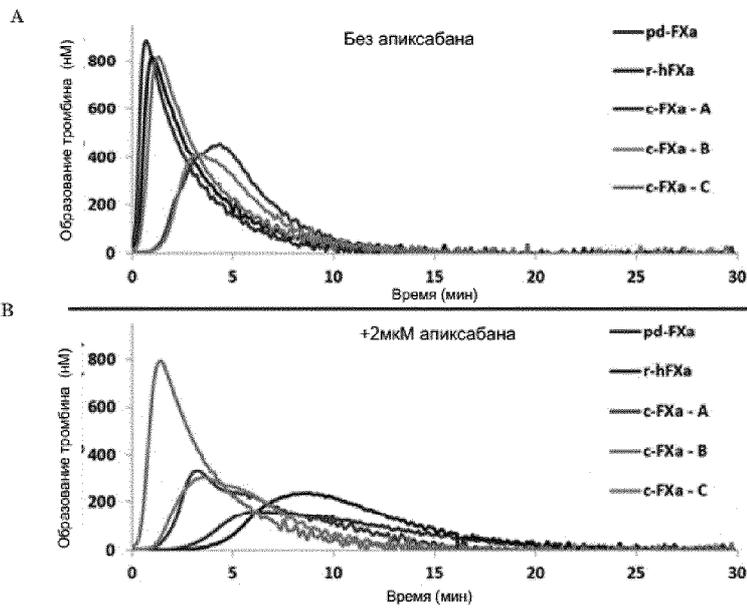
Фиг. 10



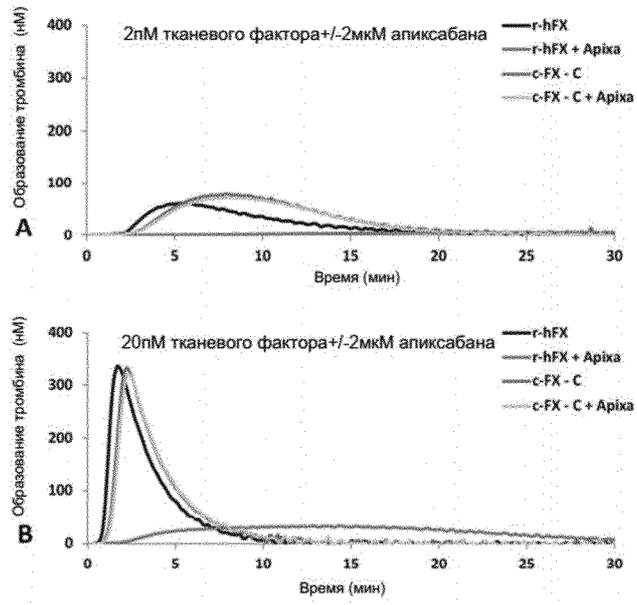
Фиг. 11



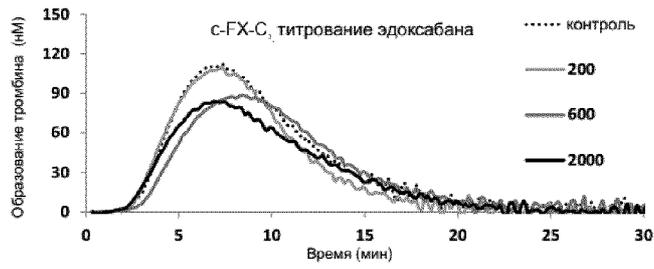
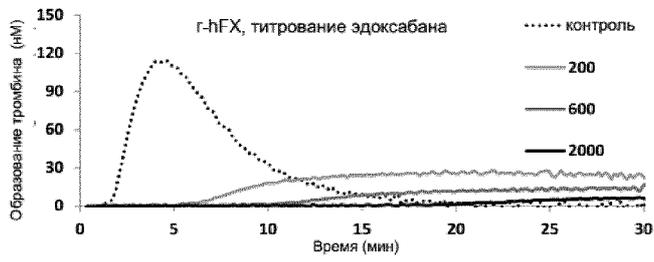
Фиг. 12



Фиг. 13



Фиг. 14



ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

202190813**А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

C07K 14/46 (2006.01)
C07K 14/745 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
 C07K 14/46, 14/745, C12N 9/64, A61K 38/48, A61P 7/02, 7/04

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
A	LU Genmin et al. A specific antidote for reversal of anticoagulation by direct and indirect inhibitors of coagulation factor Xa. Nature medicine, 2013 doi:10.1038/nm.3102, реферат	1-16
A	BOS Mettine H.A. et al. Procoagulant Adaptation of a Blood Coagulation Prothrombinase-like Enzyme Complex in Australian Elapid Venom. Toxins, 2010, Vol. 2, pp.1554-1567 doi:10.3390/toxins2061554, реферат	1-16
A	CHUANG Yung-Jen et al. Heparin Enhances the Specificity of Antithrombin for Thrombin and Factor Xa Independent of the Reactive Center Loop Sequence. The Journal of Biological Chemistry, 2001, Vol. 276, No. 18, Issue of May 4, pp. 14961-14971, реферат	1-16

 последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

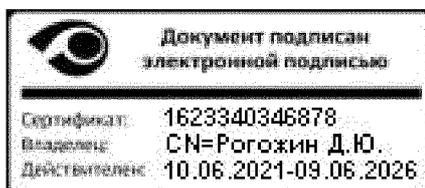
«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **01/11/2021**

Уполномоченное лицо:
 Начальник Управления экспертизы

Д.Ю. Рогожин