

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202191726** (13) **A2**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.30

(22) Дата подачи заявки
2010.12.06

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

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

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

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

(33) US

(62) 201691109; 2010.12.06

(71) Заявитель:
**БИОВЕРАТИВ ТЕРАПЬЮТИКС
ИНК. (US)**

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

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

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

202191726

A2

A2

202191726

ХИМЕРНЫЕ И ГИБРИДНЫЕ ПОЛИПЕПТИДЫ ФАКТОРА VIII-Fc И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Область техники

Настоящее изобретение относится в основном к области терапии гемостатических нарушений.

Уровень техники

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

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

Лечение гемофилии А заключается в заместительной терапии, нацеленной на восстановление активности FVIII до 1-5 % от нормальных уровней с целью предотвращения спонтанного кровотечения (Mannucci, P.M., et al., N. Engl. J. Med. 344:1773-1779 (2001), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки). Имеются продукты, представляющие собой получаемый из плазмы

или рекомбинантный FVIII, которые доступны для лечения эпизодов кровотечения в случае необходимости или для предотвращения возникновения эпизодов кровотечения с помощью профилактического лечения. Исходя из периода полувыведения этих продуктов, режимы лечения требуют частого внутривенного введения. Такое частое введение болезненно и доставляет неудобства.

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

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

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

Интервал между введениями доз может быть, по меньшей мере, примерно в полтора – шесть раз длиннее, в полтора – пять раз длиннее, в полтора – четыре раза длиннее, в полтора – три раза длиннее или в полтора – два раза длиннее, чем интервал

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

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

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

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

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

Лечение по необходимости включает лечение при эпизоде кровотечения, гемартрозе, кровоизлиянии в мышцу, кровоизлиянии в ротовой полости, кровотечении, кровотечении в мышцах, кровотечении в ротовой полости, травме, травме головы, кровотечении в желудочно-кишечном тракте, внутричерепном кровотечении,

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

В случае лечения по необходимости интервал между введениями доз указанного химерного полипептида составляет примерно один раз каждые 24-36, 24-48, 24-72, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 или 72 ч или более длинный интервал.

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

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

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

Фактор VIII (или соответствующая фактору VIII часть химерного полипептида) может являться фактором VIII человека или фактором VIII организма, отличного от человека, например, фактором VIII свиньи, мыши или собаки. Фактор VIII (или

соответствующая фактору VIII часть химерного полипептида) может иметь полную или частичную делецию домена В.

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

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

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

последовательности Fc, приведенной в таблице 2 (аминокислоты с 1439 по 1665 в составе SEQ ID NO: 2; аминокислоты с 2333 по 2559 в составе SEQ ID NO: 6; аминокислоты с 741 по 967 в составе SEQ ID NO: 8; аминокислоты с 746 по 972 в составе SEQ ID NO: 10; аминокислоты с 685 по 924 в составе SEQ ID NO: 12).

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

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

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

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

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

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ /ФИГУР

ФИГ. 1. Схематическое изображение мономера rFVIII_{Fc}.

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

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

ФИГ. 4. WBCT при введении rFVIII_{Fc} и РеФакто[®] собакам с гемофилией А (А) rFVIII_{Fc}. (В) РеФакто[®] и затем rFVIII_{Fc} в перекрестном исследовании.

ФИГ. 5. Фармакокинетика при внутривенном введении rFVIII_{Fc} и РеФакто[®] собакам с гемофилией А (измеренная методом ELISA).

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

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

ФИГ. 8. Кривые зависимости индивидуальных значений концентрации в плазме от времени для rFVIII_{Fc} и Ксинта после введения разовой внутривенной дозы (125 МЕ/кг) яванским макакам (n = 6, среднее ± Ст. откл.) Концентрации в плазме определяли с помощью ELISA. (А) rFVIII_{Fc} согласно данным ELISA. (В) Ксинта согласно данным ELISA.

ФИГ. 9. Групповое среднее значение хромогенной активности в плазме после введения разовой внутривенной дозы (125 МЕ/кг) rFVIII_{Fc} и Ксинта яванским макакам

(n = 6, среднее $\pm$ Ст. откл.) Активность FVIII измеряли с применением хромогенного анализа активности, специфичной для FVIII.

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

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

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

ФИГ. 13. Зависимость наблюдаемого группового среднего значения активности FVIII ($\pm$ станд. ошибка) (одноэтапный анализ, 25 МЕ/кг (А) или 65 МЕ/кг (В); и хромогенный анализ, 25 МЕ/кг (С) или 65 МЕ/кг (D)) от времени.

ФИГ. 14. Зависимость наблюдаемого группового среднего значения активности FVIII ($\pm$ станд. ошибка) (одноэтапный анализ (А) или хромогенный анализ (В)) от времени.

ДЕТАЛЬНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

Лечение гемофилии А заключается в заместительной терапии, нацеленной на восстановление активности FVIII до 1-5 % от нормальных уровней с целью предотвращения спонтанного кровотечения (Mannucci, P.M., et al., N. Engl. J. Med. 344:1773-9 (2001), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки). Имеются продукты, представляющие собой получаемый из плазмы или рекомбинантный FVIII, которые доступны для лечения эпизодов кровотечения в случае необходимости или для предотвращения возникновения эпизодов кровотечения с помощью профилактического лечения. Исходя из периода полувыведения этих

продуктов (10-12 ч) (White G.C., et al., *Thromb. Haemost.* 77:660-7 (1997); Morfini, M., *Haemophilia* 9 (suppl 1):94-99; discussion 100 (2003)), режимы лечения требуют частого внутривенного введения, обычно от двух до трех раз в неделю для профилактических целей и от одного до трех раз в день в случае лечения по необходимости (Manco-Johnson, M.J., et al., *N. Engl. J. Med.* 357:535-544 (2007)), содержание каждой из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки. Такое частое введение болезненно и доставляет неудобства.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

«Фактор VIII с делетированным В-доменом» может содержать полные или частичные делеции, раскрытые в патентах США №№ 6 316 226, 6 346 513, 7 041 635, 5 789 203, 6 060 447, 5 595 886, 6 228 620, 5 972 885, 6 048 720, 5 543 502, 5 610 278, 5 171 844, 5 112 950, 4 868 112 и 6 458 563, содержание каждого из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки. В некоторых вариантах воплощения последовательность фактора VIII с делетированным В-доменом по настоящему изобретению включает любую одну делецию из раскрытых, начиная со столбца 4, строки 4 по столбец 5, строку 28 и в примерах 1–5 в патенте США № 6 316 226 (также в патенте США № 6 346 513). В некоторых вариантах воплощения фактор VIII с делетированным В-доменом по настоящему изобретению содержит делецию, раскрытую в столбце 2, строках 26–51 и примерах 5–8 в патенте США № 5 789 203 (также в патентах США №№ 6 060 447, 5 595 886 и 6 228 620). В некоторых вариантах воплощения фактор VIII с делетированным В-доменом содержит делецию, описанную начиная со столбца 1, строка 25 по столбец 2, строка 40 в патенте США № 5 972 885; в столбце 6, строках 1–22 и примере 1 в патенте США № 6 048 720; в столбце 2, строки 17–46 в патенте США № 5 543 502; начиная со столбца 4, строка 22 по столбец 5, строка 36 в патенте США № 5 171 844; в столбце 2, строки 55–68, на фигуре 2 и в примере 1 в патенте США № 5 112 950; начиная со столбца 2, строка 2 по столбец 19, строка 21 и в

таблице 2 в патенте США № 4 868 112; начиная со столбца 2, строка 1 по столбец 3, строка 19, начиная со столбца 3, строка 40 по столбец 4, строка 67, начиная со столбца 7, строка 43 по столбец 8, строка 26 и начиная со столбца 11, строка 5 по столбец 13, строка 39 в патенте США № 7 041 635; или в столбце 4, строки 25-53 в патенте США № 6 458 563. В некоторых вариантах воплощения фактор VIII с делетированным В-доменом имеет делецию большей части В-домена, но все-таки содержит аминоконцевые последовательности В-домена, которые существенны для протеолитического процессинга *in vivo* первичного продукта трансляции с образованием двух полипептидных цепей, как описано в WO 91/09122, содержание которой целиком включено сюда в качестве ссылки. В некоторых вариантах воплощения фактор VIII с делетированным В-доменом сконструирован с делецией аминокислот 747-1638, т.е., с фактически полной делецией В-домена. Hoesben R.C., *et al*, *J. Biol. Chem.* 265 (13): 7318-7323 (1990), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки. Фактор VIII с делетированным В-доменом также может содержать делецию аминокислот 771-1666 или аминокислот 868-1562 факторов VIII. Meulien P., *et al*, *Protein Eng.* 2(4): 301-6 (1988), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки. Дополнительные делеции В-домена, которые являются частью изобретения, включают, например: делецию аминокислот с 982 по 1562 или с 760 по 1639 (Toole et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1986) 83, 5939-5942)), с 797 по 1562 (Eaton, et al. *Biochemistry* (1986) 25:8343-8347)), с 741 по 1646 (Kaufman (опубликованная заявка PCT № WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver, et al., *DNA* (1987) 6:553-564)), с 741 по 1648 (Pasek (заявка PCT № 88/00831)), с 816 по 1598 или с 741 по 1689 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988) № 82:16-25, EP 295597))), содержание каждой из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки. Каждая из вышеупомянутых делеций может быть внесена в любую последовательность фактора VIII.

«Химерный полипептид» при использовании в этом документе означает полипептид, который содержит в своем составе, по меньшей мере, два полипептида (или подпоследовательности, или пептида) из разных источников. Химерные полипептиды могут включать, например, два, три, четыре, пять, шесть, семь или более полипептидов из разных источников, таких как разные гены, разные кДНК или разные животные или другие биологические виды. Химерные полипептиды могут включать, например, один или несколько линкеров, соединяющих различные подпоследовательности. Таким образом, подпоследовательности могут быть соединены непосредственно, или они могут соединяться опосредованно, через линкеры, или обоими способами в пределах

единого химерного полипептида. Химерные полипептиды могут включать, например, дополнительные пептиды, такие как сигнальные последовательности и такие последовательности, как 6His и FLAG, которые помогают осуществлять очистку и детекцию белка. Кроме того, химерные полипептиды могут иметь дополнительные аминокислоты или пептид на N- и/или C- концах.

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

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

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

Как обсуждалось выше, примеры химерных полипептидов включают фактор VIII, сшитый с одним или несколькими полипептидами XTEN. Schellenburger et al., *Nat. Biotech.* 27:1186-90 (2009), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки. Фактор VIII может быть сшит либо с N-концом полипептида XTEN, либо с C-концом полипептида XTEN, при условии, что соответствующий фактору VIII компонент химерного белка фактора VIII-XTEN может подвергаться процессингу протеазой с образованием полипептида, содержащего процессированный фактор VIII. Для того чтобы такой процессинг был возможен, сайт для расщепления протеазой может

располагаться между соответствующей XTEN частью и соответствующей фактору VIII частью. Полипептиды XTEN включают, например, полипептиды, описанные в WO 2009/023270, WO 2010/091122, WO 2007/103515, US 2010/0189682 и US 2009/0092582, содержание каждой из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки.

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

В некоторых вариантах воплощения химерный полипептид, включающий соответствующую фактору VIII часть, имеет увеличенный период полувыведения ($t_{1/2}$), по сравнению с полипептидом, состоящим из той же соответствующей фактору VIII части без отличной от фактора VIII части. Химерный полипептид фактора VIII с увеличенным $t_{1/2}$ может называться в этом документе фактором VIII длительного действия. Химерные полипептиды фактора VIII длительного действия включают, например, фактор VIII, сшитый с Fc (в том числе, например, химерные полипептиды фактора VIII в форме гибрида, такого как димерный гибрид из мономеров FVIII_{Fc}; см. пример 1, Фиг. 1, и Таблицу 2A; и патенты США №№ 7 404 956 и 7 348 004), фактор VIII, сшитый с XTEN, и фактор VIII, сшитый с альбумином.

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

«Фактор VIII» при использовании в этом документе означает полипептид функционального фактора VIII в его нормальной роли при свертывании крови, если не указано иначе. Таким образом, термин фактор VIII включает варианты полипептиды, которые являются функционально активными. Предпочтительными белками фактора

VIII являются белки фактора VIII человека, свиньи, собаки и мыши. Как описано в разделе «Предпосылки создания изобретения», известны последовательности полноразмерных полипептидов и полинуклеотидов, а также множество функциональных фрагментов, мутантных и модифицированных вариантов. Примеры последовательностей фактора VIII человека показаны как подпоследовательности в SEQ ID Nos: 2, 6, 8, 10 и 12 (Таблица 2). Полипептиды фактора VIII включают, например, полноразмерный фактор VIII, полноразмерный фактор VIII без Met на N-конце, зрелый фактор VIII (без сигнальной последовательности), зрелый фактор VIII с дополнительным Met на N-конце и/или фактор VIII с полной или частичной делецией В-домена. Предпочтительные варианты фактора VIII содержат делеции В-домена, либо частичные, либо полные делеции.

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

Ген фактора VIII человека был изолирован и экспрессирован в клетках млекопитающих (Toole, J. J., et al, *Nature* 312:342-347 (1984); Gitschier, J., et al., *Nature* 312:326-330 (1984); Wood, W. I., et al., *Nature* 312:330-337 (1984); Vehar, G. A., et al, *Nature* 312:337-342 (1984); WO 87/04187; WO 88/08035; WO 88/03558; патент США № 4 757 006), содержание каждого из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки, и аминокислотная последовательность была выведена из последовательности кДНК. Caron et al. в патенте США № 4 965 199, содержание которого целиком включено сюда в качестве ссылки, раскрывают способ получения с применением рекомбинантных ДНК фактора VIII в клетках-хозяевах, полученных от млекопитающих, и очистки фактора VIII человека. Сообщалось об экспрессии фактора VIII человека в клетках СНО (яичника китайского хомячка) и ВНКС (клетках почки новорожденного хомяка). Были проведены модификации фактора VIII человека с

делецией части или всего В-домена (патенты США №№ 4 994 371 и 4 868 112, содержание каждого из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки), и осуществлена замена В-домена фактора VIII человека на В-домен фактора V человека (патент США № 5 004 803, содержание которого целиком включено сюда в качестве ссылки). Последовательность кДНК, кодирующая фактор VIII человека, и предсказанная аминокислотная последовательность представлены в SEQ ID Nos: 1 и 2, соответственно, в публикации заявки на патент США № 2005/0100990, содержание которой целиком включено сюда в качестве ссылки.

В патенте США № 5 859 204, принадлежащем Lollar, J. S., содержание которого целиком включено сюда в качестве ссылки, сообщается о функциональных мутантных формах фактора VIII, обладающих сниженной антигенностью и уменьшенной иммунореактивностью. В патенте США № 6 376 463, принадлежащем Lollar, J. S., содержание которого целиком включено сюда в качестве ссылки, также сообщается о мутантных формах фактора VIII, обладающих уменьшенной иммунореактивностью. В публикации заявки на патент США № 2005/0100990, принадлежащей Saenko et al., содержание которой целиком включено сюда в качестве ссылки, сообщается о функциональных мутациях в A2-домене фактора VIII.

Ряд функциональных молекул фактора VIII, в том числе с делециями В-домена, раскрыт в следующих патентах США: 6 316 226 и 6 346 513, оба переданы компании Baxter; 7 041 635, переданном компании In2Gen; 5 789 203, 6 060 447, 5 595 886 и 6 228 620, переданных компании Chiron; 5 972 885 и 6 048 720, переданных компании Biovitrum; 5 543 502 и 5 610 278, переданных компании Novo Nordisk; 5 171 844, переданном компании Immuno Ag; 5 112 950, переданном компании Transgene S.A.; 4 868 112, переданном компании Genetics Institute, содержание каждого из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки.

Опубликована последовательность фактора VIII свиньи (Toole, J. J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5939-5942 (1986), содержание которой целиком включено сюда в качестве ссылки), и сообщалось о полноразмерной последовательности кДНК свиньи, полученной в результате ПЦР-амплификации последовательностей фактора VIII из библиотеки кДНК селезенки свиньи (Healey, J. F., et al., Blood 88:4209-4214 (1996), содержание которой целиком включено сюда в качестве ссылки). Гибридные факторы VIII человека/свиньи, содержащие замены всех доменов, всех субъединиц и специфичных аминокислотных последовательностей, были описаны в патенте США № 5 364 771, принадлежащем Lollar и Runge, и в заявке WO 93/20093, содержание которых

целиком включено сюда в качестве ссылки. Позже сообщалось о нуклеотидных и соответствующих аминокислотных последовательностях доменов A1 и A2 фактора VIII свиньи и о химерном факторе VIII, в котором соответствующие домены молекулы человека были заменены на домены A1 и/или A2 свиньи (заявка WO 94/11503, содержание которой целиком включено сюда в качестве ссылки). В патенте США № 5 859 204, принадлежащем Lollar, J. S., также раскрываются последовательности кДНК и выведенные из них аминокислотные последовательности молекулы свиньи. Патент № 6 458 563, содержание которого целиком включено сюда в качестве ссылки, переданный компании Eмогу, раскрывает фактор VIII свиньи с делетированным В-доменом.

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

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

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

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

представлены в WO 2004/101740 и WO 2006/074199, содержание которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки.

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

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

Fc (или соответствующая Fc часть химерного полипептида) может также содержать, например, следующие мутации: Область Fc из молекулы IgG может быть модифицирована с применением хорошо известных методик, таких как сайт-направленный мутагенез и т.п., с получением модифицированных IgG, или фрагментов Fc, или их частей, которые будут связываться с FcRn. Такие модификации включают, например, модификации, отдаленные от сайтов контакта с FcRn, а также модификации в пределах сайтов контакта, которые предотвращают или даже усиливают связывание с FcRn. Например, следующие одиночные аминокислотные остатки в составе Fc из IgG1 человека (Fcγ1) могут быть заменены без существенной потери аффинности связывания Fc с FcRn: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, A330S, P331A, P331S, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A и K447A, где пример P238A представляет собой замену

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

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

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

«Гибридные» полипептиды и белки при использовании в этом документе означают комбинацию химерного полипептида со вторым полипептидом. Химерный полипептид и второй полипептид в гибриде могут быть связаны друг с другом посредством белок-белковых взаимодействий, таких как электростатические или гидрофобные взаимодействия. Химерный полипептид и второй полипептид в гибриде могут быть связаны друг с другом посредством дисульфидной или другой ковалентной связи (или связей). Гибриды описаны в WO 2004/101740 и WO 2006/074199, содержание каждой из которых целиком включено сюда в качестве ссылок. См. также патенты США №№ 7 404 956 и 7 348 004, содержание каждого из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки. Этот второй полипептид может являться второй копией того же самого химерного полипептида или может представлять собой неидентичный химерный полипептид. См., например, Фиг. 1, Пример 1 и Таблицу 2. В предпочтительных вариантах воплощения второй полипептид является полипептидом, включающим Fc. В предпочтительных вариантах воплощения химерный полипептид является химерным полипептидом фактора FVIII-Fc и второй полипептид в существенной степени состоит из Fc, например, гибридный полипептид из Примера 1, который является рекомбинантным химерным белком rFVIII_h, состоящим из единичной молекулы рекомбинантного FVIII человека с делетированным В-доменом (BDD-rFVIII), сшитой с димерным Fc-доменом из молекулы IgG1 человека, без вставочной линкерной последовательности. Этот гибридный полипептид называется в

этом документе химерным белком FVIII_{Fc} и мономерного Fc, мономерным гибридом FVIII_{Fc}, гибридом мономерного FVIII_{Fc} и FVIII_{Fc}-мономер-димером. См. Пример 1, Фиг. 1 и Таблицу 2А. В примерах приведены результаты доклинических и клинических испытаний этого гибридного полипептида.

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

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

клонировали ниже по течению от второго промотора, EF1 α , в экспрессионном векторе pBUDCE4.1.

Экспрессионный вектор для rFVIII Fc трансфецировали в клетки эмбриональной почки человека 293 (HEK293H; Invitrogen), применяя реагент для трансфекции Липофектамин 2000 (Invitrogen). Клеточные линии со стабильными клонами были получены с помощью селекции зеоцином (Invitrogen). Одну клеточную линию клонов, 3C4-22, применяли для получения FVIII Fc с целью определения его характеристик *in vivo*. Рекомбинантный FVIII Fc получали и подвергали очистке (McCue et al. 2009) в компании Biogen Idec (Кембридж, Массачусетс, США). Ожидалось, что описанная выше стратегия трансфекции обеспечит выход трех продуктов, т.е., мономерных гибридов rFVIII Fc , димерных гибридов rFVIII Fc и димерных Fc. Однако в кондиционированной среде, полученной от этих клеток, практически не детектировался димерный гибриды rFVIII Fc . Кондиционированная среда в основном содержала Fc и мономерный гибриды rFVIII Fc . Возможно, размер димерного гибрида rFVIII Fc слишком велик, и это препятствует эффективной секреции из клетки. Этот результат был благоприятным, так как он позволил упростить процесс очистки мономера, по сравнению с ситуацией, когда присутствовали бы все три белка. Материал, который применяли в данных исследованиях, обладал специфичной активностью примерно 9000 МЕ/мг.

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

Интервал между введениями доз при введении химерного полипептида фактора VIII, например, химерного полипептида фактор VIII-Fc (полипептида, включающего фактор VIII, или гибрида) по изобретению, может быть, по меньшей мере, примерно в полтора раза более длинным, чем интервал между введениями доз, необходимый для эквивалентного количества указанного фактора VIII без части молекулы, не принадлежащей фактору VIII, например, без части, соответствующей Fc (полипептида, состоящего из указанного фактора VIII). Интервал между введениями доз может быть, по меньшей мере, примерно в полтора – шесть раз длиннее, в полтора – пять раз длиннее, в полтора – четыре раза длиннее, в полтора – три раза длиннее или в полтора – два раза длиннее, чем интервал между введениями доз, необходимый для эквивалентного количества указанного фактора VIII без части молекулы, не принадлежащей фактору VIII, например, без части, соответствующей Fc (полипептида,

состоящего из указанного фактора VIII). Интервал между введениями доз может быть, по меньшей мере, примерно в полтора, два, два с половиной, три, три с половиной, четыре, четыре с половиной, пять, пять с половиной или шесть раз длиннее, чем интервал между введениями доз, необходимый для эквивалентного количества указанного фактора VIII без части молекулы, не принадлежащей фактору VIII, например, без части, соответствующей Fc (полипептида, состоящего из указанного фактора VIII). Интервал между введениями доз может составлять примерно каждые пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать, тринадцать или четырнадцать дней или с более. Интервал между введениями доз может составлять, по меньшей мере, примерно от полутора до 5, полтора, 2, 3, 4 или 5 дней или более. В случае лечения по необходимости интервал между введениями доз указанного химерного полипептида или гибрида составляет примерно один раз каждые 24-36, 24-48, 24-72, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 или 72 ч или через более длинный интервал.

