

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290703 (13) A2

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.30

(51) Int. Cl. C07K 14/59 (2006.01)
C07K 14/61 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.07.11

(54) ФАКТОР СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ VII ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ И СПОСОБЫ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

(31) 62/360,767

(32) 2016.07.11

(33) US

(62) 201990255; 2017.07.11

(71) Заявитель:
ОПКО БАЙОЛОДЖИКС ЛТД. (IL)

(72) Изобретатель:
Гершковец Орен, Мошкович Лаура
(IL)

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

(57) Раскрываются полипептиды, содержащие по меньшей мере один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к карбоксильному концу, но не к аминоконцу фактора свертывания крови, и полинуклеотиды, кодирующие их. Также раскрываются фармацевтические композиции и фармацевтические составы, содержащие полипептиды и полинуклеотиды согласно настоящему изобретению, и способы их применения и получения.

202290703

A2

A2

202290703

ФАКТОР СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ VII ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ И СПОСОБЫ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[001] Раскрываются полипептиды, содержащие по меньшей мере один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к карбоксильному концу фактора свертывания крови, и полинуклеотиды, кодирующие их. Также раскрываются фармацевтические композиции и фармацевтические составы, содержащие полипептиды и полинуклеотиды согласно настоящему изобретению, и способы их применения и получения.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[002] Разработка заместительной терапии факторами свертывания крови преобразила жизни многих индивидуумов с гемофилией. Гемофилия представляет собой группу наследственных генетических нарушений, при которых ухудшается способность организма регулировать свертывание крови или коагуляцию. У пациентов с гемофилией не вырабатываются достаточные количества белков фактора VIII или фактора IX, которые являются необходимыми для эффективного свертывания крови. У субъектов с тяжелой формой гемофилии даже незначительное повреждение может приводить к потере крови, которая продолжается в течение нескольких дней или недель, и полное заживление может не происходить, что обуславливает возможность изнуряющего необратимого поражения суставов и других органов и преждевременной смерти.

[003] Гемофилия представляет собой наследственное геморрагическое нарушение, сцепленное с X-хромосомой, вызываемое дефектами или отсутствием критически важных факторов в коагуляционном каскаде. У пациентов с гемофилией образование тромбина и формирование фибриновых сгустков значительно ослаблено, что приводит к эпизодам спонтанного кровотечения, чаще всего в суставах и внутренних органах, и обильному кровотечению во время и после хирургического вмешательства или травмы. У пациентов с гемофилией частые кровотечения также могут приводить к отеку суставов, повреждению суставов, тяжелым

деформациям, частым инфекциям и снижению подвижности (клиника Мэйо). Гемофилия А вызывается дефектами или недостаточностью экспрессии фактора свертывания крови VIII, тогда как гемофилия В вызывается дефектами или недостаточностью экспрессии фактора свертывания крови IX.

[004] Гемофилия В приводит к дефициту прокоагулянтной активности FIX. У пациентов с гемофилией В наблюдаются спонтанные кровоизлияния в мягкие ткани и рецидивирующие гемартрозы, которые часто приводят к инвалидизирующей артропатии. Существующие методы лечения этих пациентов включают внутривенное введение рекомбинантного FIX. Однако, проблемы стоимости и относительно быстрого очищения кровотока от FIX делают разработку FIX пролонгированного действия трудной задачей. Коммерческая доступность FVIII и FIX привела к улучшению контроля опасных для жизни эпизодов кровотечения. Многие пациенты получают профилактическую терапию, которая снижает риск развития кровотечений и ассоциированных с ними осложнений. Однако, у значительной доли пациентов (10–30%) вырабатываются ингибирующие антитела к экзогенно вводимым FVIII и FIX. Введение FVIIa, который является препаратом с шунтирующим механизмом действия, может индуцировать гемостаз и обеспечивать эффективное лечение у пациентов с ингибирующими Ab.

[005] Рекомбинантный FVIIa (NovoSeven®) является коммерчески доступным и был одобрен в 1996 г. для лечения эпизодов кровотечения у пациентов с гемофилией, имеющих ингибиторы. Однако, rFVIIa характеризуется быстрым очищением при конечном периоде полувыведения 2,5 часа. Вследствие этого пациентам, как правило, требуются многократные частые инфузии (2–3 дозы, даваемые с интервалами в 2–3 часа) для достижения надлежащего гемостаза после кровотечения от легкого до умеренного. В связи с этим существует значительный интерес к разработке формы FVIIa пролонгированного действия, которая обеспечивала бы увеличение продолжительности гемостатической активности после введения одной дозы и позволила бы вводить дозы намного менее часто. FVIIa пролонгированного действия также будет обеспечивать повышение осуществимости длительной

профилактической терапии.

[006] Разрабатываются различные технологии для продления периода полувыведения FVIIa. Тем не менее, остается потребность в достижении длительного периода полувыведения этого белка с сохранением при этом его биологической активности и обеспечением того, что модификации не будут индуцировать значительную иммуногенность. В настоящем изобретении эта потребность разрешается путем присоединения карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина к FVIIa с модификацией его таким образом для продления его периода полувыведения и биологической активности.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[007] В одном аспекте раскрывается способ получения полипептида, являющегося фактором свертывания крови VII (FVII) человека, модифицированным карбоксиконцевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина человека, где указанный полипептид содержит три молекулы СТР, присоединенные последовательно одна за другой к С-концу FVII, при этом способ включает стадии: стабильной трансфекции предварительно определенного количества клеток вектором экспрессии, содержащим кодирующую часть, кодирующую указанный СТР-модифицированный FVII, где указанные трансфицированные клетки экспрессируют и секретируют указанный СТР-модифицированный FVII; получения клонов клеток, сверхэкспрессирующих указанный СТР-модифицированный FVII; размножения указанных клонов в растворе до предварительно определенного масштаба; сбора указанного раствора, содержащего указанные клоны; фильтрации указанного раствора, содержащего указанные клоны, с получением осветленного собранного раствора; и очистки указанного полипептида из указанного осветленного собранного раствора с получением очищенного раствора белка, имеющего желаемую концентрацию СТР-модифицированного FVII; с получением таким образом СТР-модифицированного FVII, где аминокислотная последовательность получаемого СТР-модифицированного FVII приведена под SEQ ID NO: 7.

[008] В другом аспекте раскрывается способ получения полипептида, являющегося активным фактором свертывания крови VII (FVIIa) человека, модифицированным карбоксиконцевым пептидом

(СТР) хорионического гонадотропина человека, где указанный полипептид содержит три молекулы СТР, присоединенные последовательно одна за другой к С-концу FVII, при этом способ включает стадии: стабильной трансфекции предварительно определенного количества клеток вектором экспрессии, содержащим кодирующую часть, кодирующую СТР-модифицированный FVII, где указанные трансфицированные клетки экспрессируют и секретируют указанный СТР-модифицированный FVII; получения клонов клеток, сверхэкспрессирующих указанный СТР-модифицированный FVII; размножения указанных клонов в растворе до предварительно определенного масштаба; сбора указанного раствора, содержащего указанные клоны; фильтрации указанного раствора, содержащего указанные клоны, с получением осветленного собранного раствора; и очистки и активации указанного полипептида из указанного осветленного собранного раствора с получением очищенного раствора белка, имеющего желаемую концентрацию СТР-модифицированного FVIIa; с получением таким образом СТР-модифицированного FVIIa, где аминокислотная последовательность получаемого СТР-модифицированного FVIIa приведена под SEQ ID NO: 7.

[009] В другом аспекте раскрывается полипептид, являющийся фактором свертывания крови VII (FVII) человека, модифицированным карбоксиконцевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина человека, содержащий три молекулы СТР, присоединенные последовательно одна за другой к С-концу FVII, где указанный СТР-модифицированный FVII получен с помощью способа, включающего стадии: стабильной трансфекции предварительно определенного количества клеток вектором экспрессии, содержащим кодирующую часть, кодирующую указанный СТР-модифицированный FVII, где указанные трансфицированные клетки экспрессируют и секретируют указанный СТР-модифицированный FVII; получения клонов клеток, сверхэкспрессирующих указанный СТР-модифицированный FVII; размножения указанных клонов в растворе до предварительно определенного масштаба; сбора указанного раствора, содержащего указанные клоны; фильтрации указанного раствора, содержащего указанные клоны, с получением осветленного собранного раствора;

и очистки указанного полипептида из указанного осветленного собранного раствора с получением очищенного раствора белка, имеющего желаемую концентрацию СТР-модифицированного FVII; где указанный получаемый СТР-модифицированный FVII содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 7.