Предпочтительно, эффективная доза составляет 25-65 МЕ/кг (25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 62, 64 или 65 МЕ/кг) и интервал между введениями доз составляет один раз каждые 3-5, 3-6, 3-7, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 или более дней, или три раза в неделю, или не чаще, чем три раза в неделю. Предпочтительно, эффективная доза составляет 65 МЕ/кг, и интервал между введениями доз составляет один раз в неделю, или один раз каждые 6-7 дней.

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

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

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

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

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

$t_{1/2}$ -бета (активность) у указанного субъекта составляет примерно 11-26,4 ч;

удельная степень извлечения (значение K) (активность; наблюдаемая) у указанного субъекта составляет примерно 1,38-2,88 МЕ/дл на МЕ/кг;

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

«Лечение по необходимости» при использовании в этом документе означает лечение, которое проводится в течение короткого периода времени и в ответ на существующее состояние, такое как эпизод кровотечения, или при осознанной необходимости, например, при плановой хирургической операции. Состояния, которые могут требовать проведения лечения по необходимости, включают, например, эпизод

кровотечения, гемартроз, кровоизлияние в мышцу, кровоизлияние в ротовой полости, кровотечение, кровотечение в мышцах, кровотечение в ротовой полости, травму, trauma capitis (травму головы), кровотечение в желудочно-кишечном тракте, внутричерепное кровотечение, внутрибрюшное кровотечение, внутригрудное кровотечение, перелом кости, кровоизлияние в центральной нервной системе, кровотечение в заглоточной области, кровотечение в забрюшинной области или кровотечение во влагалище подвздошно-поясничной мышцы. Субъекту может быть необходима хирургическая профилактика, периоперационное лечение или лечение повреждений, возникших при проведении хирургического вмешательства. Такие хирургические операции включают, например, малое хирургическое вмешательство, обширное оперативное вмешательство, удаление зуба, удаление миндалин, грыжесечение паховой грыжи, синовэктомию, полную замену коленного сустава, краниотомию, остеосинтез, хирургическое вмешательство при травме, внутричерепное хирургическое вмешательство, внутрибрюшное хирургическое вмешательство, внутригрудное хирургическое вмешательство или хирургическую замену сустава.

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

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

«Полинуклеотид» и «нуклеиновая кислота» используются как взаимозаменяемые и означают полимерное соединение, состоящее из ковалентно связанных нуклеотидных остатков. Полинуклеотиды могут представлять собой ДНК, «ДНК», РНК, одноцепочечные или двуцепочечные, векторы, плазмиды, фаги или вирусы. Полинуклеотиды включают, например, таковые, перечисленные в Таблице 1, которые кодируют полинуклеотиды из Таблицы 2 (см. Табл. 1). Полинуклеотиды также включают, например, фрагменты полинуклеотидов из Таблицы 1, например, фрагменты, которые кодируют фрагменты полипептидов из Таблицы 2, такие как фактор VIII, Fc, сигнальную последовательность, 6His и другие фрагменты полипептидов из Таблицы 2.

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

Предпочтительно, профилактический режим «подогнан» для конкретного пациента, предпочтительно, путем определения данных фармакокинетики для каждого пациента и введения фактора VIII по изобретению с интервалом между введениями доз, который обеспечивает поддержание минимального уровня активности FVIII, равного 1-3%. Корректировки могут быть внесены, если субъект испытывает неприемлемые эпизоды кровотечения, определяемые как ≥ 2 спонтанных эпизодов кровотечений в течение непрерывного периода длительностью два месяца. В этом случае корректировка будет нацелена на получение минимальных уровней, равных 3-5%. Предпочтительно, профилактическое лечение приводит к предотвращению и контролю над кровотечением, длительному контролю над кровотечением, длительной защите от кровотечения и/или длительной пользе. Профилактика, например длительная защита, может быть продемонстрирована по повышению AUC в последней точке измерения (AUC-посл.) и снижению клиренса, приводящим к повышению терминального $t_{1/2}$, по

сравнению с FVIII кратковременного действия. Предпочтительно, профилактику демонстрируют по улучшенным показателям $C_{\max}$, улучшенным показателям $T_{\max}$ и/или более высокому значению среднего времени удержания, по сравнению с FVIII кратковременного действия. Предпочтительно, профилактика приводит к отсутствию эпизодов спонтанных кровотечений в течение примерно 24, 36, 48, 72 или 96 ч (например, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 96, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 или 96 ч, предпочтительно в течение 72 ч) после инъекции (например, последней инъекции). Предпочтительно, профилактика приводит к более чем 30% (например, более чем 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 96, 87, 88, 89 или 90%, предпочтительно более чем 50%) среднему снижению среднегодового количества эпизодов кровотечения при режиме дозирования один раз в неделю (например, с дозой 65 МЕ/кг).

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

«Терапевтическая доза» при использовании в этом документе означает дозу, которая позволяет достигнуть терапевтической цели, как описано в этом документе. Вычисление необходимой дозировки фактора VIII основано на эмпирическом наблюдении того, что в среднем 1 МЕ фактора VIII на килограмм массы тела повышает активность фактора VIII в плазме примерно на 2 МЕ/дл. Необходимую дозировку определяют с помощью следующей формулы:

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

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

Дополнительные терапевтические дозы, которые могут применяться в способах по изобретению, составляют от примерно 10 до примерно 150 МЕ/кг, в частности,

примерно 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150 МЕ/кг, и более конкретно, примерно 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 или 150 МЕ/кг.

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

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

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

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

В частности, является ли конкретная молекула нуклеиновой кислоты или полипептид, по меньшей мере, на 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичной нуклеотидной последовательности или полипептиду по настоящему изобретению, может быть определено стандартными способами с помощью известных компьютерных программ. Предпочтительным способом определения наибольшего соответствия между использованной в качестве запроса последовательностью (референсной или исходной последовательностью) и рассматриваемой последовательностью, также называемым глобальным выравниванием последовательностей, может служить способ определения с помощью компьютерной программы FASTDB, основанной на алгоритме Брутлага с соавт. Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. (1990) 6:237-245), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки). При выравнивании последовательностей обе последовательности – используемая в качестве запроса и рассматриваемая – являются последовательностями ДНК. Последовательность РНК может сравниваться с помощью замены всех остатков U на остатки T. Результат указанного глобального выравнивания последовательностей представлен в виде процента идентичности. Предпочтительные параметры, применяемый при выравнивании в FASTDB последовательностей ДНК с целью вычисления процента идентичности, составляют: матрица=unitary (единичная), k-кортеж=4, штраф за несовпадение=1, штраф за соединение=30, длина группы рандомизации=0, пороговое

значение оценки=1, штраф за внесение пропуска=5, штраф за размер пропуска 0,05, размер окна=500 или равен длине рассматриваемой нуклеотидной последовательности, в зависимости от того, что короче.

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

Например, производят выравнивание рассматриваемой последовательности длиной 90 оснований с используемой для запроса последовательностью длиной 100 оснований с целью определения идентичности. Делеции имеются на 5'-конце рассматриваемой последовательности и, следовательно, выравнивание в FASTDB не покажет выравнивание первых 10 оснований на 5'-конце. 10 не имеющих пары оснований представляют собой 10% последовательности (количество оснований на 5'- и 3'-концах, которые не имеют пары, деленное на суммарное количество оснований в используемой для запроса последовательности), таким образом, 10% вычитают из оценки процента идентичности, вычисленной программой FASTDB. Если оставшиеся 90 оснований будут полностью соответствовать друг другу, окончательная оценка

процента идентичности составит 90%. В еще одном примере рассматриваемую последовательность длиной 90 оснований сравнивают с используемой для запроса последовательностью длиной 100 оснований. В этом случае делеции являются внутренними делециями, таким образом, что на 5'- или 3'-концах рассматриваемой последовательности нет оснований, которые не участвуют в выравнивании с используемой для запроса последовательностью. В данном случае процент идентичности, вычисленный программой FASTDB, не корректируют вручную. Повторим еще раз, что при корректировке вручную учитывают только те основания на 5'- и 3'-концах рассматриваемой последовательности, которые не участвуют в выравнивании с используемой для запроса последовательностью. Проводить другие корректировки в ручном режиме для целей настоящего изобретения не требуется.

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

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

Предпочтительным способом определения наибольшего соответствия между использованной в качестве запроса последовательностью (референсной или исходной последовательностью) и рассматриваемой последовательностью, также называемым глобальным выравниванием последовательностей, может служить способ определения с помощью компьютерной программы FASTDB, основанной на алгоритме Брутлага с соавт. (Brutlag et al. *Comp. App. Biosci.* 6:237-245 (1990), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки). При выравнивании последовательностей – используемой в качестве запроса и рассматриваемой – они либо обе являются нуклеотидными последовательностями, либо обе являются аминокислотными последовательностями. Результат указанного глобального выравнивания последовательностей представлен в виде процента идентичности. Предпочтительные параметры, применяемые для выравнивания аминокислотных последовательностей в программе FASTDB, следующие: матрица=PAM 0, k-кортеж=2, штраф за несовпадение=1, штраф за соединение=20, длина группы рандомизации=0, пороговое значение оценки=1, размер окна=длине последовательности, штраф за внесение пропуска=5, штраф за размер пропуска 0,05, размер окна=500 или равен длине рассматриваемой аминокислотной последовательности, в зависимости от того, что короче.

Если рассматриваемая последовательность короче, чем используемая для запроса последовательность из-за N- или C-концевых делеций, а не из-за внутренних делеций, необходимо вручную внести корректировку в результаты. Это связано с тем, что программа FASTDB не учитывает укорочение N- и C-концов рассматриваемой последовательности при расчете общего процента идентичности. В случае рассматриваемых последовательностей, укороченных по N- или C-концам, по сравнению с используемой для запроса последовательностью, процент идентичности корректируют, вычисляя количество остатков в используемой для запроса последовательности, которые находятся в положении с N- и C-конца относительно рассматриваемой последовательности, которые не участвуют в выравнивании с соответствующей рассматриваемой последовательностью, и выражая это количество как процент от суммарного количества оснований в используемой для запроса последовательности. Участвует ли остаток в выравнивании, определяется по результатам выравнивания последовательностей в FASTDB. Этот процентный показатель затем вычитают из процента идентичности, вычисленного вышеупомянутой программой FASTDB с применением указанных параметров, с получением

окончательной оценки процента идентичности. Для целей настоящего изобретения применяется именно эта оценка процента идентичности. Для целей корректировки оценки процентной идентичности в ручном режиме учитывают только те остатки, расположенные вне границ N- и С-концов рассматриваемой последовательности, которые не участвуют в выравнивании с используемой для запроса последовательностью. То есть, учитывают только остатки в используемой для запроса последовательности, которые находятся вне пределов, ограниченных самыми крайними остатками на N- и С-концах рассматриваемой последовательности.

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

Варианты полинуклеотидов могут содержать изменения в кодирующих областях, не кодирующих областях или в обоих этих типах областей. Главным образом предпочтительными являются варианты полинуклеотидов, содержащие изменения, которые приводят к молчащим заменам, вставкам или делециям, но не изменяют свойства или активности кодируемого полипептида. Предпочтительными являются

варианты нуклеотидов, представляющих собой результат молчащих замен из-за вырожденности генетического кода. Дополнительно, варианты, в которых 5-10, 1-5 или 1-2 аминокислоты заменены, делетированы или добавлены в любой комбинации, также являются предпочтительными. Варианты полинуклеотидов могут быть получены по различным причинам, например, для оптимизации экспрессии кодонов для конкретного организма-хозяина (замена кодонов в мРНК человека на кодоны, предпочтительно используемые бактерией-хозяином, например, *E. coli*).

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

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

Дополнительно, достаточно большое количество данных демонстрирует, что варианты часто сохраняют биологическую активность, схожую с таковой у белков природного происхождения. Например, Гэйл с соавторами (Gayle and coworkers, *J. Biol. Chem* 268:22105-22111 (1993), содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки) провели всесторонний мутационный анализ цитокина человека IL-1a. Они применили методику случайного мутагенеза для получения более 3 500 индивидуальных мутантных форм IL-1a, со средним количеством мутаций, равным 2,5 аминокислотным заменам на вариант при расчете на всю длину молекулы. В каждом

пригодном положении аминокислот была проведена проверка множества мутаций. Исследователи обнаружили, что «большую часть молекулы можно было изменить с минимальным воздействием как на связывание, так и на биологическую активность» (см. резюме). Действительно, лишь 23 уникальные аминокислотные последовательности, из более чем 3 500 проверенных нуклеотидных последовательностей, давали белок, который существенно отличался по активности от белка дикого типа.

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

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

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

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

Пример 1

Резюме

Химерный белок рекомбинантного фактора VIII с deletированным В-доменом и Fc (rFVIII_{Fc}) создали для увеличения периода полувыведения FVIII. rFVIII_{Fc} исследовали в моделях сильной гемофилии А у мышей и собак и сравнили с rFVIII (РеФакто[®]). Время свертывания цельной крови (WBCT) у мышей с гемофилией А было скорректировано с увеличением примерно в два-три раза, и период полувыведения из плазмы был примерно в два раза больше в случае применения rFVIII_{Fc}, по сравнению с РеФакто[®]. У собак с гемофилией А внутривенная доза rFVIII_{Fc} (125 МЕ/кг) скорректировала WBCT до нормального уровня. Показатель WBCT сохранялся на уровне менее 20 мин, что соответствует соотношению FVIII:C > 1%, в течение примерно 96 ч, по сравнению с 48 ч в случае, если собакам вводили РеФакто[®]. Период полувыведения rFVIII_{Fc} из плазмы у собак, при измерении с применением ELISA или хромогенного анализа активности, составил $15,7 \pm 1,7$ ч и $15,4 \pm 0,3$ ч, соответственно. Скорректированный посредством РеФакто[®] показатель WBCT примерно в два раза длиннее, чем rFVIII_{Fc}, и период полувыведения из плазмы составил 7,0 ч. Таким образом, слияние FVIII с Fc позволило получить молекулу с увеличенным периодом полувыведения и способностью обеспечивать более длительную защиту от кровотечений.

Введение

Снижение смертности, предотвращение повреждения суставов и улучшение качества жизни являются важными достижениями, которые стали возможны благодаря разработке способов получения FVIII из плазмы и рекомбинантного FVIII. Более длительная защита от кровотечения была бы еще одним ключевым этапом улучшения

лечения пациентов с гемофилией А. Авторы изобретения создали химерный белок рекомбинантного фактора FVIII и Fc (rFVIII-Fc) и его гибрид с целью увеличения периода полувыведения у FVIII.

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

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

и в патентах США №№ 7 404 956 и 7 348 004, содержание каждого из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки.

Методы и материалы

Препараты FVIII

Рекомбинантный FVIII_{Fc}

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

Кодирующую последовательность рекомбинантного Fc человека получили с помощью ОТ-ПЦР, используя библиотеку кДНК лейкоцитов человека (Clontech) и специфичные для Fc праймеры. Праймеры были сконструированы таким образом, чтобы последовательность FVIII с deletированным В-доменом была сшита непосредственно с N-концом последовательности Fc, без вставочного линкера. ДНК-последовательность FVIII_{Fc} клонировали в челночный экспрессионный вектор для клеток млекопитающих pBUDCE4.1 (Invitrogen) под контролем промотора CMV. Вторую идентичную последовательность Fc, содержащую сигнальную последовательность из Igk мыши, получили с помощью ОТ-ПЦР и клонировали ниже по течению от второго промотора, EF1 α , в экспрессионном векторе pBUDCE4.1.

Экспрессионный вектор для rFVIII_{Fc} трансфецировали в клетки эмбриональной почки человека 293 (HEK293H; Invitrogen), применяя реагент для трансфекции Липофектамин 2000 (Invitrogen). Клеточные линии со стабильными клонами были получены с помощью селекции зеоцином (Invitrogen). Одну клеточную линию клонов, 3C4-22, применяли для получения FVIII_{Fc} с целью определения его характеристик *in vivo*. Рекомбинантный FVIII_{Fc} получали и подвергали очистке (McCue JT, et al., J. Chromatogr. A 2009;7824-7830, содержание которой специально целиком включено сюда в качестве ссылки) в компании Biogen Idec (Кембридж, Массачусетс, США). Ожидалось,

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

Рекомбинантный FVIII

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

Животные с гемофилией А

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

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

Дизайн исследований

Исследования на мышах с гемофилией А

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

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

Исследования на собаках с гемофилией А

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

Во втором исследовании РеФакто[®] (114 МЕ/кг для собаки M12 и 120 МЕ/кг для собаки M38) вводили внутривенно. WBCT измеряли до момента достижения времени

свертывания ≥ 20 мин (соответствует соотношению FVIII:C $> 1\%$) и затем вводили 125 ME/kg rFVIII-Fc внутривенно тем же собакам и отбирали пробы крови для определения WBCT, АПТВ, концентрации FVIII-Fc в плазме, гематологических параметров и проведения биохимического анализа сыворотки. Временные точки для определения WBCT включали точку до введения препарата, 5 и 30 мин и 1, 2, 4, 8, 24, 32, 48, 72 ч после введения препарата. Пробы крови также отбирали через 96, 120, 144 и 168 ч после введения FVIII-Fc. Отбор проб крови для определения активности свертывания и концентрации FVIII-Fc в плазме проводили во временных точках, перечисленных выше для WBCT, а также в точках 15 мин и 3, 6, 12 ч после введения препарата.

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

Активность FVIII в плазме

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

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

Измерение уровня rFVIII-Fc или FVIII с помощью ELISA

Измерение FVIII-Fc в плазме собак с помощью ELISA

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

Покрытые антителом планшеты блокировали трис-буферным раствором хлорида натрия, содержащим Tween 20, CaCl_2 и бычий сывороточный альбумин, в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем стандарты, контроли и экспериментальные пробы, приготовленные в нормальной плазме собак, развели 1:10 и потом добавили в планшеты и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Планшеты промывали и затем добавляли антитела ослы (F(ab)'_2) против Fc человека, конъюгированные с HRP (Jackson: 709-036-098) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После отмывки добавляли в планшеты ТМБ (BioF_x, суперчувствительный субстрат: TMBS-0100-01), реакцию с участием субстрата останавливали кислотой и измеряли поглощение на спектрофотометре для прочтения многолуночных планшетов Spectra Max Plus (Molecular Devices) при 450 нм.

Измерение уровня РеФакто[®] в плазме собак с помощью ELISA

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

Измерение уровня фибриногена

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

Измерение уровня тромбоцитов

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

Фармакокинетический анализ

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

Результаты

Рекомбинантный FVIII-Fc

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

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

Введение препаратов мышам с гемофилией А

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

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

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

Введение препаратов собакам с гемофилией А

Фармакодинамику (ФД) и фармакокинетику (ФК) rFVIII^{Fc} изучали на собаках с гемофилией А из колонии из Чапел-Хилла. Разовую внутривенную дозу 125 МЕ/кг rFVIII^{Fc} вводили каждой из четырех собак с гемофилией А, и показатель WBCT сразу же корректировался до нормального уровня (Фиг. 4). Диапазон значений WBCT у собак в норме составляет 8-12 мин. Значение WBCT сохранялось на уровне менее 20 мин, т.е., времени, соответствующего соотношению FVIII:C >1%, вплоть до примерно 96 ч, за исключением одной собаки, у которой значение WBCT было <20 мин вплоть до временной точки 72 ч. Кроме того, показатель АПТВ также сразу же корректировался до нормального уровня (Таблица 6). Концентрацию rFVIII^{Fc} в плазме измеряли, используя специфичный метод ELISA, который был разработан для детекции как FVIII-части, так и Fc-части молекулы. Кривые зависимости концентрации в плазме от времени

показаны на Фиг. 5. Фармакокинетический анализ данных показал, что $t_{1/2}$ составило $15,7 \pm 1,7$ ч (Таблица 5). Схожие результаты были получены, когда rFVIII_{Fc} измеряли с применением хромогенного анализа активности, специфичной для FVIII ($t_{1/2} = 15,4 \pm 0,3$ ч, Таблица 5), и кривые зависимости концентрации в плазме от времени были сходными при использовании обоих способов (Фиг. 5 и 6). После перевода данных по активности из МЕ/мл в нг/мл с помощью показателя специфичной активности rFVIII_{Fc} наблюдалась хорошая корреляция с данными анализа ELISA, и это демонстрирует, что белок, исследуемый с помощью анализа ELISA, был полностью активен.

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

Для оценки потенциального риска тромбогенности проводили измерение тромбоцитов и фибриногена. После введения дозы либо rFVIII_{Fc}, либо РеФакто[®], количество тромбоцитов и концентрация фибриногена в плазме не изменялись по сравнению со значениями до введения препарата (данные не приводятся).

Обсуждение

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

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

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

специально целиком включено сюда в качестве ссылки). Пегилирование представляет собой способ снижения клиренса, однако, влияние модификации в системе *in vivo* в настоящее время неизвестно. Результат прямого пегилирования FVIII на его свойства *in vivo* в настоящее время не выяснен, тогда как FVIII в составе лекарственной формы с пегилированными липосомами был клинически исследован, и было показано, что наблюдается умеренное влияние на периоды кровотечения или влияние отсутствует (Spira J, et al., Blood 2006;108:3668-3673, Spira J, et al., Thromb. Haemost. 2008 Sep;100(3):429-34, содержание каждой из которых специально целиком включено сюда в качестве ссылки).

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

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

Дополнительные ссылки на литературные источники (содержание каждого из которых целиком включено сюда в качестве ссылки):

Berkner K, Methods Enzymol. 1993;222:450-477.

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

Пример 2

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

Материалы и методы

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

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

Животные

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

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

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

Дизайн исследования

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

Анализ ELISA для определения гFVIII^h и FVIII в плазме

Способ измерения содержания гFVIII^h в плазме, полученной от обезьян

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

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

Способ измерения содержания FVIII в плазме, полученной от обезьян

Разработан способ твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) для количественного определения FVIII в плазме обезьян. В этом способе ELISA антитело мыши против α BDDA1 FVIII, приобретенное в компании Green Mountain Antibodies (кат. № GMA-8002), разбавляют буфером для нанесения покрытия и иммобилизуют на 96-луночный титрационный микропланшет. Из планшета отсасывают жидкость и все неабсорбированные участки блокируют добавлением блокирующего буфера (3% BST/1x трис) примерно на 1 ч при 37°C. Пробы плазмы разбавляют 1:20 буфером для разбавления проб с высокой концентрацией кальция (блокирующий буфер со 100 mM CaCl₂) и наносят на планшет. Планшеты инкубируют в течение примерно 2 ч при 37°C. Затем планшет промывают, детектирующее антитело из набора Affinity Biologicals, конъюгированное с HRP поликлональное антитело (кат. № F8C-EIA-D), дополнительно разбавляют в TBS/0,05% Tween 20 и добавляют в планшет и инкубируют в течение примерно 1 ч при комнатной температуре. Планшет промывают еще раз и добавляют раствор субстрата пероксидазы – тетраметилпродамина (ТМБ) и инкубируют в течение примерно 30 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливают добавлением кислотного стоп-раствора. Развитие окраски пропорционально количеству FVIII_{Fc}, присутствующего в пробе. Планшеты прочитывают на спектрофотометре для

определения поглощения в многолуночных планшетах, используя для детекции одну длину волны: 450 нм. Концентрацию FVIII определяют по стандартной кривой, полученной при построении графика зависимости оптической плотности (OD) от концентрации с применением программы для вычерчивания по точкам четырехпараметрической логистической кривой. Диапазон калибровочной кривой в данном способе составляет 0,625 нг/мл - 20 нг/мл в 5% плазме обезьян (12,5 нг/мл - 400 нг/мл в 100% плазме обезьян). Можно включить два калибровочных маркера, находящихся вне определенного диапазона аналитического способа – при 0,313 и 0,156 нг/мл в 5% плазме обезьян, с целью использовать их как точки привязки для облегчения вычерчивания кривой по точкам. Точки привязки можно удалять или сохранять, исходя из наилучшего варианта подобранной кривой (т.е., варианта, при котором больше всего стандартов дают значения в пределах заданной точности, % относительной погрешности).

Хромогенный анализ активности, специфичной для FVIII

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

Стандартную кривую строили с применением концентрата 7го международного стандарта NIBSC фактора FVIII, разбавленного до 1 МЕ/мл в истощенной по FVIII

человека плазме. Пробы для стандартной кривой подвергали серийному разведению в приборе Sysmex с получением концентраций: 0,15, 0,1, 0,05, 0,025, 0,0053 и 0,0026 МЕ/мл. Так как прибор разбавляет все пробы 1:10, концентрации стандарта FVIII соответствуют концентрациям в плазме 1,5 - 0,026 МЕ/мл, что является диапазоном активностей FVIII, которые могут быть определены.

Фармакокинетический анализ

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

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

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

Обсуждение и заключение

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

Пример 3

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

Через неделю после введения дозы 25 МЕ/кг rFVIII^{Sc} последнему субъекту примерно 6 индивидуальных субъектов будут привлечены в когорту с дозой 65 МЕ/кг. Каждому субъекту в когорте с дозой 65 МЕ/кг введут разовую дозу 65 МЕ/кг Адвейт® со снятием фармакокинетического профиля в течение следующих 4 дней (96 ч), после этого будет произведено переключение на другой препарат, и субъектам введут разовую, открытую дозу 65 МЕ/кг rFVIII^{Sc} для снятия профиля в течение 10 дней (240

ч). Если в какой-либо когорте перед первой инъекцией rFVIII-Fc будет отмечен эпизод кровотечения, необходимо использовать для лечения продукт FVIII, обычно применяемый этим субъектом, и затем необходимо выдержать интервал, по меньшей мере, 4 дня перед введением первой инъекции rFVIII-Fc для построения фармакокинетического профиля.

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

Пример 4

Активность в комплексе, расщепляющем фактор X

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

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

А. Активация фактора X

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

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

В. Взаимодействие с FIXa

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

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

AUC_{∞}	Площадь под кривой концентрация-время от нуля до бесконечности
Бета HL	Период полувыведения; также называется $t_{1/2\beta}$
C168	Расчетная активность FVIII ^h Fc выше исходного уровня во временной точке примерно 168 ч после введения дозы
Cl	Клиренс
MRT	Среднее время удержания
TBLP1	Предсказанное моделью время после введения дозы, когда активность FVIII ^h Fc падает до уровня примерно 1 МЕ/дл выше исходного уровня
TBLP3	Предсказанное моделью время после введения дозы, когда активность FVIII ^h Fc падает до уровня примерно 3 МЕ/дл выше исходного уровня
TBLP5	Предсказанное моделью время после введения дозы, когда активность FVIII ^h Fc падает до уровня примерно 5 МЕ/дл выше исходного уровня

Пример 6

Рекомбинантный химерный белок фактора VIII с делетированным В-доменом с Fc (rFVIII^hFc) был создан в результате подхода, имеющего целью увеличение периода полувыведения FVIII. Фармакокинетику (ФК) rFVIII^hFc сравнили с таковой rFVIII у мышей с гемофилией А. Обнаружено, что терминальный период полувыведения у rFVIII^hFc был в два раза длиннее, чем у rFVIII. Для подтверждения того факта, что механизм, лежащий в основе увеличения периода полувыведения, обусловлен защитой rFVIII^hFc рецептором FcRn, провели фармакокинетическую оценку в мышцах, нокаутных по FcRn, и в трансгенных мышцах с FcRn человека. Вводили разовую внутривенную дозу (125 МЕ/кг) и определяли концентрацию в плазме, используя хромогенный анализ активности. Значения C_{max} у rFVIII^hFc и rFVIII (Ксинта[®]) были схожими в обеих линиях мышей. Однако, хотя период полувыведения у rFVIII^hFc был сопоставим с таковым у rFVIII у нокаутных по FcRn мышей, период полувыведения у rFVIII^hFc был увеличен примерно в два раза, чем таковой у rFVIII у трансгенных мышей с FcRn человека. Эти

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

Пример 7

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

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

Доклинические испытания с rFVIII_{Fc} продемонстрировали примерно 2-кратное увеличение периода полувыведения активности rFVIII, по сравнению с имеющимися в продаже продуктами rFVIII. Обоснованием для данного исследования была необходимость оценки безопасности и переносимости разовой дозы rFVIII_{Fc} в составе замороженной жидкой лекарственной формы и получения данными по

фармакокинетику у субъектов с тяжелыми формами гемофилии А. В данном исследовании для фармакокинетической оценки были доступны 16 пригодных для оценки субъектов. Разовое введение двух доз rFVIII-Fc и Адвейт с номинальной дозой 25 (n=6) и 65 МЕ/кг массы тела (n=10) проводили в виде внутривенной инфузии в течение примерно 10 мин. Пробы крови для оценки фармакокинетических параметров плазмы отбирали перед инфузией, а также в течение периода вплоть до 10 дней после введения дозы. Фармакокинетику активности FVIII как для Адвейт, так и для rFVIII-Fc охарактеризовали в данном исследовании с применением модель-зависимого метода.

ЦЕЛИ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

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

Дизайн исследования (см. Пример 3)

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

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

заключительного визита в ходе исследования (через 28 дней после инъекции rFVIII_{Fc}) во временной точке 672 ч после инъекции rFVIII_{Fc}.

Фармакокинетическое моделирование и расчеты

Сокращения

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

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

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

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

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

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

РЕЗУЛЬТАТЫ

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

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

Фармакокинетика разовой дозы (одноэтапный анализ)

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

значений $C_{\max}$ и AUC_{∞} было немного менее чем пропорционально дозе в исследованном диапазоне доз.

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

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

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

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

геометрического среднего значений CL для группы, получавшей лечение rFVIII-Fc, увеличился с 23,0% (25 МЕ/кг) до 48,6% (65 МЕ/кг).

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

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

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

Фармакокинетика разовой дозы (хромогенный анализ)

Наблюдаемая активность FVIII резко повышалась после кратковременной внутривенной инфузии либо Адвейт, либо rFVIII-Fc, со средними ($\pm$ станд. откл.) предсказанными моделью значениями $C_{\max}$, равными $70,2 \pm 9,60$ и $157 \pm 38,6$ МЕ/дл для

Адвейт и $70,3 \pm 10,0$ и $158 \pm 34,7$ МЕ/дл для гFVIIIФс в группах с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно.

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

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

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

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

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

в сочетании с ограниченными уровнями доз, затрудняло оценку зависимости этих параметров от дозы.

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

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

Средние ($\pm$ ст. откл.) наблюдаемые значения $TBLP1$ составили $2,70 \pm 0,511$ и $3,09 \pm 0,978$ МЕ/дл на МЕ/кг для Адвейт и $4,06 \pm 0,798$ и $5,66 \pm 2,38$ МЕ/дл на МЕ/кг для rFVIII-Fc, для групп с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно. Средние ($\pm$ ст. откл.) наблюдаемые значения $TBLP3$ составили $1,98 \pm 0,377$ и $2,39 \pm 0,718$ МЕ/дл на МЕ/кг для Адвейт и $3,04 \pm 0,598$ и $4,44 \pm 1,84$ МЕ/дл на МЕ/кг для rFVIII-Fc, для групп с дозами 25 и 65 МЕ/кг, соответственно.

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

ВЫВОДЫ

У всех пациентов, получавших лечение Адвейт и rFVIII-Fc, было сопоставимое дозозависимое повышение значений C_{max} и AUC_{∞} в оцененном диапазоне доз. Максимальные уровни активности Адвейт и rFVIII-Fc в плазме в общем случае наблюдались в пределах первого часа после окончания инфузии, и активность

сохранялась на детектируемых уровнях в течение нескольких дней после введения дозы. По окончании инфузии уменьшение активности FVIII, скорректированной относительно исходного уровня, демонстрировало моноэкспоненциальное снижение до достижения исходного уровня в случае обоих продуктов. Значения параметров периода полувыведения и MRT, по-видимому, являются дозозависимыми в исследованном диапазоне доз для обоих продуктов FVIII. Небольшое повышение значений CL и V было отмечено с повышением дозы Адвейт и rFVIII-Fc; однако увеличение вариабельности значений между субъектами при дозе 65 МЕ/кг, в сочетании с ограниченными уровнями доз, затрудняло оценку зависимости этих параметров от дозы.

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

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

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

Пример 8

На основании результатов промежуточного фармакокинетического анализа, проведенного в ходе первого исследования rFVIII:Fc с участием людей (Пример 3), был разработан дизайн исследования A-LONG. A-LONG – это открытое, многоцентровое исследование по оценке безопасности, фармакокинетики и эффективности химерного белка рекомбинантного фактора VIII с Fc (FVIII-Fc) при профилактике и лечении

кровотечения у ранее получавших лечение субъектов с тяжелой формой гемофилии А (определяемой как <1 МЕ/дл [1%] эндогенного FVIII).

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

Группа 1: Корректируемый профилактический режим

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

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

Группа 2: Режим с еженедельным введением дозы

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

Группа 3: Режим лечения по необходимости

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

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

Основными целями данного исследования являются: (а) оценка безопасности и переносимости rFVIII_{Sc}, вводимого в режимах профилактического лечения, лечения по необходимости и хирургического вмешательства; и (b) оценка эффективности rFVIII_{Sc}, вводимого в режимах профилактического лечения, лечения по необходимости и хирургического вмешательства. Дополнительными целями данного исследования являются: (а) определение параметров фармакокинетического профиля для rFVIII_{Sc} и сравнение фармакокинетики of FVIII_{Sc} и имеющегося в настоящее время на рынке продукта Адвейт; (b) оценка индивидуальных ответов на FVIII_{Sc}; и (c) оценка потребления FVIII_{Sc}.

Основные цели

- Оценка безопасности и переносимости rFVIII_{Sc}, вводимого в режимах профилактического, еженедельного лечения, лечения по необходимости и хирургического вмешательства

- Оценка эффективности rFVIII_{Sc}, вводимого в режимах корректируемого профилактического лечения, лечения по необходимости и хирургического вмешательства

Дополнительные цели

- Определение параметров фармакокинетического профиля для rFVIII_{Sc} и сравнение фармакокинетики of FVIII_{Sc} и имеющегося в настоящее время на рынке продукта Адвейт®
- Оценка индивидуальных ответов на rFVIII_{Sc}
- Определение диапазона дозы и режима дозирования, необходимых для адекватного предотвращения кровотечений в профилактическом режиме; поддержания гомеостаза в условиях хирургического вмешательства; или для лечения эпизодов кровотечения в условиях лечения по необходимости, лечения с еженедельным введением доз или профилактики
- Оценка потребления rFVIII_{Sc} (например, суммарное среднегодовое потребление rFVIII_{Sc} на одного субъекта)

Пример 9

Клиническая оценка методом ротационной тромбоэластометрии (ROTEM)

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

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

После введения доз Адвейт с последующим введением rFVIII_{Sc} произвели отбор проб цитратной цельной крови в различных временных точках и с помощью ROTEM измерили параметры образования сгустка после реактивации. Несмотря на различия в значениях СТ на исходном уровне из-за присутствия остаточного FVIII, до введения доз

Адвейт или rFVIII_{Sc}, оба продукта эффективно корректировали СТ до сопоставимых уровней через 30 мин после инъекции. Кроме того, улучшение показателей СТ было более длительным во временной точке 3 ч после инъекции и далее в случае 25 МЕ/кг rFVIII_{Sc}, по сравнению с Адвейт, у субъекта, получавшего низкую дозу. Однако разница в улучшении показателей в случае rFVIII_{Sc}, по сравнению с Адвейт, была намного менее существенна при дозе 65 МЕ/кг.

Таблицы

Таблица 1: Полинуклеотидные последовательности

A. FVIII_h с делетированным В-доменом

(i) Последовательность ДНК цепи FVIII_h с делетированным В-доменом (сигнальный пептид FVIII подчеркнут, область Fc выделена жирным шрифтом) (SEQ ID NO: 1, которая кодирует SEQ ID NO: 2)

661				A	TGCAAATAGA	GCTCTCCACC	TGCTTCTTTC
721	TGTGCCTTTT	GCGATTCTGC	TTTAGTGCCA	CCAGAAGATA	CTACCTGGGT	GCAGTGGAA	C
781	TGTCATGGGA	CTATATGCAA	AGTGATCTCG	GTGAGCTGCC	TGTGGACGCA	AGATTTCCTC	
841	CTAGAGTGCC	AAAACTTTT	CCATTCACCA	CCTCAGTCGT	GTACAAAAAG	ACTCTGTTTG	
901	TAGAAATCAC	GGATCACTT	TTCAACATCG	CTAAGCCAAG	GCCACCCCTG	ATGGGTCTGC	
961	TAGGTCTTAC	CATCCAGGCT	GAGGTTTATG	ATACAGTGGT	CATTACACTT	AAGAACATGG	
1021	CTTCCCATCC	TGTCAGTCTT	CATGCTGTTC	GTGTATCCTA	CTGGAAAGCT	TCTGAGGGAG	
1081	CTGAATATGA	TGATCAGACC	AGTCAAAAGG	AGAAAGAAGA	TGATAAAGTC	TTCCCTGGTG	
1141	GAAGCCATAC	ATATGTCTGG	CAGGTCCTGA	AAGAGAATGG	TCCAATGGCC	TCTGACCCAC	
1201	TGTCCCTTAC	CTACTCATAT	CTTTCTCATG	TGGACCTGGT	AAAAGACTTG	AATTTCAGGCC	
1261	TCATTGGAGC	CCTACTAGTA	TGTAGACAAG	CGAGTCTGSC	CAAGGAAAAG	ACACAGACCT	
1321	TGCACAAATT	TATACTACTT	TTTGCTGTAT	TTGATGAAGG	GAAAAGTTGG	CACTCAGAAA	
1381	CAAAGAACTC	CTTGATGCAG	GATAGGGATG	CTGCATCTGC	TCGGGCCTGG	CCTAAAATGC	
1441	ACACAGTCAA	TGGTTATGTA	AACAGGTCTC	TGCCAGGTCT	GATTGGATGC	CACAGGAAAT	
1501	CAGTCTATTC	GCATGTGATT	GGAATGGGCA	CCACTCCTGA	AGTGCACCTA	ATATTCTCTG	
1561	AAGGTCACAC	ATTTCTTTTG	AGGAACCATC	GCCAGGCGTC	CTTGGAAATC	TCGCCAATAA	
1621	CTTTCCTTAC	TGCTCAAACA	CTCTTGATGG	ACCTTGGACA	GTTTCTACTG	TTTTGTCTATA	
1681	TCTCTTCCCA	CCAACATGAT	GGCATGGAAG	CTTATGTCAA	AGTAGACAGC	TGTCCAGAGG	
1741	AACCCCAACT	ACGAATGAAA	AATAATGAAG	AAGCGGAAGA	CTATGATGAT	GATCTTACTG	
1801	ATTCTGAAAT	GGATGTGGTC	AGGTTTGATG	ATGACAACCTC	TCCCTTCCTTT	ATCCAAATTC	
1861	GCTCAGTTGC	CAAGAAGCAT	CCTAAAACCT	GGGTACATTA	CATTGCTGCT	GAAGAGGAGG	
1921	ACTGGGACTA	TGCTCCCTTA	GTCCCTCGCC	CCGATGACAG	AAGTTATATA	AGTCAATATT	
1981	TGAACAATGG	CCCTCAGCGG	ATTGGTAGGA	AGTACAAAAA	AGTCCGATTT	ATGGCATACA	
2041	CAGATGAAAC	CTTTAAGACT	CGTGAAGCTA	TTCAGCATGA	ATCAGGAATC	TTGGGACCTT	
2101	TACTTTATGG	GGAAGTTGGA	GACACACTCT	TGATTATATT	TAAGAATCAA	GCAAGCAGAC	
2161	CATATAACAT	CTACCCCTAC	GGAATCACTG	ATGTCCGTCC	TTTGTATTCA	AGGAGATTAC	
2221	CAAAAGGTGT	AAAACATTTG	AAGGATTTTC	CAATTCTGCC	AGGAGAAATA	TTCAAATATA	
2281	AATGGACAGT	GACTGTAGAA	GATGGGCCAA	CTAAATCAGA	TCCTCGGTGC	GACACCCGCT	
2341	ATTACTCTAG	TTTCGTTAAT	ATGGAGAGAG	ATCTAGCTTC	AGGACTCATT	GGCCCTCTCC	
2401	TCATCTGCTA	CAAAGAATCT	GTAGATCAAA	GAGGAAACCA	GATAATGTCA	GACAAGAGGA	
2461	ATGTCATCCT	GTTTTCTGTA	TTTGATGAGA	ACCGAAGCTG	GTACCTCACA	GAGAATATAC	
2521	AACGCTTTCT	CCCCAATCCA	GCTGGAGTGC	AGCTTGAGGA	TCCAGAGTTG	CAAGCCTCCA	
2581	ACATCATGCA	CAGCATCAAT	GGCTATGTTT	TTGATAGTTT	GCAGTTGTCA	GTTTGTTTTG	
2641	ATGAGGTGGC	ATACTGGTAC	ATTCTAAGCA	TTGGAGCACA	GACTGACTTC	CTTTCTGTCT	
2701	TCTTCTCTGG	ATATACCTTC	AAACACAAAA	TGGTCTATGA	AGACACACTC	ACCTATTTC	
2761	CATTCTCAGG	AGAAACTGTC	TTCATGTCTG	TGGAAAACCC	AGGTCTATGG	ATTCTGGGGT	
2821	GCCACAACCT	AGACTTTCCG	AACAGAGGCA	TGACCCGCTT	ACTGAAGGTT	TCTAGTTGTG	
2881	ACAAGAACAC	TGGTGATTAT	TACGAGGACA	GTTATGAAGA	TATTTTCAGCA	TACTTGCTGA	
2941	GTAAAAACAA	TGCCATTGAA	CCAAGAAGCT	TCTCTCAAAA	CCCACCAGTC	TTGAAACGCC	
3001	ATCAACGGGA	AATAACTCGT	ACTACTCTTC	AGTCAGATCA	AGAGGAAATT	GACTATGATG	
3061	ATACCATATC	AGTTGAAATG	AAGAAGGAAG	ATTTTGACAT	TTATCATGAG	CATGAAAATC	
3121	AGAGCCCCCG	CAGCTTTCAA	AAGAAAACAC	GACACTATTT	TATTGCTGCA	GTGGAGAGGC	
3181	TCTGGGATTA	TGGGATGAGT	AGCTCCCCAC	ATGTTCCTAAG	AAACAGGGCT	CAGAGTGGCA	
3241	CTGTCCCTCA	GTTCAAGAAA	GTTGTTTTCC	AGGAATTTAC	TGATGGCTCC	TTTACTCAGC	
3301	CCTTATACCG	TGGAGAACTA	AATGAACATT	TGGGACTCCT	GGGGCCATAT	ATAAGAGCAG	


```

3361 AAGTTGAAGA TAAIATCATG GTAACCTTCA GAAATCAGGC CTCTCGTCCC TATTCCTTCT
3421 ATTCTAGCCT TATTTCTTAT GAGGAAGATC AGAGGCAAGG AGCAGAACCT AGAAAAAAGT
3481 TTGTCAAGCC TAATGAAACC AAAACTTACT TTTGGAAAGT GCAACATCAT ATGGCACCCA
3541 CTAAAGATCA GTTTGACTGC AAACCCCTGGG CTTATTTCTC TSATGTTGAC CTGGAAAAAG
3601 ATGTGCACTC AGGCTTGATT GGACCCCTTC TGGTCTGCCA CACTAACACA CTGAACCCCTG
3661 CTCATGGGAG ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT TTTCAACATC TTTGATGAGA
3721 CCAAAAGCTG GTACTTCACT GAAAATATGG AAAGAAACTG CAGGCTCTCC TGCAATATCC
3781 AGATGGAAGA TCCCACCTTT AAAGAGAAAT ATCGCTTCCA TGCAATCAAT GGCTACATAA
3841 TGGATACACT ACCTGGCTTA GTAAATGGCTC AGGATCAAAG GATTCGATGG TATCTGCTCA
3901 GCATGGGCAG CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTGAG TGGACATGTG TTTACTGTAC
3961 GAAAAAAGA GAGTATATAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA TCCAGGTGTT TTTGAGACAG
4021 TGGAAATGTT ACCATCCAAA GCTGGAATTT GGCGGGTGGG ATGCCTTATT GGCGAGCATC
4081 TACATGCTGG CATGAGCACA CTTTCTCTGG TGTACAGCAA TAAGTGTCAG ACTCCCTGG
4141 GAATGGCTTC TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA TATGGACAGT
4201 GGGCCCCAAA GCTGGCCAGA CTTCAATTAT CCGGATCAAT CAATGCCTGG AGCACCAGG
4261 AGCCCTTTTC TTGGATCAAG GTGSATCTGT TGGACCAAT GATTATTCAC GGCATCAAGA
4321 CCCACCTTCC CCGTCAGAAG TCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC ATCATGTATA
4381 GTCTTGATGG GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC TTAATGGTCT
4441 TCTTGGCAA TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTTAACTCT CCAATTATTG
4501 CTGATACAT CCGTTTGAC CCAACTCAT ATAGCACTCG CAGCACTCTT CGCATGGAGT
4561 TGATGGGCTG TGATTTAAAT AGTTCAGCA TCCCATGGG AATGGAGAGT AAAGCAATAT
4621 CAGATGCACA GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC TGSTCTCCTT
4681 CAAAAGCTCG ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG GTGAATAATC
4741 CAAAAGAGTG GCTGCAAGTG GACTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA GTAACTACTC
4801 AGGGAGTAAA ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCTCATC TCCAGCAGTC
4861 AAGATGGCCA TCAGTGGACT CTCTTTTCTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTAGGGGAA
4921 ATCAAGACTC CTTCACAACCT GTGGTCAACT CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGCTACC
4981 TTCGAATTCA CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT
5041 GCGAGGCACA GGACCTCTAC GACAAAACCT ACACATGCCC ACCGTGCCCC GCTCCAGAAC
5101 TCCTGGGCGG ACCGTCAGTC TTCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT
5161 CCCGACCCC TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA
5221 AGTTCAACTG GTACGTGGAC GCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG
5281 AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC
5341 TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA
5401 AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT
5461 CCCGGGATGA GCTGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC
5521 CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA
5581 CGCCTCCCGT GTTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA
5641 AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA
5701 ACCACTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA A