[010] В другом аспекте раскрывается полипептид, являющийся активированным фактором свертывания крови VII (FVIIa) человека, модифицированным карбоксиконцевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина человека, содержащий три молекулы СТР, присоединенные последовательно одна за другой к С-концу FVII, где указанный СТР-модифицированный FVIIa получен с помощью способа, включающего стадии: стабильной трансфекции предварительно определенного количества клеток вектором экспрессии, содержащим кодирующую часть, кодирующую указанный СТР-модифицированный FVII, где указанные трансфицированные клетки экспрессируют и секретируют указанный СТР-модифицированный FVII; получения клонов клеток, сверхэкспрессирующих указанный СТР-модифицированный FVII; размножения указанных клонов в растворе до предварительно определенного масштаба; сбора указанного раствора, содержащего указанные клоны; фильтрации указанного раствора, содержащего указанные клоны, с получением осветленного собранного раствора; и очистки и активации указанного полипептида из указанного осветленного собранного раствора с получением очищенного раствора белка, имеющего желаемую концентрацию СТР-модифицированного FVIIa; где указанный получаемый СТР-модифицированный FVIIa содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 7.

[011] В связанном аспекте получаемый полипептид, являющийся фактором свертывания крови VII (FVII) человека, модифицированным карбоксиконцевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина человека, является высокогликозилированным. В другом связанном аспекте профиль гликозилирования получаемого СТР-модифицированного FVII предусматривает гликозилирование в по меньшей мере 4 сайтах О-связанного гликозилирования на СТР. В другом связанном аспекте указанный СТР-модифицированный FVII

имеет высокое процентное содержание заряженных N-гликанов. В другом связанном аспекте получаемый полипептид, являющийся фактором свертывания крови VII (FVII) человека, модифицированным карбоксиконцевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина человека, является высокосиалилированным.

[012] В связанном аспекте получаемый полипептид, являющийся фактором свертывания крови VII (FVII) человека, модифицированным карбоксиконцевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина человека, предусматривает высокое процентное содержание карбоксилированных остатков глутаминовой кислоты.

[013] В связанном аспекте размножение клонов включает размножение клонов, полученных из рабочего банка клеток (WCB) или из главного банка клеток (MCB). В другом связанном аспекте указанные клоны экспрессируют и секретируют СТР-модифицированный FVII на уровне, составляющем по меньшей мере 600 мг/л. В другом связанном аспекте указанные клоны размножают в растворе посредством ряда стадий субкультивирования до уровня, характерного для производственного биореактора. В другом связанном аспекте биореактор предусматривает одноразовый биореактор или биореактор из нержавеющей стали. В другом связанном аспекте указанный биореактор функционирует в качестве биореактора в режиме периодического культивирования с подпиткой.

[014] В связанном аспекте по меньшей мере 60% очищенного полипептида, являющегося фактором свертывания крови VII (FVII) человека, модифицированным карбоксиконцевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина человека, из указанного осветленного собранного материала составляет высокогликозилированная форма СТР-модифицированного FVII. В связанном аспекте по меньшей мере 60% очищенного полипептида, являющегося фактором свертывания крови VII (FVII) человека, модифицированным карбоксиконцевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина человека, из указанного осветленного собранного материала предусматривает высокое процентное содержание карбоксилированных остатков глутаминовой кислоты.

[015] В связанном аспекте очистка включает последовательное выполнение стадий, включающих пропускание указанного

осветленного собранного материала через колонку для аффинной хроматографии, колонку для хроматографии на мультимодальных матрицах или наполнителях смешанного типа, колонку для хроматографии гидрофобных взаимодействий и колонку для анионообменной хроматографии; инактивацию вирусов, присутствующих в осветленном собранном материале или в элюате, собранном после колоночной хроматографии, или в любой их комбинации, где инактивация вирусов включает инкубирование в растворе, токсичном для указанных вирусов, или нанофильтрацию или любую их комбинацию; и где элюат после анионообменной хроматографии проходит стадию ультрафильтрации/диафильтрации.