```

(ii) ДНК последовательность Fc (сигнальный пептид Igk мыши подчеркнут) (SEQ ID

NO: 3, которая кодирует SEQ ID NO: 4)

```

7981 ATGGA GACAGACACA
8041 CTCTGCTAT GGTACTGCT GCTCIGGGT CCAGGTGCA CTGGTGACAA AACTCACACA
8101 TGCCACCCGT GCCAGCACC TSAACTCCTG GGAGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCTCCCA
8161 AAACCCAAGG ACACCCCTAT GATCTCCCG ACCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC
8221 GTGAGCCACG AAGACCCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT
8281 AATGCCAAGA CAAAGCCCGG GGAGSAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTACGCTC
8341 CTCACCGTCC TGCACCGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC
8401 AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCGCGAGAA
8461 CCACAGGTGT ACACCCCTGCC CCCATCCCGC GATGAGCTGA CCAAGAACCA GGTGAGCTG
8521 ACCTGCTGG TCAAAGCTT CTATCCAGC GACATGGCG TGGAGTGGCA GAGCAATGGG
8581 CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCAGCCT CCCGTGTTGG ACTCCGACGG CTCTTCTTC
8641 CTCTACAGCA AGCTCACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC

```

8701 TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
8761 GGTAAA

В. Полноразмерный FVIII_{FC}

(i) Последовательность ДНК полноразмерного FVIII_{FC} (сигнальный пептид FVIII

подчеркнут, область F_C выделена жирным шрифтом) (SEQ ID NO: 5, которая кодирует

SEQ ID NO: 6)

```

661                                     ATG CAAATAGAGC TCTCCACCTG
721 CTTCCTTTCTG TGCCTTTTGC GATTCTGCTT TAGTGCCACC AGAAGATACT ACCTCGGTGC
781 AGTGGAACTG TCATGGGAAT ATATGCAAAG TGATCTCGGT GAGCTGCCTG TGGACGCAAG
841 ATTTCCTCCT AGAGTGCCAA AATCTTTTCC ATTCAACACC TCAGTCGTGT ACAAAAAGAC
901 TCTGTTTCTA GAATTCACGG ATCACCTTTT CAACATCGCT AAGCCAAGGC CACCCTGGAT
961 GGGTCTGCTA GGTCTACCA TCCAGGCTGA GGTTCATGAT ACAGTGGTCA TTACACTTAA
1021 GAACATGGCT TCCATCCTG TCAGTCTTCA TGCTGTTGGT CTATCCTACT GGAAAGCTTC
1081 TGAGGGAGCT GAATATGATG ATCAGACCAG TCAAAGGGAG AAAGAAGATG ATAAACTCTT
1141 CCCTGGTGGG AGCCATACAT ATGTCGGCA GGTCTGAAA GAGAAATGGT CAATGGCCTC
1201 TGACCCACTG TGCCTTACCT ACTCATATCT TTCTCATGTG GACCTGTAA AAGACTTGAA
1261 TTACAGCCTC ATTGGAGCCC TACTAGTATG TAGAGAAGGG AGTCTGCCA AGGAAAAGAC
1321 ACAGACCTTG CACAAATTTA TACTACTTTT TGCTGTATTT CATGAAGGGA AAAGTTGGCA
1381 CTCAGAAACA AAGAACTCCT TGATGCAGGA TAGGGATGCT GCATCTGCTC GGGCCTGGCC
1441 TAAAATGCAC ACAGTCAATG GTTATGTAAA CAGGTCTCTG CCAGGTCTGA TTGGATGCCA
1501 CAGGAAATCA GTCTATTGGC ATGIGATTGG AATGGGCACC ACTCCTGAAG TGCCTCAAT
1561 ATTCTCTGAA GGTACACAT TTCTTGTGAG GAACCATCGC CAGGCTCCTT TGGAAATCTC
1621 GCCAATAACT TTCCTTACTG CTCAAACACT CTTGATGGAC CTGGGACAGT TTCTACTGTT
1681 TTGTCAATAT TCTTCCACC AACATGATGG CATGGAAAGT TATCTCAAAG TAGACAGCTG
1741 TCCAGAGGAA CCCCAACTAC GAATGAAAAA TAATGAAGAA GCGGAAGACT ATGATGAAGA
1801 TCTTACTGAT TCTGAAATGG ATGTGGTCAG GTTTGATGAT GACAACTCTC CTTCCTTTAT
1861 CCAAATTCGC TCAGTTGCCA AGAAGCATCC TAAACTTTGG GTACATTACA TTGCTGCTGA
1921 AGAGGAGGAC TGGGACTATG CTCCTTAGT CCTCGCCCC GATGACAGAA GTTATAAAAG
1981 TCAATATTTG AACAATGCC CTCAGCGGAT TGGTAGGAAG TACAAAAAAG TCCGATTTAT
2041 GGCATACACA GATGAAACCT TTAAGACTCG TGAAGCTATT CAGCATGAAT CAGGAATCTT
2101 GGGACCTTTA CTTCATGGGG AAGTTGGAZA CACACTGTTG ATTATATTTA AGAATCAAGC
2161 AAGCAGACCA TATAACATCT ACCCTCACGG AATCACTGAT GTCCGTCTTT TGTATGCAAG
2221 GAGATTACCA AAAGGTCTAA AACATTTGAA GGATTTTCCA ATTCTGCCAG GAGAAATATT
2281 CAAATATAAA TGGACAGTGA CTGTAGAAGA TGGCCCAACT AAATCAGATC CTGGGTGCTT
2341 GACCCGCTAT TACTCTAGTT TCGTTAATAT GGAGAGAGAT CTAGCTTCAG GACTCATTTG
2401 CCCTCTCCTC ATCTGCTACA AAGAATCTGT AGATCAAAGA GGAAACCCAG TAATGTCAGA
2461 CAAGAGGAAT GTCATCCTGT TTTCTGTATT TGATGAGAAC CGAAGCTGGT ACCTCACAGA
2521 GAATATACAA CGCTTTCTCC CCAATCCAGC TGGAGTGCAG CTTGAGGATC CAGAGTTCCA
2581 AGCCTCCAAC ATCATGCACA GCATCAATGG CTATGTTTTT GATAGTTTGC AGTTGTCAGT
2641 TTGTTTGCAT GAGGTGGCAT ACTGGTACAT TCTAAGCATT GGAGCACAGA CTGACTTCCT
2701 TTCTGCTTTC TTCTCTGGAT ATACCTTCAA ACACAAAATG GTCTATGAAG ACACACTCAC
2761 CCTATTCCCA TTCTCAGGAG AAAGTGTCTT CATGTTCGATG GAAACCCAG GTCTATGGAT
2821 TCTGGGGTGC CACAACCTAG ACTTTCGGAA CAGAGGCATG ACCGCTTAC TGAAGGTTTC
2881 TAGTTGTGAC AAGAACAATG GTGATTATTA CGAGGACAGT TATGAAGATA TTTCAGCATA
2941 CTTGCTGAGT AAAACAATG CCATTGAACC AAGAAGCTTC TCCAGAATT CAAGACACCC
3001 TAGCACTAGG CAAAAGCAAT TTAATGCCAC CACAATTCCA GAAATGACA TAGAGAAGAC
3061 TGACCCCTTG TTTGCACACA GAACACCTAT GCCTAAAAAT CAAATGTCT CCTCTAGTGA
3121 TTGTTGATG CTCTTGGCAG AGACTCTTAC TCCATATGGG CTATCCTTAT CTGATCTCCA
3181 AGAAGCCAAA TATGAGACTT TTTCTGATGA TCCATCACCT GCAGCAATAG ACATAATAA
3241 CAGCCTGTCT GAAATGACAC ACTTCAGGCC ACAGCTCCAT CACACTGGGG ACATGGTATT
3301 TACCCCTGAG TCAGGCCTCC AATTAAGATT AAATGAGAAA CTGGGGACAA CTGCAGCAAC
3361 AGAGTGAAG AAAGTTGATT TCAAAGTTTC TAGTACATCA AATAATCTGA TTTCACAAT
3421 TCCATCAGAC AATTTGGCAG CAGGTACTGA TAATACAAGT TCCTTAGGAC CCCCAGTAT
3481 GCCAGTTCAI TATGATAGTC AATTAGATAC CACTCTATTT GCAAAAAGT CATCTCCCT
3541 TACTGAGTCT GGTGGACCTC TGAGCTTGAG TGAACAAAAT AATGATTCAA AGTTCTTAGA

```

3601	ATCAGGTTTA	ATGAATAGCC	AAGAAAGTTC	ATGGGGAAAA	AATGTATCGT	CAACAGAGAG
3661	TGGTAGGTTA	TTTAAAGGGA	AAAGAGCTCA	TGGACCTGCT	TTGTTGACTA	AAGATAATGC
3721	CTTATTCAAA	GTAGCATCT	CTTTGTTHAA	GACAAACAAA	ACTTCCAATA	ATTGAGCAAC
3781	TAATAGAAAAG	ACTCACATTG	ATGGCCCATC	ATTATTAATT	GAGAATAGTC	CATCAGTCTG
3841	GCAAAATATA	TTAGAAAAGTG	ACACTGAGTT	TAAAAAAGTG	ACACCTTTGA	TTTCATGACAG
3901	AATGCTTATG	GACAAAAATG	CTACAGCITT	GAGGCTAAAT	CATATGTCAA	ATAAACTAC
3961	TTCATCAAAA	AACATGGAAA	TGGTCCAACA	GAAAAAAGAG	GGCCCCATTC	CACCAGATGC
4021	ACAAAATCCA	GATATGTCGT	TCTTTAAGAT	GCTATTCTTG	CCAGAATCAG	CAAGGTGGAT
4081	ACAAAGGACT	CATGGAAAAG	ACTCTCTGAA	CTCTGGGCAA	GGCCCCAGTC	CAAAGCAATT
4141	AGTATCCTTA	GGACCAGAAA	AATCTGTGGA	AGGTCAGAAT	TTCTTGTCTG	AGAAAAACAA
4201	AGTGGTAGTA	GGAAAGGGTG	AATTTACAAA	GGACGTAGGA	CTCAAAGAGA	TGGTTTTTCC
4261	AAGCAGCAGA	AACCTATTTC	TTACTAACTT	GGATAATTTA	CATGAAAATA	ATACACACAA
4321	TCAAGAAAAA	AAAATTCAGG	AAGAAATAGA	AAAGAAGGAA	ACATTAATCC	AAGAGAATGT
4381	AGTTTTGCCT	CAGATACATA	CAGTGACTGG	CACTAAGAAT	TTTCATGAAGA	ACCTTTTCTT
4441	ACTGAGCACT	AGGCAAAATG	TAGAAGSTTC	ATATGAOGGG	GCATATGCTC	CAGTACTTCA
4501	AGATTTTAGG	TCATTAAATG	ATTCAACAAA	TAGAACAAAG	AAACACACAG	CTCATTCTCTC
4561	AAAAAAAGGG	GAGGAAGAAA	ACTTGGAAGG	CTTGGGAAAT	CAAACCAAGC	AAATTGTAGA
4621	GAAATATGCA	TGCACCACAA	GCATATCTCC	TAATACAAGC	CAGCAGAATT	TTGTACGCGA
4681	ACCTAGTAAG	AGAGCTTTGA	AACAATTGAG	ACTCCCACTA	GAAGAAACAG	AACTTGAAAA
4741	AAGGATAATT	GTGGATGACA	CCTCAACCCA	GTGGTCCAAA	AACAIGAAAC	ATTTGACCCC
4801	GAGCACCCCTC	ACACAGATAG	ACTACATGA	GAAGGAGAAA	GCGGCCATTA	CTCAGTCTCC
4861	CTTATCAGAT	TGCCCTTACGA	GGAGTCATAG	CATCCCTCAA	GCAAAATAGAT	CTCCATTACC
4921	CATTGCAAAAG	GTATCATCAT	TTCCATCTAT	TAGACCTATA	TATCTGACCA	GGGTCTTATT
4981	CCAAGACAAC	TCTTCTCATC	TTCAGCAGC	ATCTTATAGA	AAGAAAGATT	CTGGGGTCCA
5041	AGAAAGCAGT	CATTTCCTTAC	AAGGAGCCAA	AAAAAATAAC	CTTTCCTTAG	CCATTCTAAC
5101	CTTGGAGATG	ACTGGTGATC	AAGCAGAGST	TGGCTCCCTG	GGGACCAATG	CACCAAATTC
5161	AGTCACATAC	AAGAAAAGTTG	AGAACACTGT	TCTCCCGAAA	CCAGACTTGC	CCAAAACATC
5221	TGGCAAACTT	GAATTGCTTC	CAAAAGTTCA	CATTIATCAG	AAGGACCTAT	TCCCTACGGA
5281	AACTAGCAAT	GGGTCTCCTG	GCCATCTGGA	TCTCCTGGAA	GGGAGCCTTC	TTGAGGGAAC
5341	AGAGGGAGCG	ATTAAGTGGG	ATGAAGCAAA	CAGACCTGGA	AAAGTTCCCT	TTCTGAGAGT
5401	AGCAACAGAA	AGCTCTGCAA	AGACTCCCTC	CAAGCTATTG	GATCCTCTTG	CTTGGGATAA
5461	CCACTATGGT	ACTCAGATAC	CAAAAGAACA	GTGGAAATCC	CAAGAGAAGT	CACCAGAAAA
5521	AACAGCTTTT	AAGAAAAAGG	ATACCATTTT	GTCCCTGAAC	GCTTGTGAAA	GCAATCATGC
5581	AATACCACCA	ATAAATGAGG	GACAAAATAA	GCCCGAAATA	GAAGTCACCT	GGGCAAAGCA
5641	AGGTAGGACT	GAAAGGCTGT	GCTCTCAAAA	CCCACCAGTC	TGAAACGCC	ATCAACGGGA
5701	AATAACTCGT	ACTACTCTTC	AGTCAGATCA	AGAGGAAATT	GACTATGATG	ATACCATATC
5761	AGTTGAAATG	AAGAAGGAAG	ATTTTGACAT	TTATGATGAG	GATGAAAATC	AGAGCCCCCG
5821	CAGCTTTCAA	AAGAAAACAC	GACACTATTT	TATTGCTGCA	GTGGAGAGGC	TCTGGGATTA
5881	TGGGATGAGT	AGCTCCCCAC	ATGTTCTAAG	AAACAGGGCT	CAGAGTGGCA	GTGTCCCTCA
5941	GTTCAAGAAA	GTGTTTTCC	AGGAATTTAC	TGATGGCTCC	TTTACTCAGC	CCTTATACCG
6001	TGGAGAACTA	AATGAACATT	TGGGACTCCT	GGGGCCATAT	ATAAGAGCAG	AAGTTGAAGA
6061	TAATATCATG	CTAACTTTCA	GAAATCAGGC	CTCTCGTCCC	TATTCCTTCT	ATTCTAGCCT
6121	TATTTCTTAT	GAGGAAGATC	AGAGGCAAGG	ACGAGAACCT	AGAAAAAAGT	TTGTCAAGCC
6181	TAATGAAACC	AAAACCTTACT	TTTGGAAAGT	GCAACATCAT	ATGGCACCCA	CTAAAGATGA
6241	GTTTGACTGC	AAAGCCTGGG	CTTATTTCTC	TGATGTGAC	CTGGAAAAAG	ATGTGCACTC
6301	AGGCCTGATT	GGACCCCTTC	TGCTCTGCCA	CACTAACACA	CTGAACCCTG	CTCATGGGAG
6361	ACAAGTGACA	GTACAGGAAT	TTGCTCTGTT	TTTCACCATC	TTTGATGAGA	CCAAAAGCTG
6421	GTACTTCACT	GAAAAATATG	AAAGAAACTG	CAGGGCTCCC	TGCAATATCC	AGATGGAAGA
6481	TCCCACTTTT	AAAGAGAATT	ATCGCTTCCA	TGCAATCAAT	GGCTACATAA	TGGATACACT
6541	ACCTGGCTTA	GTAATGGCTC	AGGATCAAAG	GATTCGATGG	TATCTGCTCA	GCATGGGCAG
6601	CAATGAAAAC	ATCCATTCTA	TTCATTTTCT	TGGACATGTG	TTCAGTGTAC	GAAAAAAGCA
6661	GGAGTATAAA	ATGGCACATG	ACAATCTCTA	TCCAGGTGTT	TTTGAGACAG	TGGAAATGTT
6721	ACCATCCAAA	GCTGGAATTT	GGCGGGTGGG	ATGCCCTTAT	GGCGAGCATC	TACATGCTGG
6781	GATGAGCACA	CTTTTCTTGG	TGTACAGCAA	TAAGTGTICAG	ACTCCCCCTG	GAATGGCTTC
6841	TGGACACATT	AGAGATTTTC	AGATTACAGC	TTCAGGACAA	TATGGACAGT	GGGCCCCCAA
6901	GCTGGCCAGA	CTTCATTATT	CCGGATCAAT	CAATGGCTGG	AGCACCAAGG	AGCCCTTTTC
6961	TTGGATCAAG	CTGGATCTGT	TGGCACCAAI	GATTATTTCAC	GGCATCAAGA	CCCAGGGTGC
7021	CCGTGAGAG	TTCTCCAGCC	TCTACATCTC	TCAGTTTATC	ATCATGTATA	GTCTTGATGG
7081	GAAGAAGTGG	CAGACTTATC	GAGGAAATTC	CAGTGGAAAC	TTAATGGTCT	TCTTTGGCAA

```

7141 TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTTAACCCT CCAATTATTG CTCGATACAT
7201 CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCG CAGCACTCTT CGCATGGAGT TGATGGGCTG
7261 TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG AATGGAGAGT AAAGCAATAT CAGATGCACA
7321 GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC TGGTCTCCTT CAAAAGCTCG
7381 ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG GTGAATAATC CAAAAGAGTG
7441 GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA GTAACACTC AGCGAGTAAA
7501 ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC TCCAGCAGTC AAGATGGCCA
7561 TCAGTGGACT CTCTTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTCAGGGAA ATCAAGACTC
7621 CTTACACACT GTGGTGAAGT CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGCTACC TTGAATTCA
7681 CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT GCGAGGCACA
7741 GGACCTCTAC GACAAAAC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCTCCAGAAC TCCTGGGCGG
7801 ACCGTCAGTC TTCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC
7861 TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG
7921 GTACGTGGAC GGCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA
7981 CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA
8041 GGAGTACAA TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCCTCCAGA AAACCATCTC
8101 CAAAGCCAAA GGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCGAT CCCGGGATGA
8161 GCTGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT
8221 CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT
8281 GTTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG
8341 GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC
8401 GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA A

```

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

C.

(i) Последовательность ДНК тяжелой цепи (HC)-Fc (без линкера между HC и Fc)

(сигнальный пептид подчеркнут, область Fc выделена жирным шрифтом) (SEQ ID NO:

7, которая кодирует SEQ ID NO: 8)

```

1 ATGCAAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTGCCTTT TGCGATTCTG CTTTAGTGGC
61 ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA CTGTCATGGG ACTATATGCA AAGTGATCTC
121 GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCCT CTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC
181 ACCTCAGTCG TGTACAAAAA GACTCTSTTT CTAGAATTCA CGGATCACCT TTTCAACATC
241 GCTAAGCCAA GCCCACCCTG GATGGGTCTG CTAGGTCTTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
301 GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCACTCT TCATGCTGTT
361 GGTGTATCCT ACTGGAAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG ATGATCAGAC CAGTCAAAGG
421 GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTTCCCTGGT GGAAAGCCATA CATATGCTCT GCAGGTCTCT
481 AAAGAGAATG GTCCAATGGC CTCTGAACCA CTGTGCCTTA CCTACTCATA TCTTTCTCAT
541 GTGGACCTGG TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCTACTAGT ATGTAGAGAA
601 GGGAGTCTGG CCAAGGAAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATACTACT TTTTGCTGTA
661 TTTGATGAAG GGAAGAGTTG GCACTCAGAA ACAAAGAACT CCTTGATGCA GGATAGGGAT
721 GCTGCATCTG CTGGGGCCTG GCCTAAAAATG CACACAGTCA ATGGTTATGT AAACAGGTCT
781 CTGCCAGGTC TGATTGGATG CCACAGGAAA TCAGTCTACT GGCATGTGAT TGGAAATGGGC
841 ACCACTCCTG AAGTGCACCT AATATTCTCT GAAGGTGACA CATTTCTTGT GAGGAACCAT
901 CGCCAGGCGT CCTTGGAAAT CTCGCCAATA ACTTTCTTTA CTGCTCAAAC ACTCTTGATG
961 GACCTTGGAC AGTTTCTACT GTTTTGTGAT ATCTCTTCCC ACCAACATGA TGGCATGGAA
1021 GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA
1081 GAAGCGGAAG ACTATGATGA TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT
1141 GATGACAACT CTCTTCTCTT TATCCAAATT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAACT
1201 TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT AGTCTCGCC
1261 CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG GCCCTCAGCG GATTGGTAGG
1321 AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATAC ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT
1381 ATTACAGCAT AATCAGGAAT CTTGGGACCT TTACTTTATG CGGAAGTTGG AGACACACTG

```

```

1441 TTGATTATAT TTAAGAATCA AGCAAGCAGA CCATATAACA TCTACCTCA CGGAATCACT
1501 GATGTCCGTC CTTTGATATC AAGGAGATTA CCAAAAAGGTG TAAAACATTT GAAGGATTTT
1561 CCAATTCTGC CAGGAGAAAT ATTCAAATAT AAATGGACAG TGACTGTAGA AGATGGGCCA
1621 ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCGC TATTACTCTA GTTTCGTAA TATGGAGAGA
1681 GATCTAGCTT CAGGACTCAT TGGCCCTCTC CTCATCTGCT ACAAAGAATC TGTAGATCAA
1741 AGAGGAAACC AGATAATCTC AGACAAGAGG AATGTCATCC TGTTCCTGT ATTIGATGAG
1801 AACCGAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTC TCCCCAATCC AGCTGGAGTG
1861 CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCCTC AACATCATGC ACAGCATCAA TGGCTATGTT
1921 TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTTGTITG CATGAGGTGG CATACTGGTA CATTCTAAGC
1981 ATTGGAGCAC AGACTGACTT CCTTCTCTG TCCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA
2041 ATGGTCTATG AAGACACACT CACCCATATC CCATTCTCAG GAGAACTGT CTTCATGTCT
2101 ATGGAAAACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACAAC CAGACTTTCG GAACAGAGGC
2161 ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAACA CTGGTGATTA TTACGAGGAC
2221 AGTTATGAAG ATATTTTCAGC ATACTTGCTG AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAGAC
2281 AAACTCACA CATGCCACC GTGCCAGCT CCAGAACTCC TGGGCGGACC GTCAGTCTTC
2341 CTCTTCCCCC CAAAACCCAA GGACACCCTC ATGATCTCCC GGACCCCTGA GGTACATGC
2401 GTGGTGGTGG ACGTGAGCCA CGAAGACCTC GAGGTCAAGT TCAACTGGTA CGTGGAGGC
2461 GTGGAGGTGC ATAATGCCAA GACAAAGCCG CGGGAGGAGC AGTACAACAG CAGTACCGT
2521 GTGGTCAGCG TCCTCACCCT CCTGCACCAG GACTGGCTGA ATGGCAAGGA GTACAAGTGC
2581 AAGGTCTCCA ACAAAGCCCT CCCAGCCCCC ATCGAGAAAA CCATCTCCAA AGCCAAAGGG
2641 CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCCATCCC GGGATGAGCT GACCAAGAAC
2701 CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG
2761 GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACCTA AAGACCACGC CTCCCGTGT GGACTCCGAC
2821 GGCTCCTTCT TCCTCTACAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA GCAGGGGAAC
2881 GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA GAAGAGCCTC
2941 TCCCTGTCTC CGGGTAAA

```

C.

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

```

1 ATGCAAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTTCTTT CTGTCCTTT TGCGATTCTG CTTTAGTGCC
61 ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA CTGTCATGGG ACTATATGCA AAGTGATCTC
121 GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTTCT CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC
181 ACCTCAGTCG TGACAAAAAA GACTCTGTTT GTAGAATTCA CGGATCACCT TTTCAACATC
241 GCTAAGCCAA GGCCACCTG GATGGGTCTG CTAGGTCTTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
301 GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCAGTCT TCATGCTGTT
361 GGTGTATCCT ACTGGAAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG ATGATCAGAC CAGTCAAAGG
421 GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTTCCCTGGT GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCTCT
481 AAAGAGAATG GTCCAATGGC CTCTGACCCA CTGTGCCCTA CCTACTCAIA TCTTTCTCAT
541 CTGGACCTGG TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCCTACTAGT ATGTAGAGAA
601 GGGAGTCTGG CCAAGGAAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTACTACTCT TTTTGCTGTA
661 TTTGAIGAAG GGAAAAAGTTG GCACTCAGAA ACAAAGAACT CCTGATGCA GGATAGGGAT
721 GCTGCATCTG CTCGGGCTG GCCTAAAATG CACACAGTCA ATGTTTATGT AAACAGGTCT
781 CTGCCAGGTC TGATTGGATG CCACAGSAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGGAATGGGC
841 ACCACTCCTG AAGTGCACTC AATATTCCCT GAAGGTCAAC CATTTCTTGT GAGGAACCAT
901 CGCCAGGCGT CCTTGGAAAT CTCGCCAATA ACITTCCTTA CTGCTCAAAC ACTCTTGATG
961 GACCTTGGAC AGTTTCTACT GTTTTGTCT ATCTCTTCCC ACCAACATGA TGGCATGGAA
1021 GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA
1081 GAAGCGGAAG ACTATGATGA TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAAT
1141 GAGTACAAC CTCTTCTCT TATCCAAAT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAAC
1201 TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT AGTCTCTGCC
1261 CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG GCCCTCAGCG GATGGTAGG
1321 AAGTACAAAA AAGTCCGATT TATGGCATAAC ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT

```

```

1381 ATTCAGCATG AATCAGGATF CTTGGGACCT TTACTTTATG GGGAAGTTGG AGACACACTG
1441 TTGATTATAT TTAAGAATCA AGCAAGCAGA CCATATAACA TCTACCCCTCA CGGAATCACT
1501 GATGTCCGTC CTTTGTAATC AACGAGATTA CCAAAAAGGTG TAAAAACATTT GAAGGATCTT
1561 CCAATTCTGC CAGGAGAAAT ATTCAAAATAT AAATGGACAG TGACTGTAGA AGATGGGCCA
1621 ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCGC TATTACTCTA GTTTCGTAA TATGGAGAGA
1681 CATCTAGCTT CAGGACTCAT TGGCCCTCTC CTCACTCTGT ACAAAGAATC TGTAGATCAA
1741 AGAGGAAACC AGATAATCTC AGACAAGAGG AATGTCTATC TGTTCCTGTI ATTTGATGAG
1801 AAOCCAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTTC TCCCCAATCC AGCTGGAGTG
1861 CAGCTTGAGG ATCCAGACTT CCAAGCCTCC AACATCATGC ACAGCATCAA TGGCTATGTT
1921 TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTTGTGTT CATGAGGTGG CATACIGGTA CATCTAAGC
1981 ATTCGAGCAC AGACTGACTT CCTTCTCTGC TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA
2041 ATGCTCTATG AAGACACACT CAGCCTATTC CCATCTCTAG GAGAACTGT CTTCATGTCT
2101 ATGGAAAACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACAACCT CAGACTTCTG GAACAGAGGC
2161 ATGACCGCTT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAAAC CTGGTGATTA TTACGAGGAC
2221 AGTTATCAAG ATATTTCAGC ATACTTCTCT AGIAAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAGC
2281 TTCTCCCAAG ATGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCTCCAGA ACTCCTGGGC
2341 GGACCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCAAAA CCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC
2401 CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC
2461 TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC
2521 AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCTCT ACCGTCTCTG ACCAGGACTG GCTGAATGGC
2581 AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCCAG CCCCATCGA GAAAACCATC
2641 TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAT
2701 GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCTTGGTCA AAGGCTTCTA TCCAGCGAC
2761 ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAAC AACTACAAGAC CACGCCTCCC
2821 GTGTTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG
2881 TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
2941 ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAA

```

C.

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

```

1 ATGGGAGACAG ACACACTCCT CCATAGGCTA CTGCTGCTCT GGGTCCAGG CTCCACTGGT
61 GAAATAACTC GTACTACTCT TCAGTCAGAT CAAGAGGAAA TTGACTATGA TGATACCATA
121 TCAGTTGAAA TGAAGAAGGA AGATTTTGAC ATTTATGATG AGGATGAAAA TCAGAGCCCC
181 CCGAGCTTTC AAAAGAAAAC ACGACACTAT TTTATTGCTG CAGTGGAGAG GCTCTGGGAT
241 TATGGGATGA GTAGCTCCCC ACATGTTCTA AGAAACAGGG CTCAGAGTGG CAGTGTCCCT
301 CAGTTCAAGA AAGTTGTTTT CCAGGAATTT ACTGATGGCT CCCTTACTCA CCCCTTATAC
361 CGTGGAGAAC TAAATGAACA TTTGGGACTC CTGGGGCCAT ATATAAGAGC AGAAGTTGAA
421 GATAATATCA TGGTAACTTT CAGAAATCAG GCCTCTGCTC CCTATTCCTT CTATTCTAGC
481 CTTATTTCTT ATGAGGAAGA TCACAGGCCA GGAGCAGAAC CTAGAAAAAA CTTTGTCAAG
541 CCTAATGAAA CCAAAACCTA CTTTTGGAAA GTGCAACATC ATATGGCACC CACTAAAGAT
601 CAGTTTGACT GCAAAGCCTG GGCTTATTTT TCTGATGTTG ACCTGGAAAA AGATGTGCAC
661 TCAGGCCTGA TTGGACCCCT TCTGGTCTGC CACACTAACA CACTGAACCC TGCTCATGGG
721 AGACAAGTGA CAGTACAGGA ATTTGCTCTG TTTTTCACCA TCTTTGATGA GACCAAAAGC
781 TGGTACTTCA CTGAAAATAT GSAAAGAAAC TGCAGGGCTC CCTGCAATAT CCAGATGCAA
841 GATCCCACTT TTAAAGAGAA TTATCGCTTC CATGCAATCA ATGGCTACAT AATGGATACA
901 CTACCTGGCT TAGTAATGGC TCAGGATCAA AGGATTCGAT GGTATCTGCT CAGCATGGGC
961 AGCAATGAAA ACATCCATTC TATTCAATTC AGTGGACATG TGTTCACTGT ACGAAAAAAA
1021 GAGGAGTATA AAATGGCACT GTACAATCTC TATCCAGGTC TTTTTGAGAC AGTGGAAATG
1081 TTACCATCCA AAGCTGGAAT TTGGGGGGTG GAATGCCCTA TTGGCGAGCA TCTACATGCT
1141 GGGATGAGCA CACTTTTTCT GGTGTACAGC AATAAGTGTG AGACTCCCTT GGGAATGGCT
1201 TCTGGACACA TTAGAGATTT TCAGATTACA GCTTCAGGAC AATATGGACA GTGGGCCCCA
1261 AAGCTGGCCA GACTTCATTA TTCCGGATCA ATCAATGCCT GGAGCACCAA GGAGCCCTTT
1321 TCTTGATCA AGGTGGATCT GTGGGACCCA ATGATTATTC ACGGCATCAA GACCCAGGGT

```

```

1381  GCCCCTCAGA AGTTCTCCAG CCTCTACATC TCTCAGTTTA TCATCATGTA TAGTCTTGAT
1441  GGGGAAGAAGT GGCAGACTTA TCGAGGAAAT TCCACTGGAA CCTTAATGGT CTTCCTTGGC
1501  AATGTGGATT CATCTGGGAT AAAACACAAT ATTTTAAACC CTCCAATTAT TGCTCGATAC
1561  ATCCGTTTGC ACCCAACTCA TTATAGCATT CGCAGCACTC TTCGCATGGA GTTGATGGGC
1621  TGTGATTTAA ATAGTTGCAG CATGCCATTG GGAATGGAGA GTAAAGCAAT ATCAGATGCA
1681  CAGATTACTG CTTCAATCCTA CTTTACCAAT ATGTTTGCCA CCTGGTCTCC TTCAAAAGCT
1741  CGACTTCACC TCCAAGGGAG GAGTAATGCC TGGAGACCTC AGGTGAATAA TCCAAAAGAG
1801  TGGCTGCAAG TGGACTTCCA GAAGACAATG AAAGTCACAG GAGTAACTAC TCAGGGAGTA
1861  AAATCTCTGC TTACCAGCAT GTATGTGAAG GAGTTCCTCA TCTCCAGCAG TCAAGATGGC
1921  CATCAGTSSA CTCTCTTTTT TCAGAATGGC AAAGTAAAGG TTTTTCAGGG AAATCAAGAC
1981  TCCTTCACAC CTGTGGTGAA CTCTCTAGAC CCACCGTTAC TGACTCGCTA CCTTCGAATT
2041  CACCCCCAGA GTTGGGTGCA CCAGATTGCC CTGAGGATGG AGGTTCTGGG CTGCGAGGCA
2101  CAGSACCTCT ACGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC CAGCTCCAGA ACTCCTGGGC
2161  GGACCGTCAG TCTTCCTCTT CCCCCAAAA CCCAAGGACA CCCTCATGAT CTCCCGGACC
2221  CCTGAGGTCA CATGCGTGGT GGTGGACGTG AGCCACGAAG ACCCTGAGGT CAAGTTCAAC
2281  TGGTACGTGG ACGGCGTGGA GGTGCATAAT GCCAAGACAA AGCCGCGGGA GGAGCAGTAC
2341  AACAGCACGT ACCGTGTGGT CAGCGTCCTC ACCGTCCTGC ACCAGGACTG GCTGAATGGC
2401  AAGGAGTACA AGTGCAAGGT CTCCAACAAA GCCCTCCAG CCCCCATCGA GAAAACCATC
2461  TCCAAAGCCA AAGGGCAGCC CCGAGAACCA CAGGTGTACA CCCTGCCCCC ATCCCGGGAT
2521  GAGCTGACCA AGAACCAGGT CAGCCTGACC TGCCTGGTCA AAGGCTTCTA TCCCAGCGAC
2581  ATCGCCGTGG AGTGGGAGAG CAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGAC CACGCCTCCC
2641  GTGTTGGACT CCGACGGCTC CTTCTTCCTC TACAGCAAGC TCACCGTGGA CAAGAGCAGG
2701  TGGCAGCAGG GGAACGTCTT CTCATGCTCC GTGATGCATG AGGCTCTGCA CAACCACTAC
2761  ACGCAGAAGA GCCTCTCCCT GTCTCCGGGT AAA

```

Таблица 2: Полипептидные последовательности

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

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

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

MQIELSTCFFLCLLRFCFS
 ATTRYYLGAVELSWDYMQSDIGELPVDARFPFPRVPKSFPPNTSVVYKKTLFVEETDHLFNIAPR
 PPWMGLLGPTIQAEVYDVTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAHEYDDQTSQREKEDDKVFP
 GGSHTYVWQVI.KENGPMASDPLCLTYSYLSHVDI.VKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKF
 ILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGM
 GTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVK
 VDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHKPTWVHYIAAE
 EDWDYAPLVLPAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYG
 EVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTIVTEDG
 PTKSDPRCLTRYSSSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVF DENRSW
 YLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS
 VFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWLIGCHNSDFERNRGMTALLKVSSCDKNT
 GDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNPVLRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKK
 EDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPPQFKKVVFQEF
 DGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPK
 NFVKPNETKTYFWKVQHMAPTKDEFDCWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLCHTNTLNPAHGR
 QVTVQEFALFFTFDET KSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVM
 AQDQIRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVE
 CLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPGLMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWST
 KEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGN
 VDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASS
 YFTNMEATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKE
 FLISSSQDGHQWTLFFQNGKVVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVL
 GCEAQDLYDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ii) Цепь Fc (гетерологичный сигнальный пептид длиной 20 аминокислот из цепи

Igk мыши подчеркнут) (SEQ ID NO: 4)

METDTLLLWVLLLWVPGSTG
 DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT

LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

**В. Гибрид полноразмерного FVIII_{FC}-мономера (полноразмерного FVIII_{FC}-
мономер-димер): создан совместной экспрессией цепей FVIII_{FC} и Fc.**

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

i) Цепь полноразмерного FVIII_{FC} (сигнальный пептид FVIII подчеркнут (SEQ ID

NO: 6)

MQIELSTCFFLCLLRFCFS
ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFRVPKSFPENTSVVYKKTLEFVEFTDHLFENIAKPR
PPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFP
GGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKF
ILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGM
GTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVK
VDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEE
EDWDYAPLVLAPODDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTIDETFKTREAIQHESGILGPLLYG
EVGDTLLIIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDG
PTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQGRNQIMSDKRNVLFSVFDENRSW
YLTENIQRFLENPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS
VFESGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNT
GDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSONSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPPFAHRTMP
KIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKEYTFSDDPSPGAIDSNNLSSEMTHFRPQLHHS
DMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDKFKVSSTSNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMP
VHYDSQLDTTFLGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDKLLSGLMNSQESSWGKNVSTESGRLFKG
KRAHGPALLTKDNALFKVSIISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDETEK
KVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSKNNMEMVQQKKEGPIPPDAQNFDMSEFFKMLFLPES
ARWIQORTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLESEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPS
SRNLEFLTNLDNLHENNTHNQEKKEIEKKEITLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQN
VEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRKTKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPN
TSQQNFVTQRSKRALKQFRPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAI
TQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLPQDNSSHLPAASYRKKDSGVQE
SSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSQKVELL
PKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSK
LLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPKTAFFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVT
WAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRS
FQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRQAQSGSVPPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEH
LGLLGPYIRAEVEDNIMVTFERNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKKNFVKPNETKTYFWKVQ
HMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIIFE
TKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRIRWYLLSMGSN
ENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFL
VYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI
IHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPPII
ARYIRLHPHTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARL

HLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFF
QNGKVVFQGNQDSETPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ii) Цепь Fc (гетерологичный сигнальный пептид длиной 20 аминокислот из цепи

Igk мыши подчеркнут) (SEQ ID NO: 4)

METDTLLLLWVLLLVPGSTG
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

C. Гетеродимерный гибрид FVIII-Fc

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

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

MQIELSTCFFLCLLRFCFS
ATTRYYLGAVELSDYMQSDLGELPVDARFPFPRVPKSFPPNTSVVYKKTLEVEFTDHLFNIAPR
PPWMGLLGPTIQAEVYDVTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFP
GGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKF
ILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRSVYWHVIGM
GTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVK
VDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEE
EDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQIRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLYG
EVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDG
PTKSDPRCLTRYYSSEFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSW
YL TENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS
VFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNT
GDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

MQIELSTCFFLCLLRFCFS

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFPRVPKSFPPNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAPR
 PPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAHEYDDQTSQREKEDDKVFP
 GGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKF
 ILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGM
 GTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVK
 VDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPTWVHYIAAEE
 EDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTRÉAIQHESGILGPLLYG
 EVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDG
 PTKSDPRCLTRYSSFFVNMRDLASGLIGPLLCYKESVDQQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSW
 YLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS
 VFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNT
 GDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQMDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISR
TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

METDTLLLWVLLLWVPGSTG

EITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSS
 SPHVLRNRAQSGSVPPQFKKVVFEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQ
 ASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNETKTYFWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDL
 EKDVHSGLIGPLLCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTFDET KSWYFTENMERNCRAPCNIQME
 DPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKM
 ALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMA SGHIRDFQIT
 ASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI IHGIKTQGARQKFSSLYISQFII
 MYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIENPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMG
 CDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVD
 FQKTMKVTGVTTQGVKSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVVFQGNQDSFTPVVNSLD
 PPLLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
K

Таблица 3. Определение времени свертывания цельной крови (WBCT) у мышей с гемофилией А после разовой внутривенной дозы 50 МЕ/кг rFVIII^{Fc} или РеФакто[®].

А.

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

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

В.

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

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

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

Лечение	$C_{\max}$ (МЕ/мл)	AUC (ч×МЕ/мл)	$T_{1/2}$ (ч)	CL (мл/ч/кг)	V_{ss} (мл/кг)
rFVIII-Fc	1,56	22,6	11,1	2,09	28,4
РеФакто®	0,67	6,94	5,0	7,2	43,8
Адвейт®	0,47	3,90	7,1	12,8	103

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

А. Фармакокинетические параметры согласно данным по хромогенному анализу активности

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

В. Фармакокинетические параметры согласно данным ELISA

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

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

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

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

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

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

А. Концентрация в плазме rFVIII_{FC} (мкг/мл)

	Группа 1			Группа 2			Среднее	Ст.откл.
Время, ч	604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362		
До дозы	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
0,25	0,400	0,334	0,374	0,348	0,383	0,323	0,360	0,030
4	0,266	0,259	0,236	0,233	0,259	0,217	0,245	0,019
12	0,165	0,152	0,12	0,15	0,161	0,149	0,150	0,016
24	0,079	0,074	0,047	0,08	0,088	0,076	0,074	0,014
36	0,035	0,04	0,022	0,04	0,041	0,046	0,037	0,008
48	0,019	0,021	BLQ	0,021	0,024	0,025	0,022	0,002

В. Концентрация в плазме Ксинта (мкг/мл)

	Группа 1			Группа 2			Среднее	Ст.откл.
Время, ч	604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362		
До дозы	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
0,25	0,252	0,074	0,155	0,317	0,217	0,167	0,197	0,084
4	0,197	0,159	0,152	0,229	0,19	0,082	0,168	0,051
12	0,137	0,099	0,104	0,166	0,158	0,081	0,124	0,035
24	0,09	0,068	0,051	0,082	0,08	0,084	0,076	0,014
36	0,037	0,043	0,015	0,041	0,035	BLQ	0,034	0,011
48	0,022	BLQ	BLQ	0,017	0,013	BLQ	0,017	0,005

Таблица 8. Концентрация в плазме rFVIII_{Fc} или Ксинта у обезьян после введения в виде разовой внутривенной дозы 125 МЕ/кг, измеренная с помощью **хромогенного анализа активности, специфичной для FVIII** (приведена в МЕ/мл).

А. Ксинта

Время(ч)	Группа 1			Группа 2		
До дозы	604376	606595	С36195	С36066	С36174	604362
0,25	5,62	4,55	5,01	4,5	5,15	3,77
4	3,9	4,05	3,2	3,19	3,46	2,36
12	2,51	2,82	1,69	2,17	2,5	2,01
24	1,67	1,66	1,18	0,95	1,57	1,5
36	0,7	0,85	0,48	0,44	0,85	0,82
48	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	0,38	0,48

В. rFVIII_{Fc}

Время(ч)	Группа 1			Группа 2		
До дозы	604376	606595	С36195	С36066	С36174	604362
0,25	4,31	3,82	3,54	4,13	4,12	3,68
4	3	3,36	2,53	2,7	2,74	2,81
12	2	2,15	1,42	2,28	2,75	2,22
24	1,01	1,17	0,5	1,5	1,61	1,01
36	BLQ	0,52	0,48	0,88	0,72	0,64
48	0,31	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
72	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	0,31	BLQ

BLQ = ниже предела количественного определения

Таблица 9. Фармакокинетические параметры **rFVIII_h** после разовой дозы 125 МЕ/кг

ФК параметр	rFVIII _h , данные ELISA								
	Единицы	Группа 1			Группа 2			Среднее	Ст.откл.
		604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362		
T _{max}	Ч	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,00
C _{max}	мкг/мл	0,4	0,334	0,374	0,348	0,383	0,323	0,368	0,030
T _{1/2}	Ч	11,4	13,3	9,3	12,7	12,7	14,1	11,9	1,7
AUC	мкг×ч/мл	5,86	5,65	4,37	5,56	4,37	5,58	5,16	0,68
Клиренс CL	мл/ч/кг	2,15	2,23	2,88	2,27	2,07	2,26	2,32	0,29
V _z	мл/кг	35,3	42,5	38,8	37,9	37,9	46,1	38,5	3,9
MRT	Ч	15,3	17	12,1	17,1	17,3	19,2	15,8	2,4

ФК параметр	rFVIII _h , данные по хромогенной активности								
	Единицы	Группа 1			Группа 2			Среднее	Ст.откл.
		604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362		
T _{max}	Ч	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,00
C _{max}	МЕ/мл	4,31	3,82	3,54	4,13	4,12	3,68	3,93	0,30
T _{1/2}	Ч	13,4	12,0	11,6	17,5	12,4	29,4	16,1	6,9
AUC	МЕ×ч/мл	74,7	75,5	53,5	92,9	88,9	92,7	79,7	15,2
Клиренс CL	мл/ч/кг	1,67	1,65	2,34	1,35	1,41	1,35	1,63	0,38
V _z	мл/кг	32,3	28,7	39,2	33,9	25,2	57,2	36,1	11,4
MRT	Ч	17,8	16,8	16,9	25	19,2	33,3	21,5	6,5

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

ФК параметр	Ксинта, данные ELISA							
	Единицы	Группа 1			Группа 2			Среднее Ст. откл.
		604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362	
T _{max}	Ч	0,25	4	0,25	0,25	0,25	0,25	0,88 1,53
C _{max}	МЕ/мл	0,252	0,159	0,155	0,317	0,217	0,167	0,21 0,06
T _{1/2}	Ч	13,6	19,9	9,7	11	9,2	ND	12,7 4,4
AUC	МЕ×ч/мл	5,15	4,39	3,17	5,53	4,79	6,32	5,24 0,74
Клиренс CL	мл/ч/кг	2,21	2,6	3,59	2,06	2,38	ND	2,57 0,61
V _z	мл/кг	43,4	74,7	50,1	32,9	31,5	ND	46,5 17,5
MRT	Ч	19	28,4	14	16,1	15,9	ND	18,7 5,7

ФК параметр	Ксинта, данные по хромогенной активности							
	Единицы	Группа 1			Группа 2			Среднее Ст. откл.
		604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362	
T _{max}	Ч	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25 0
C _{max}	МЕ/мл	5,62	4,55	5,01	4,5	5,15	3,77	4,77 0,64
T _{1/2}	Ч	12,8	14,3	11,4	10,4	11,7	14,6	12,5 1,7
AUC	МЕ×ч/мл	97,1	104,2	71,3	70,7	94,0	82,8	86,7 14,0
Клиренс CL	мл/ч/кг	1,29	1,20	1,75	1,77	1,33	1,51	1,48 0,24
V _z	мл/кг	23,7	24,8	28,9	26,6	22,5	31,8	26,4 3,5
MRT	Ч	17,8	20,1	16,0	14,8	18,4	23,2	18,4 3,0

Таблица 11. Активация фактора X

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

Таблица 12. Взаимодействие с фактором IXa

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ профилактики или лечения эпизода кровотечения у пациента с гемофилией А, включающий введение пациенту внутривенно нескольких доз химерного полипептида фактора VIII (FVIII) пролонгированного действия с интервалом дозирования от 12 часов до пяти дней между двумя дозами химерного полипептида FVIII пролонгированного действия, где терапевтическая доза составляет от около 10 МЕ/кг до около 100 МЕ/кг, где химерный полипептид FVIII пролонгированного действия содержит полипептид FVIII и Fc-область, где полипептид FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 20-1457 SEQ ID NO: 2 или аминокислотам 20-2351 SEQ ID NO: 6, и где Fc-область по меньшей мере на 90% или 95% идентична аминокислотам 1458-1684 SEQ ID NO: 2 или аминокислотам 2352-2578 SEQ ID NO: 6.

2. Способ по п. 1, где полипептид FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 20-1457 SEQ ID NO: 2.

3. Способ по п. 1, где полипептид FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотам 20-1457 SEQ ID NO: 2.

4. Способ по п. 1, где полипептид FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 20-2351 SEQ ID NO: 6.

5. Способ по п. 1, где полипептид FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотам 20-2351 SEQ ID NO: 6.

6. Способ по п. 1, где Fc-фрагмент по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотам 1458-1684 SEQ ID NO: 2.

7. Способ по п. 1, где Fc-фрагмент по меньшей мере на 95% идентичен аминокислотам 1458-1684 SEQ ID NO: 2.

8. Способ по п. 1, где химерный полипептид FVIII пролонгированного действия представляет собой гибридный димерный мономер FVIII₂Fc, содержащий фрагмент FVIII и два Fc-фрагмента, где один Fc-фрагмент слит с С-концом легкой цепи фрагмента FVIII.

9. Способ по п. 1, где введение осуществляют для рутинной профилактики.

10. Способ по п. 1, где введение осуществляют для лечения по требованию.

11. Способ по п. 1, где введение осуществляют для индивидуальной профилактики.

12. Способ по любому из пп. 1-4, где минимальный уровень активности FVIII в плазме у пациента поддерживается выше 1 МЕ/дл.

13. Способ по любому из пп. 1-5, где терапевтическая доза составляет 25-30 МЕ/кг, 30-40 МЕ/кг, 40-50 МЕ/кг, 50-60 МЕ/кг, 60-70 МЕ/кг, 70-80 МЕ/кг, 80-90 МЕ/кг или 90-100 МЕ/кг химерного полипептида FVIII пролонгированного действия.

14. Способ по любому из пп. 1-6, где терапевтическая доза составляет 25 МЕ/кг, 30 МЕ/кг, 35 МЕ/кг, 40 МЕ/кг, 45 МЕ/кг, 50 МЕ/кг, 55 МЕ/кг, 60 МЕ/кг, 65 МЕ/кг, 70 МЕ/кг, 75 МЕ/кг, 80 МЕ/кг, 85 МЕ/кг, 90 МЕ/кг или 100 МЕ/кг химерного полипептида FVIII пролонгированного действия.

15. Способ по п. 7, где терапевтическая доза составляет от 25 МЕ/кг до 65 МЕ/кг.

16. Способ по п. 7, где терапевтическая доза составляет 50 МЕ/кг.

17. Способ по п. 7, где терапевтическая доза составляет от около 65 МЕ/кг до около 100 МЕ/кг химерного полипептида FVIII пролонгированного действия .

18. Способ по любому из пп. 1-10, где интервал дозирования составляет около трех дней.

19. Способ по любому из пп. 1-10, где интервал дозирования составляет около трех дней, около четырех дней или около пяти дней.

20. Способ по любому из пп. 1-10, где интервал дозирования составляет от около трех дней до пяти дней.

21. Способ по любому из пп. 1-10, где интервал дозирования составляет около двух раз в неделю.

22. Способ введения фактора VIII ("FVIII") пациенту, нуждающемуся в хирургической профилактике, периоперационном лечении или хирургическом лечении, включающий внутривенное введение пациенту множество доз от 25 МЕ/кг до 60 МЕ/кг химерного полипептида FVIII пролонгированного действия, содержащего фрагмент FVIII и партнера по связыванию FcRn ("FcRn BP"), в интервале дозирования от 12 до 24 часов между двумя дозами, где FcRn BP содержит Fc, где Fc слит с С-концом фрагмента FVIII, и где фрагмент FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 20-1457 SEQ ID NO: 2 или аминокислотам 20-2351 SEQ ID NO: 6, и где Fc по меньшей мере на 90% или 95% идентичен аминокислотам 1458-1684 SEQ ID NO: 2 или аминокислотам 2352-2578 SEQ ID NO: 6.

23. Способ по п. 22, где введение предотвращает эпизод кровотечения у пациента.

24. Способ по п. 22 или 23, где хирургическое вмешательство представляет собой небольшую операцию, обширную операцию, удаление зуба, тонзиллэктомию, паховую

грыжу, синовэктомию, тотальное эндопротезирование коленного сустава, краниотомию, остеосинтез, хирургическую травму, внутричерепную хирургию, внутрибрюшную хирургию, интратаракальную хирургию или хирургическое эндопротезирование сустава.

25. Способ по любому из пп. 22-24, где хирургическое вмешательство представляет собой обширное хирургическое вмешательство.

26. Способ по любому из пп. 22-25, где каждая из множественных доз составляет 30 МЕ/кг, 40 МЕ/кг или 50 МЕ/кг.

27. Способ по любому из пп. 22-26, где что интервал дозирования составляет 24 часа.

28. Способ по любому из пп. 15-26, где каждая из многократных доз составляет от 25 МЕ/кг до 40 МЕ/кг, а интервал дозирования составляет 24 часа.

29. Способ по любому из пп. 15-26, где каждая из многократных доз составляет от 25 МЕ/кг до 40 МЕ/кг, а интервал дозирования составляет 12 часов.

30. Способ по любому из пп. 15-26, где каждая из многократных доз составляет от 40 МЕ/кг до 60 МЕ/кг, а интервал дозирования составляет 24 часа.

31. Способ по любому из пп. 15-26, где каждая из многократных доз составляет от 40 МЕ/кг до 60 МЕ/кг, а интервал дозирования составляет 12 часов.

32. Способ по п. 1, где химерный белок дополнительно содержит промежуточную линкерную последовательность между фрагментом фактора VIII и Fc-фрагментом.

33. Способ по п. 32, где Fc-фрагмент содержит замену Pro331Ser.

34. Способ по п. 32, где Fc-фрагмент представляет собой Fc-фрагмент иммуноглобулина G1 (IgG1) человека, содержащий три аминокислотные замены, которые не вызывают значительной потери аффинности связывания Fc с FcRn.

35. Способ по п. 32, где фактор VIII пролонгированного действия является пегилированным.

36. Способ по п. 32, где Fc-фрагмент представляет собой Fc-фрагмент иммуноглобулина G2 (IgG2) человека, содержащий три аминокислотные замены, которые не вызывают значительной потери аффинности связывания Fc с FcRn.

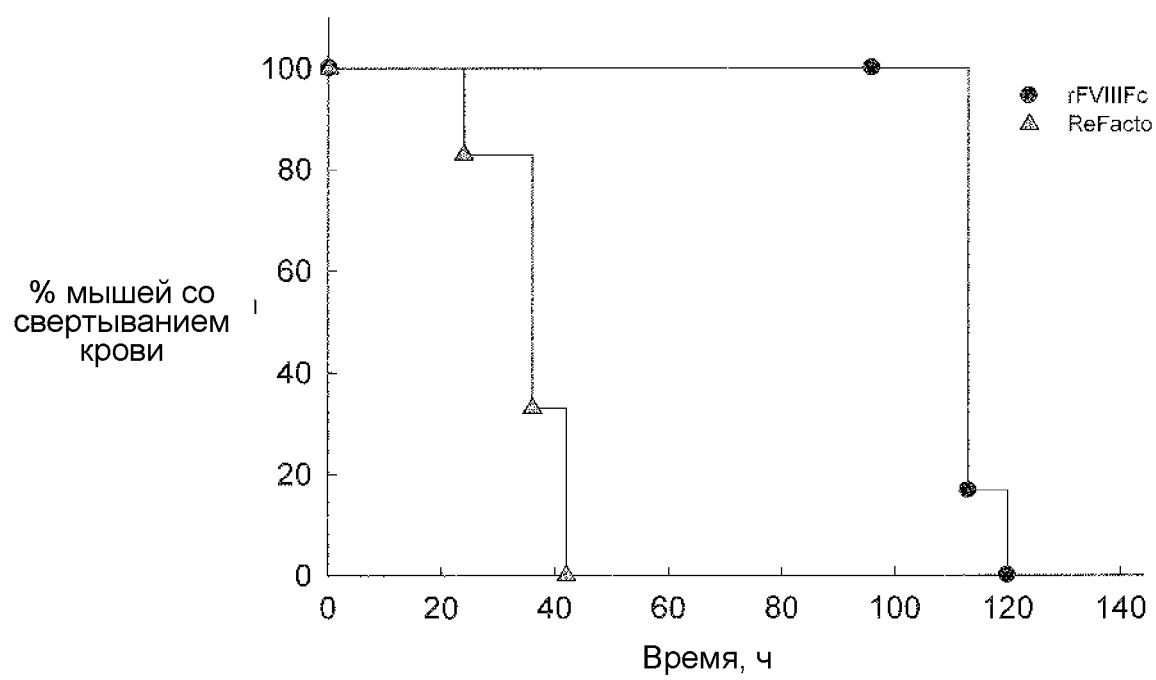
По доверенности

Фиг. 1



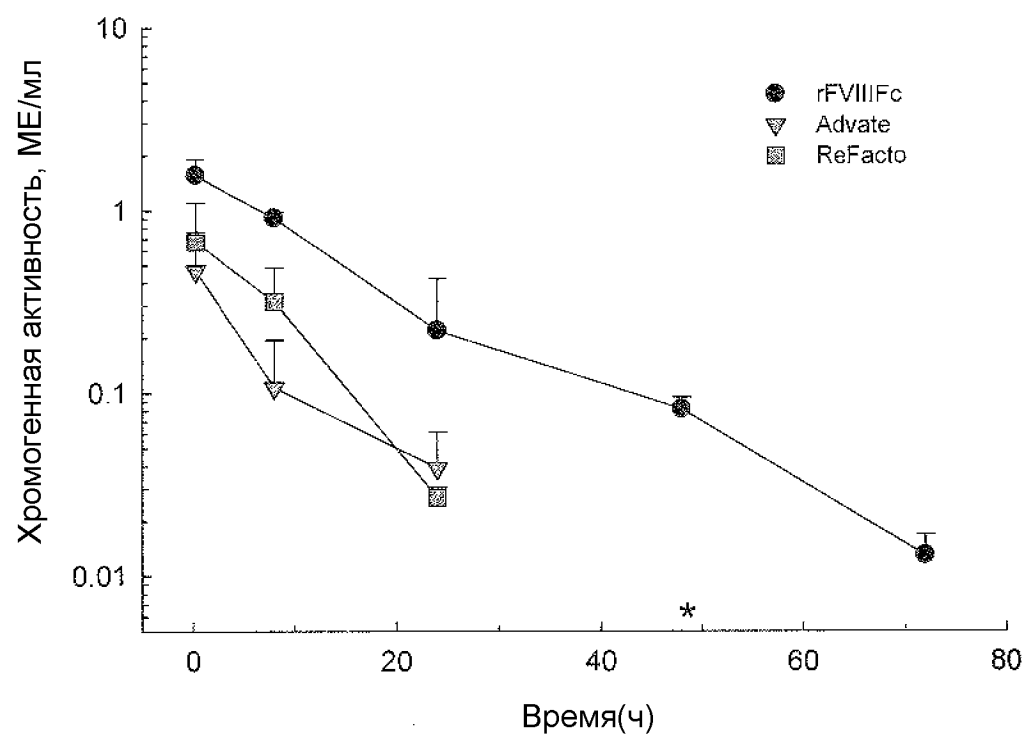
2/19

Фиг. 2



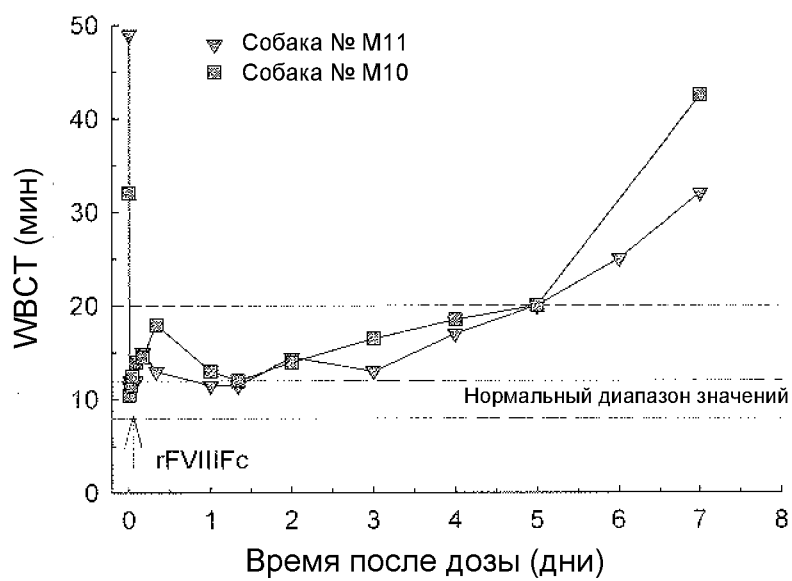
3/19

Фиг. 3



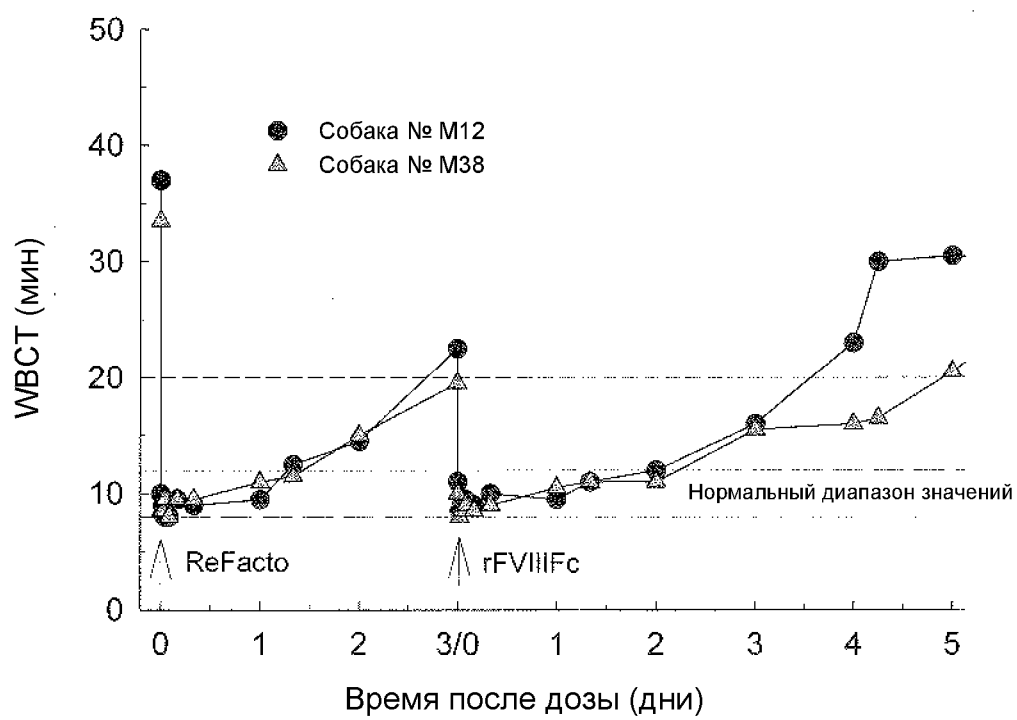
4/19

Фиг. 4А



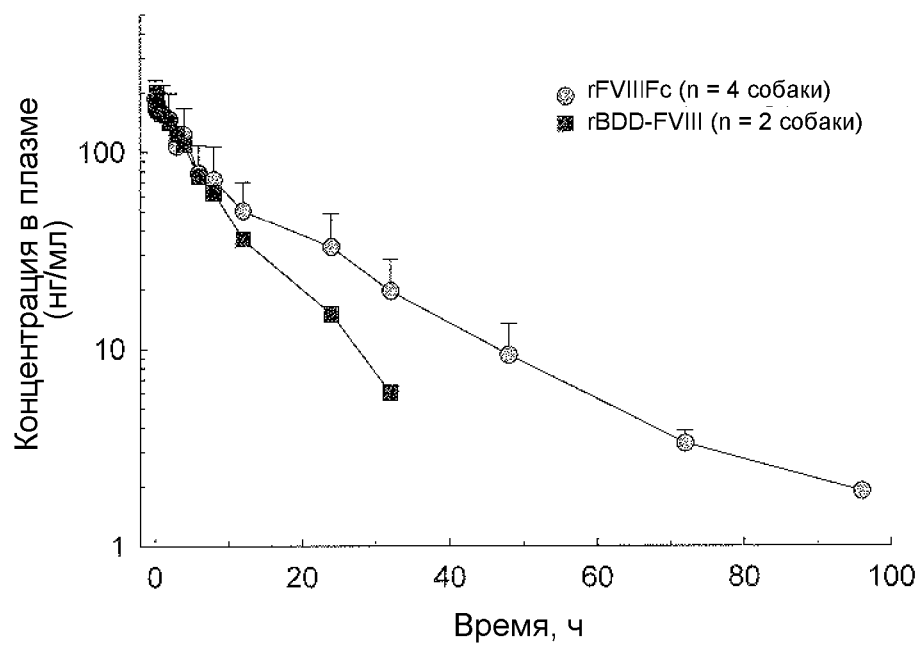
5/19

Фиг. 4В



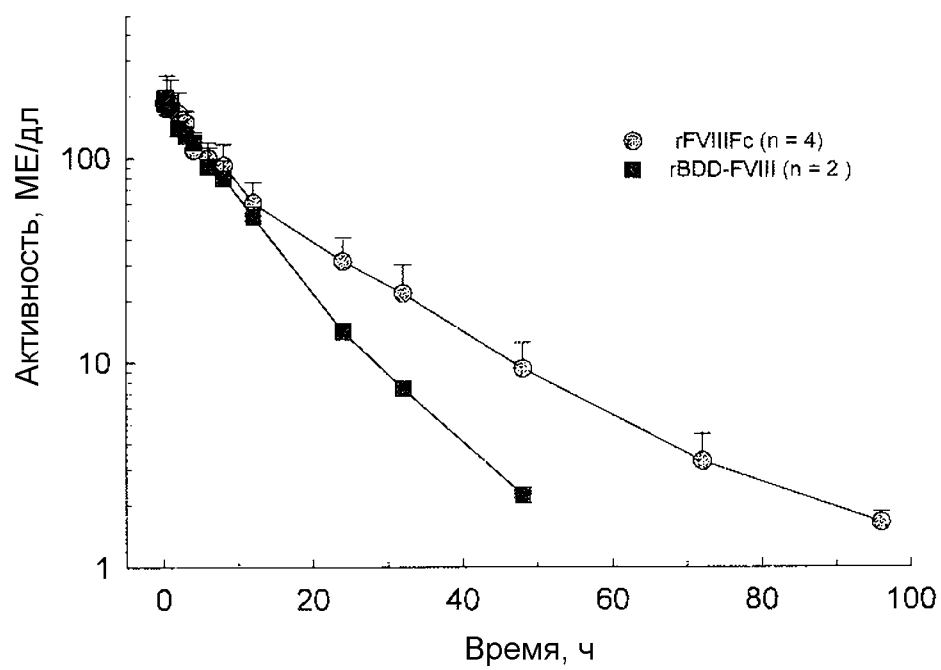
6/19

Фиг. 5



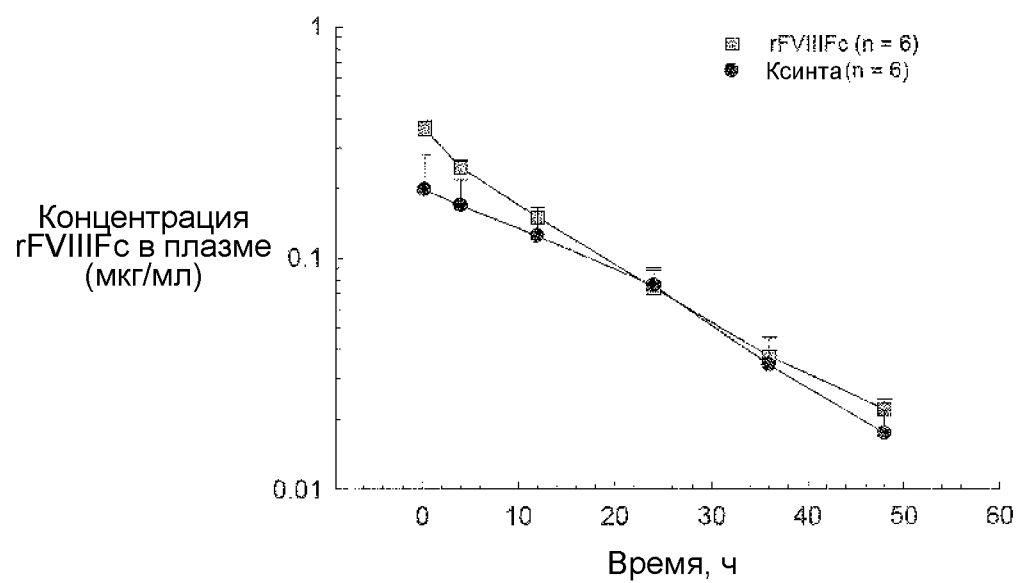
7/19

Фиг. 6



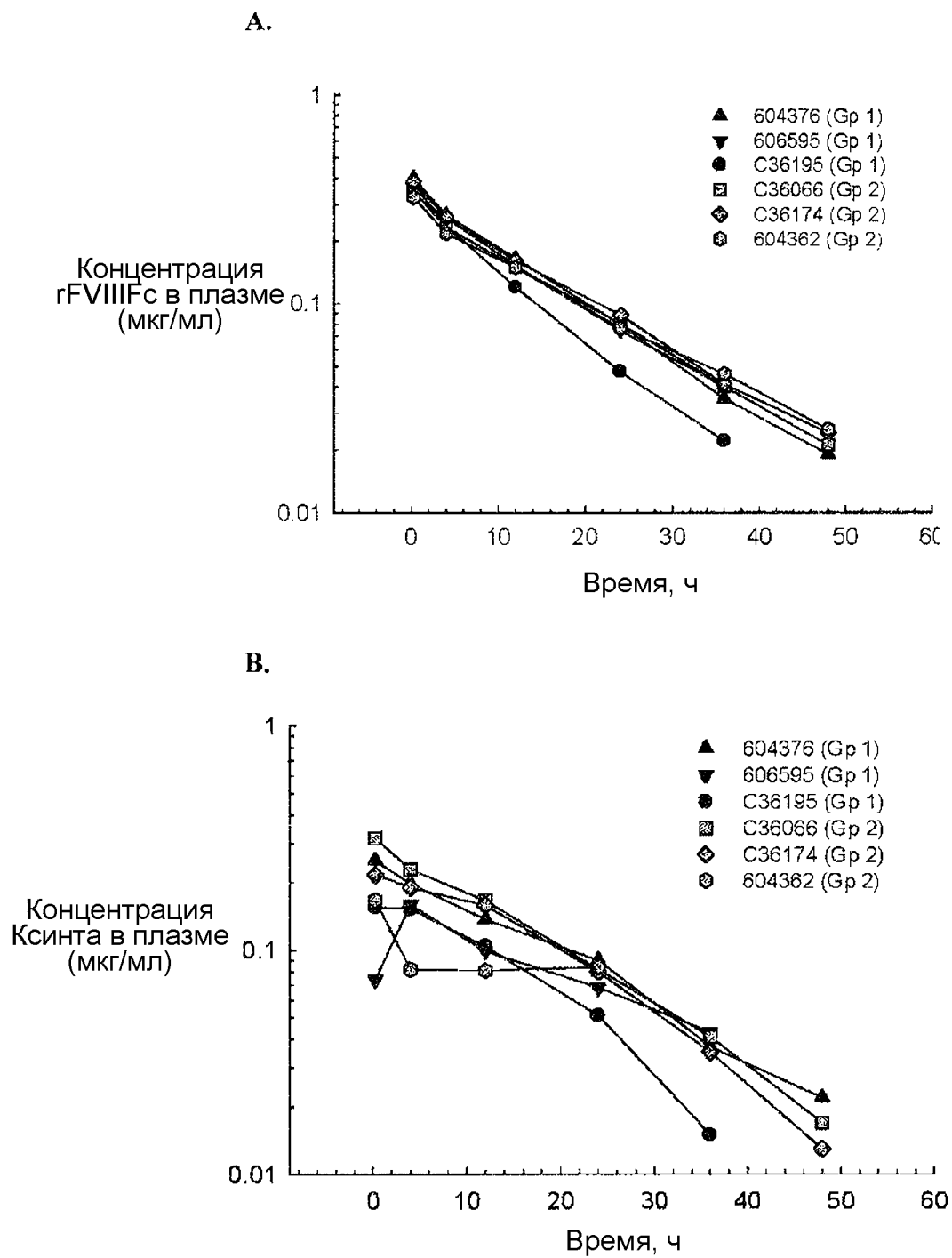
8/19

Фиг. 7



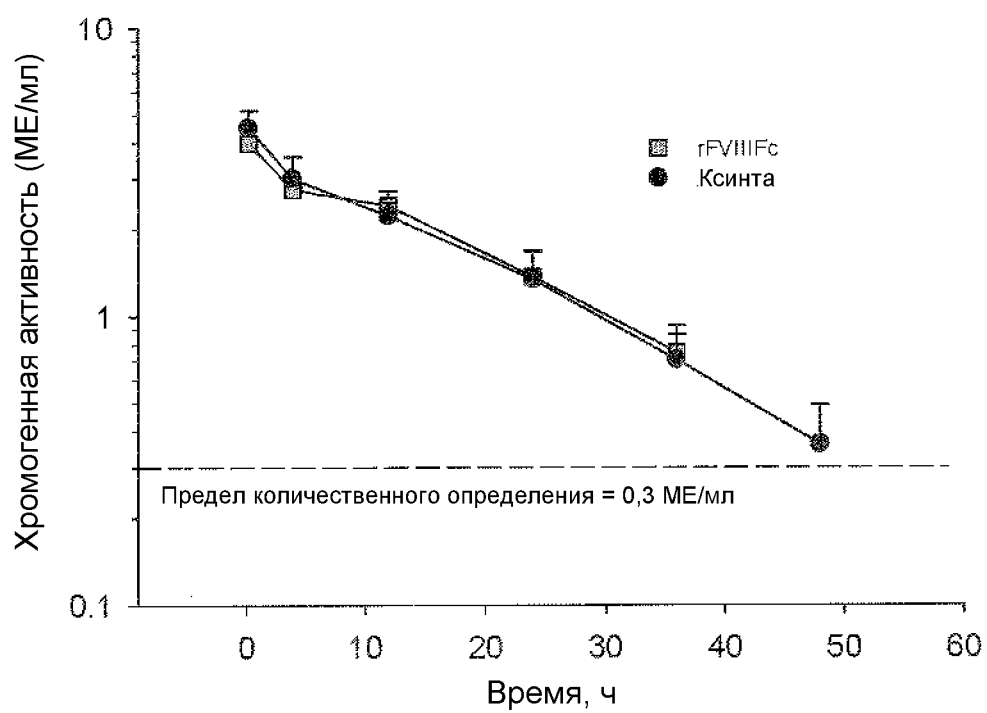
9/19

Фиг. 8



10/19

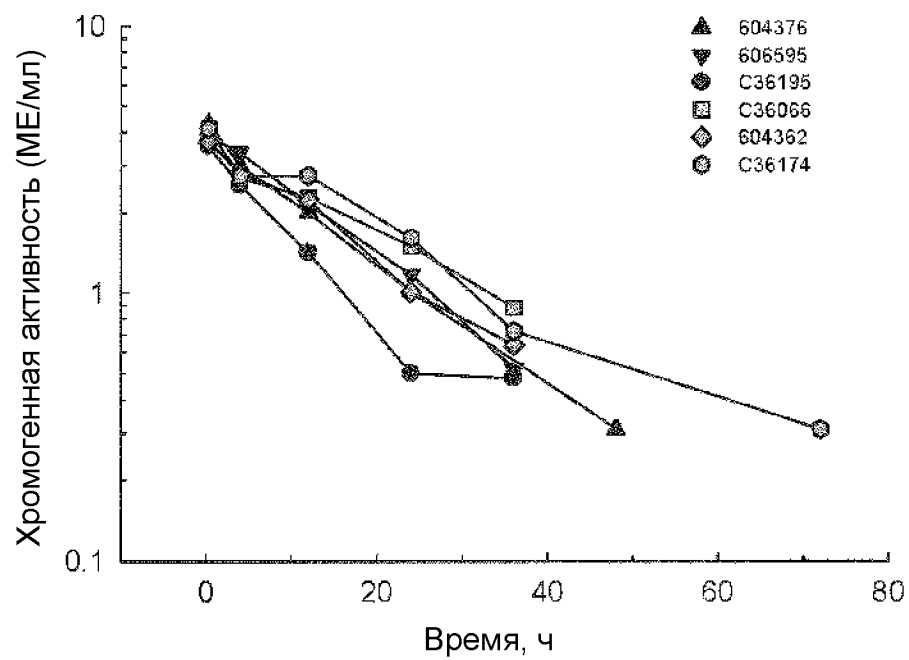
Фиг. 9



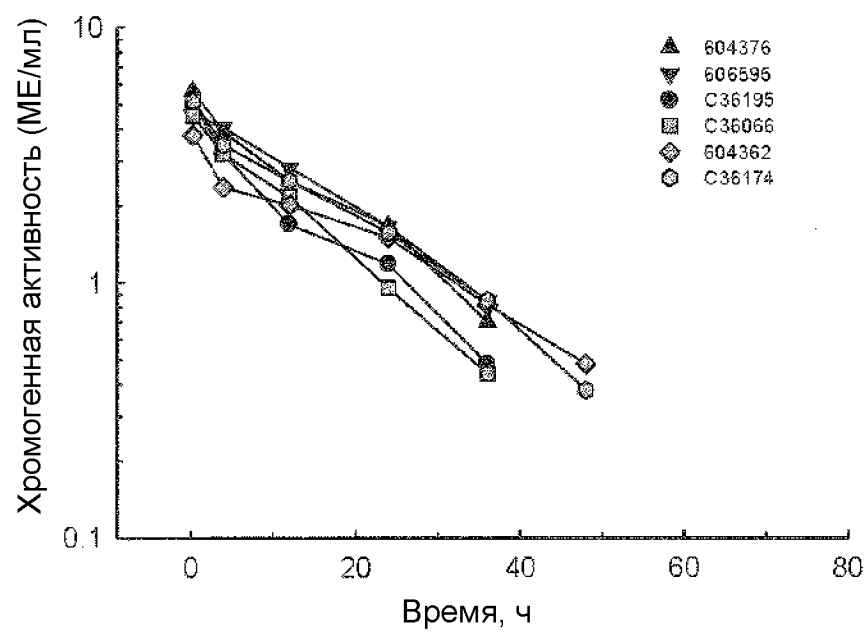
11/19

Фиг. 10

А.

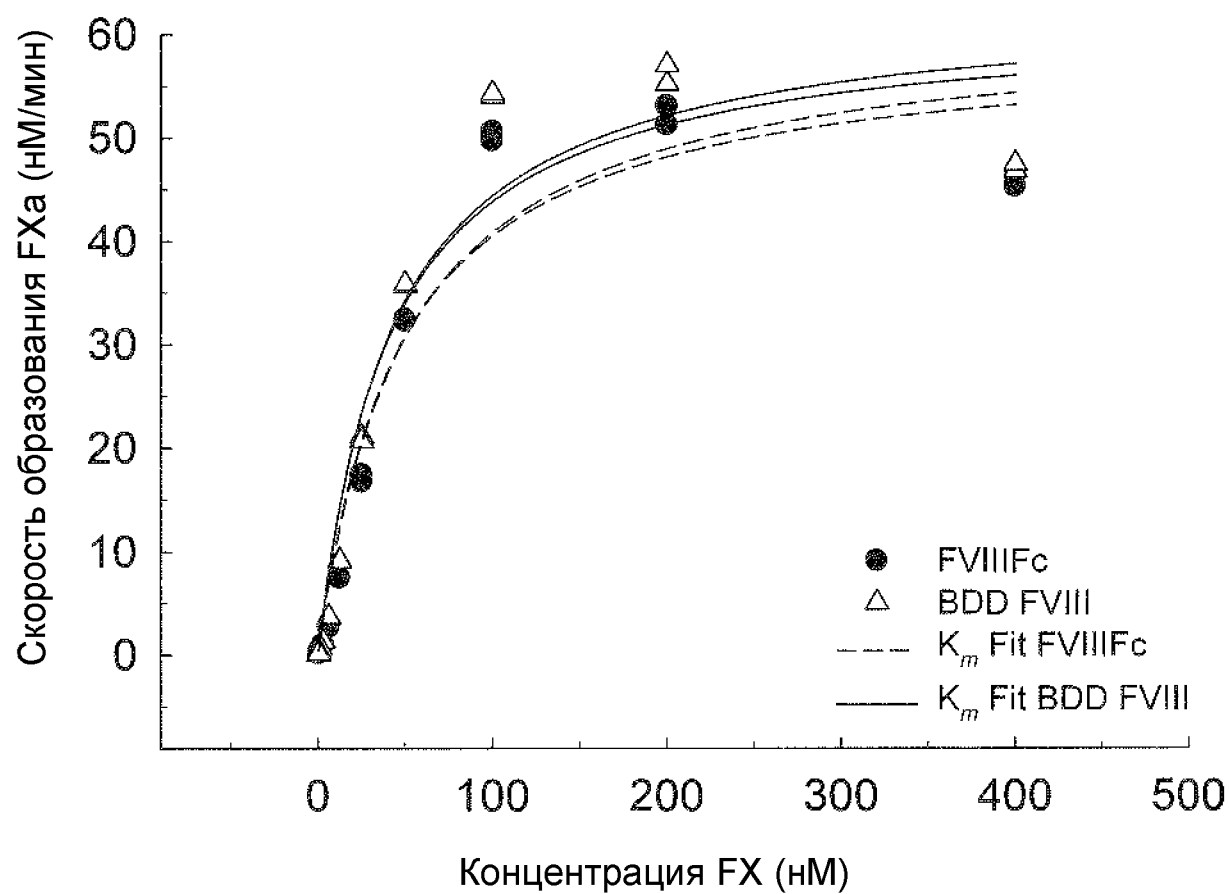


В.



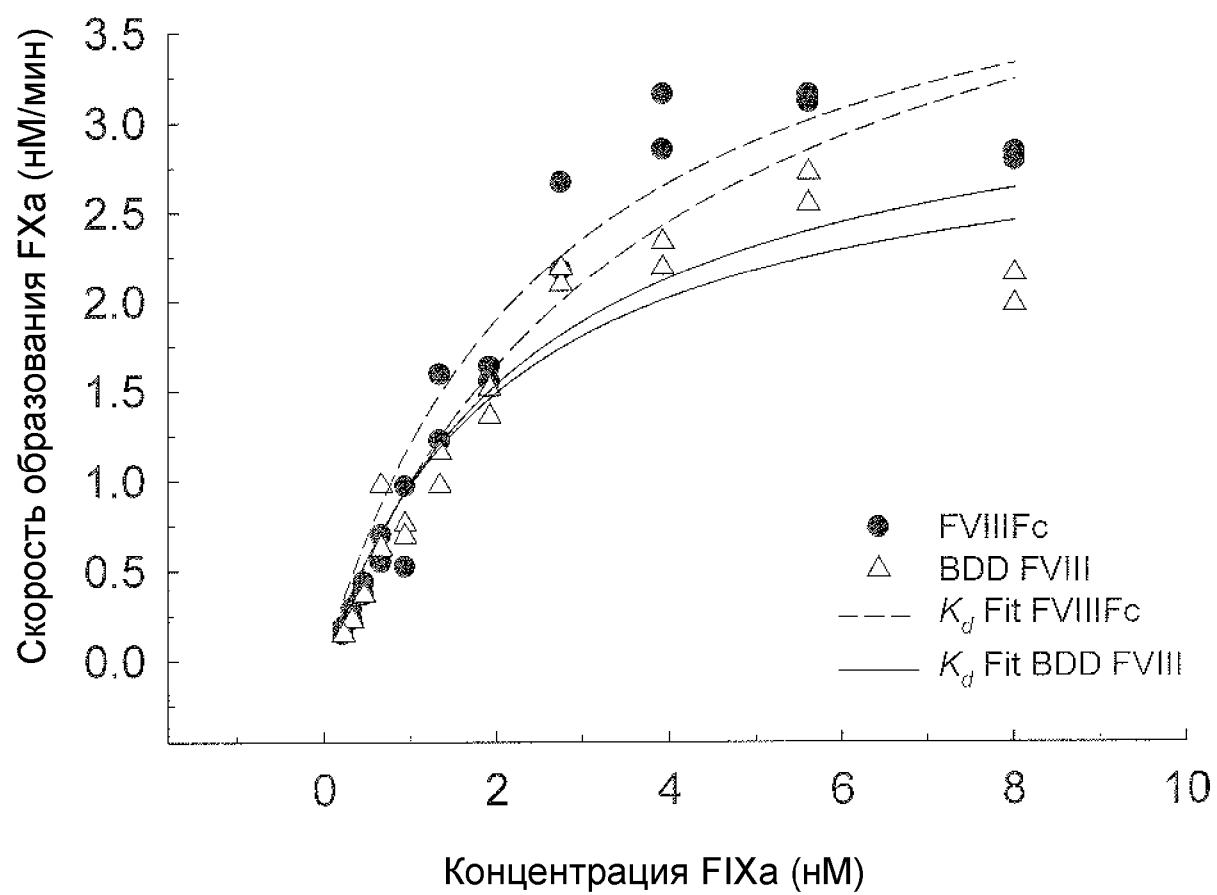
12/19

Фиг. 11



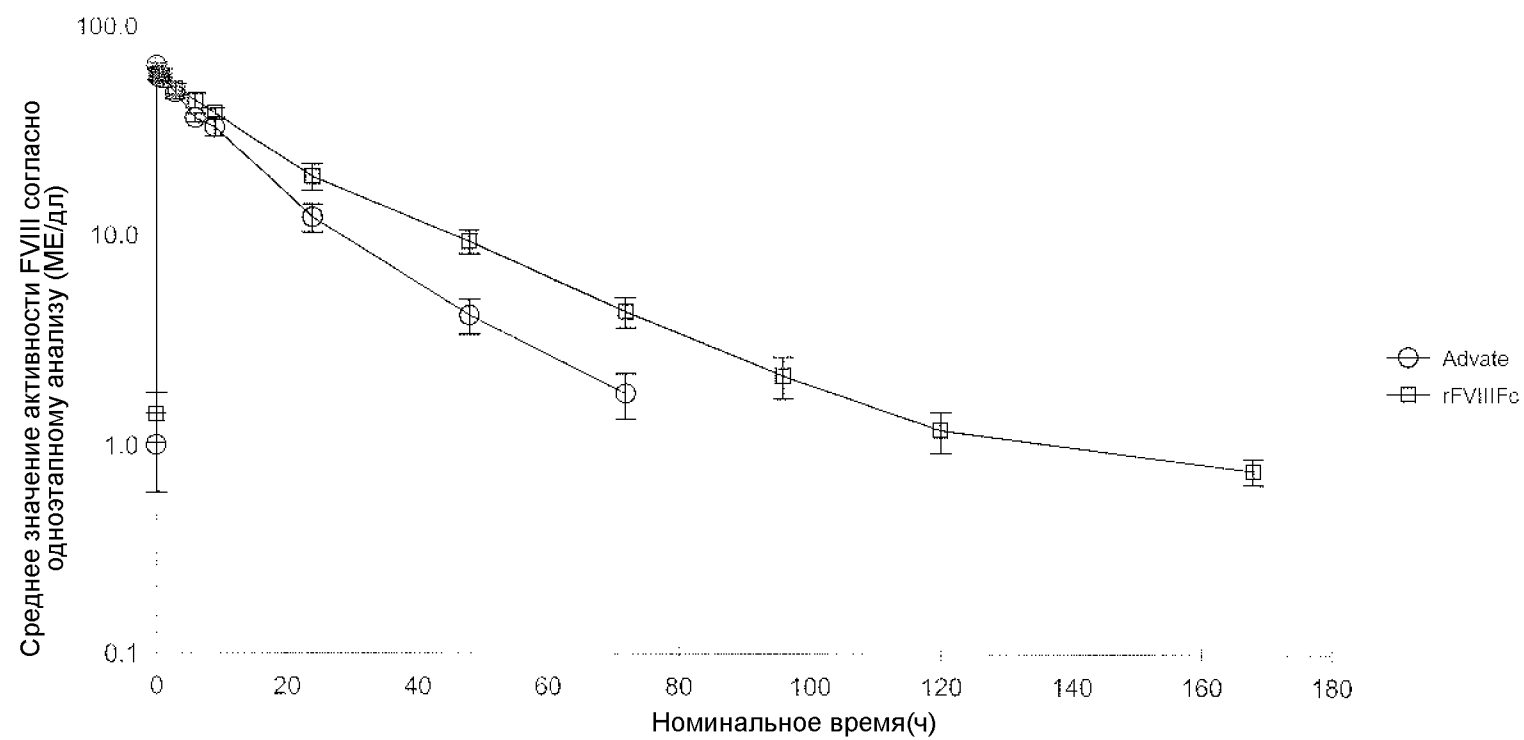
13/19

Фиг. 12



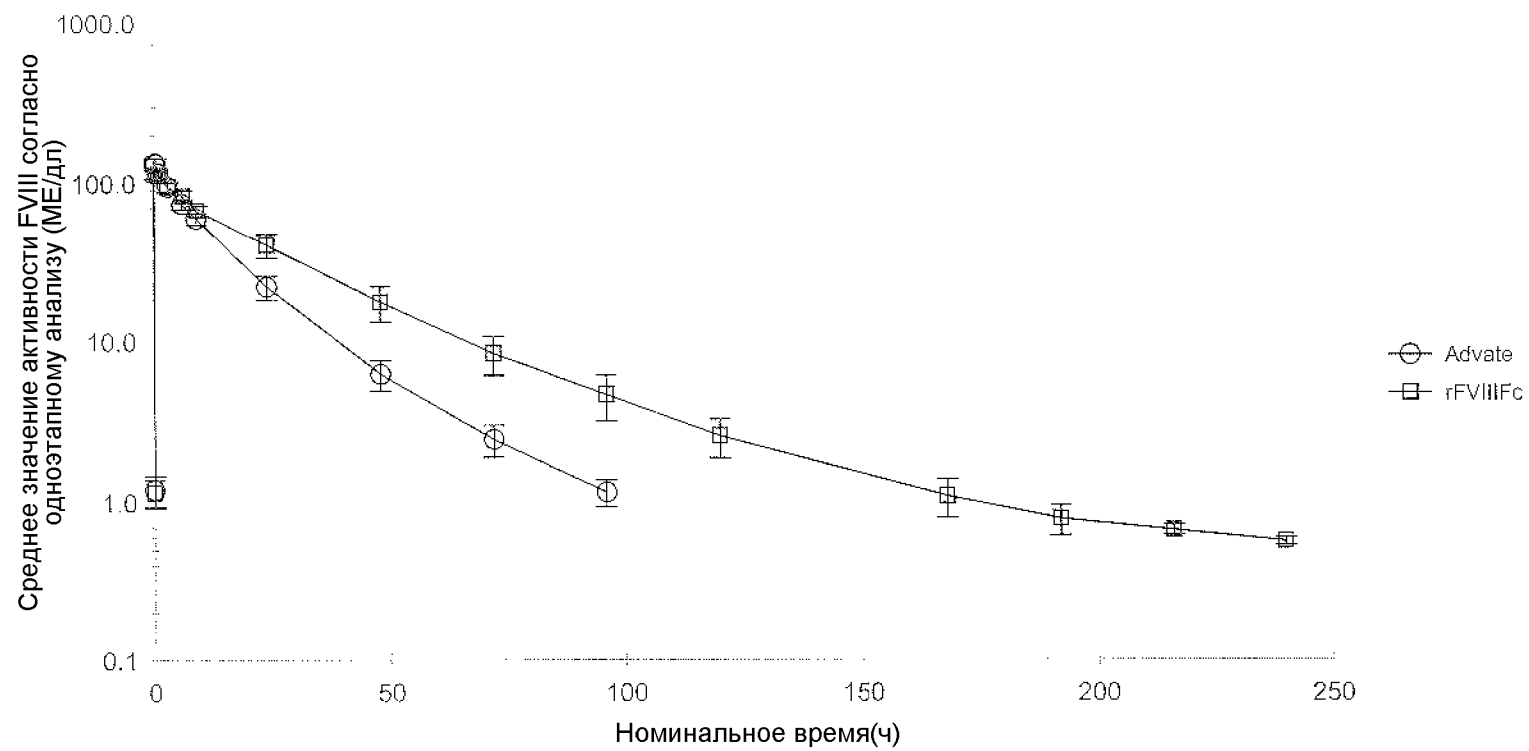
Фиг. 13А

Уровень дозы=25



Фиг. 13В

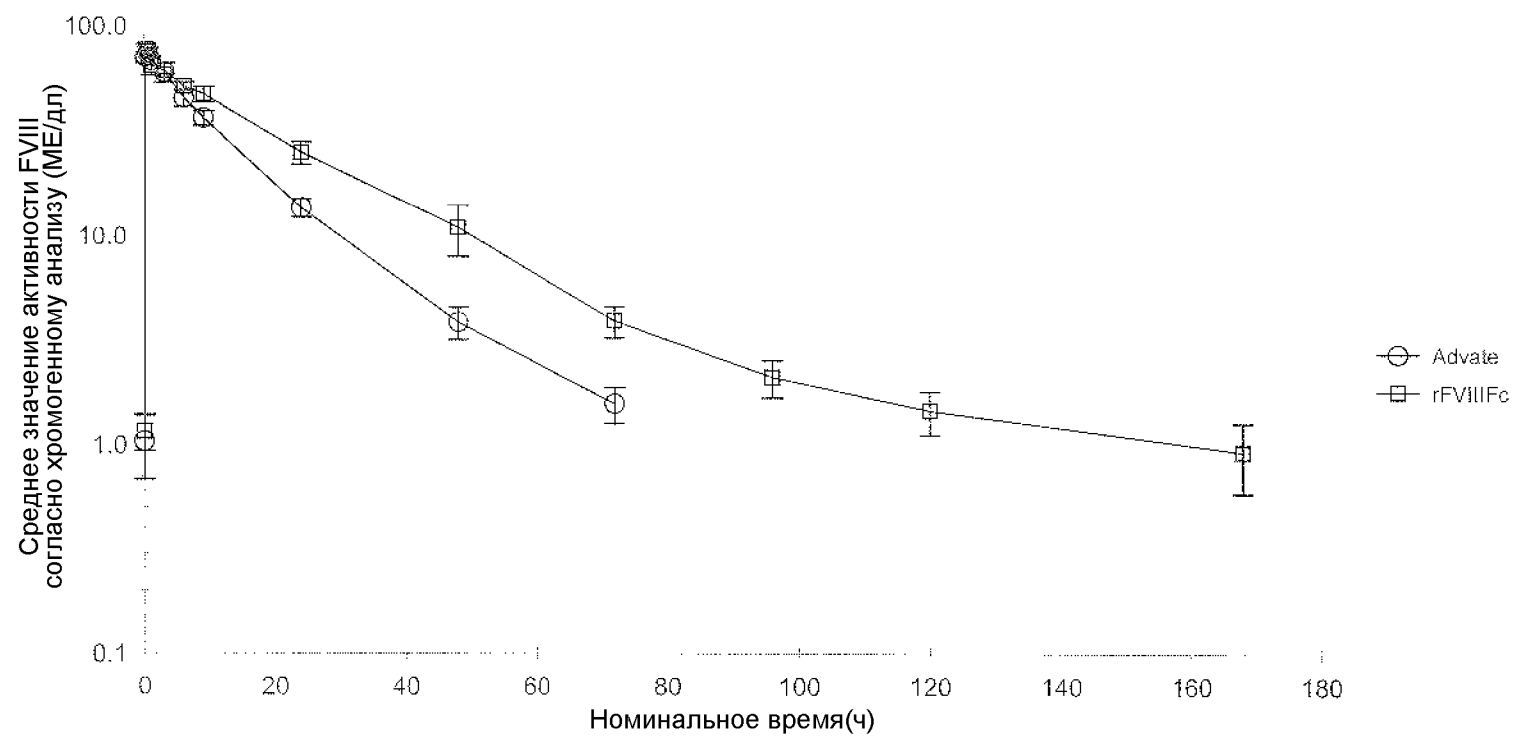
Уровень дозы=65



15/19

Фиг. 13С

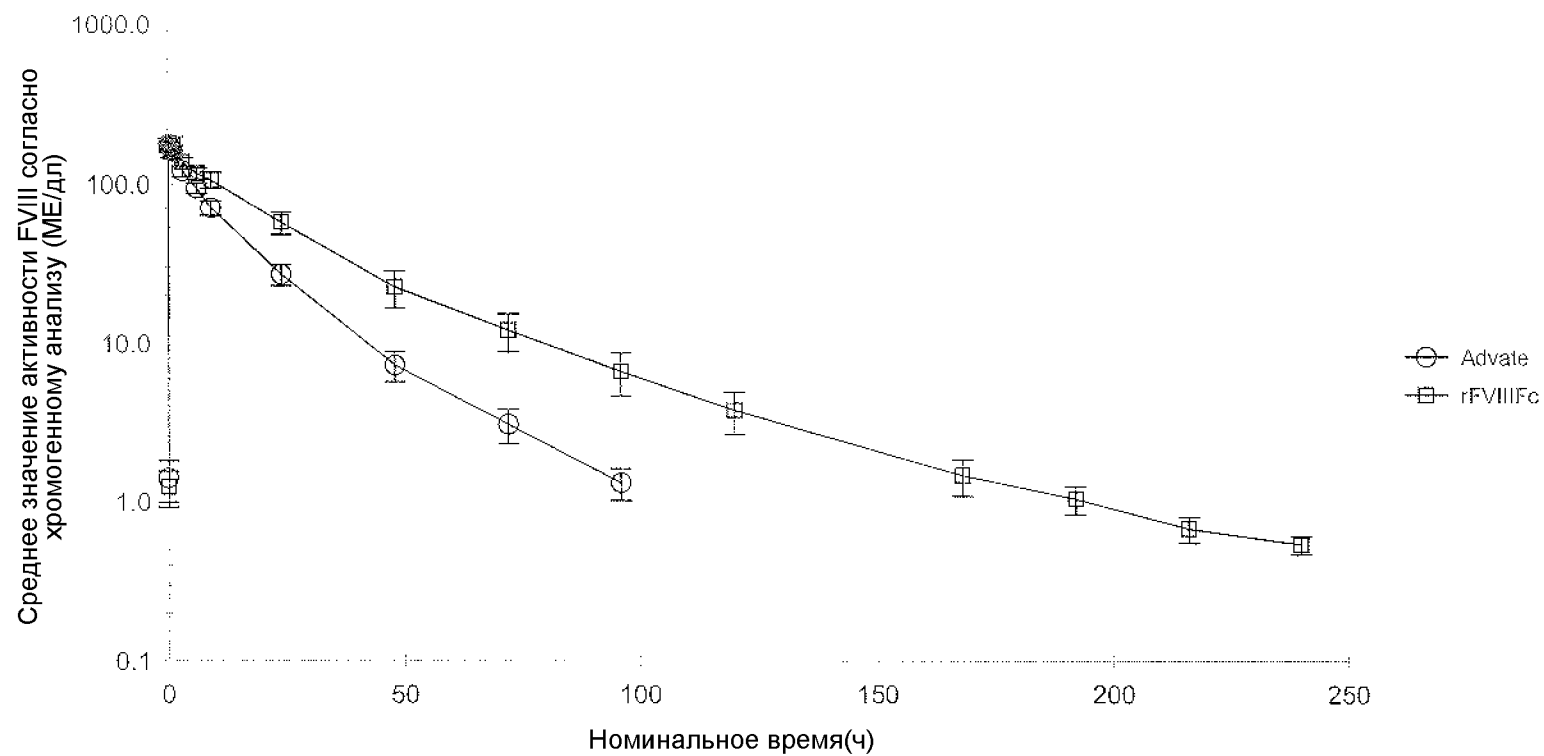
Уровень дозы=25



16/19

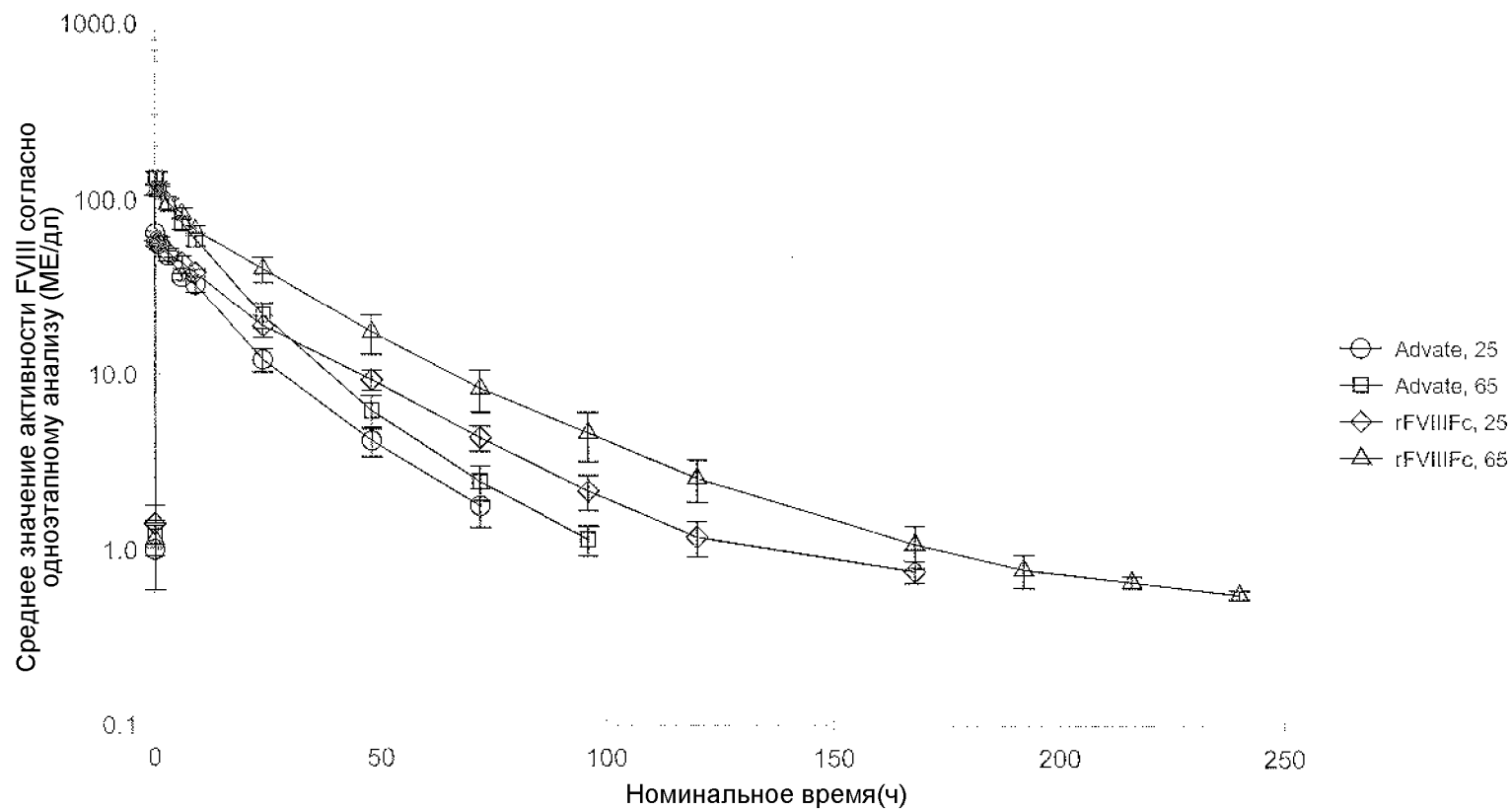
Фиг. 13D

Уровень дозы=65



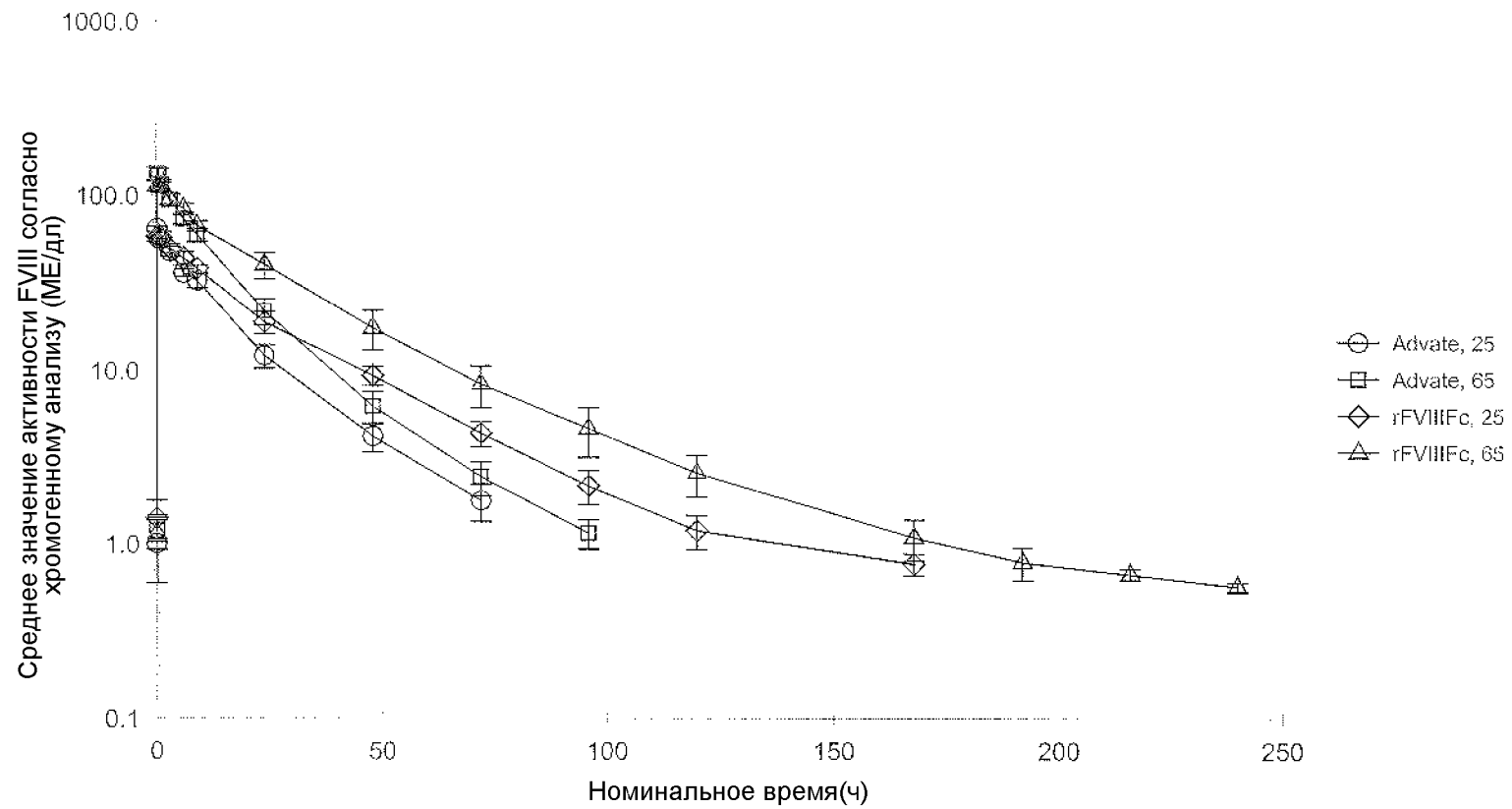
17/19

Фиг. 14А



18/19

Фиг. 14В



19/19