[016] В связанном аспекте получаемый полипептид, являющийся (СТР)-модифицированным фактором свертывания крови VII (FVII) человека, включает в себя полипептид, являющийся активным СТР-модифицированным FVII (полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVIIa).

[017] В связанном аспекте с помощью способа получения достигают по меньшей мере 20% степени извлечения высокогликозилированного СТР-модифицированного FVII.

[018] В другом аспекте композиция содержит получаемый СТР-модифицированный FVII и фармацевтически приемлемый носитель.

[019] В другом аспекте в данном документе раскрывается полипептид, являющийся активным фактором свертывания крови VII (FVIIa) человека, модифицированным карбоксиконцевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина человека, содержащий три молекулы СТР, присоединенные последовательно одна за другой к С-концу FVIIa, где указанный полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVIIa, находится в по существу чистой и активной форме, при этом указанный полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVIIa, предусматривает: (a) высокое содержание сиаловой кислоты; (b) низкое содержание окисленной формы; (c) высокогликозилированную форму; (d) высокое процентное содержание карбоксилированных остатков глутаминовой кислоты; (e) высокое процентное содержание заряженных N-гликанов и (f) высокую удельную активность или любую их комбинацию, где указанный СТР-модифицированный FVIIa содержит аминокислотную

последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 7.

[020] В связанном аспекте высокое содержание сиаловой кислоты составляет по меньшей мере 15 моль/моль. В другом связанном аспекте высокогликозилированная форма предусматривает содержание О-гликанов, составляющее по меньшей мере 10 моль/моль. В другом связанном аспекте по существу чистая и активная форма содержит по меньшей мере 60% высокогликозилированной формы указанного активного СТР-модифицированного FVIIa. В другом связанном аспекте по меньшей мере 60% по существу чистой и СТР-модифицированной формы FVIIa предусматривает высокое процентное содержание карбоксилированных остатков глутаминовой кислоты (Gla). В другом связанном аспекте высокое процентное содержание карбоксилированных остатков глутаминовой кислоты (Gla) составляет по меньшей мере 90% остатков Gla. В другом связанном аспекте низкое процентное содержание окисленной формы составляет менее 5%. В другом связанном аспекте степень чистоты указанного по существу чистого и активного полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVII, составляет по меньшей мере 90%. В дополнительном связанном аспекте процентное значение степени чистоты выбрано из группы, состоящей из 97,3%, 97,6%, 97,4% и 97,0%. В другом связанном аспекте удельная активность указанного по существу чистого и активного полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVII, составляет по меньшей мере 10500 ед./мг. В дополнительном связанном аспекте удельная активность выбрана из группы, состоящей из 15563 ед./мг, 16720 ед./мг, 22478 ед./мг и 23608 ед./мг.

[021] В другом аспекте в данном документе раскрывается композиция, содержащая СТР-модифицированный FVIIa, который предусматривает: (a) высокое содержание сиаловой кислоты; (b) низкое содержание окисленной формы; (c) высокогликозилированную форму; (d) высокое процентное содержание карбоксилированных остатков глутаминовой кислоты; (e) высокое процентное содержание заряженных N-гликанов и (f) высокую удельную активность или любую их комбинацию, где указанный СТР-модифицированный FVIIa содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ

ID NO: 7, и фармацевтически приемлемый носитель.

[022] Другие признаки и преимущества станут очевидными из нижеследующего подробного описания, примеров и фигур. Следует, однако, понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хоть они и указывают на предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения, приведены только для иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации в пределах сущности и объема настоящего изобретения станут очевидными специалистам в данной области из этого подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[023] Файл патента или заявки содержит по меньшей мере один графический материал, выполненный в цвете. Копии данного патента или публикации заявки на патент с цветным(цветными) графическим(графическими) материалом(материалами) будут предоставлены ведомством по запросу и после оплаты необходимой пошлины.

[024] **Фигура 1.** Показана карта плазмиды pCI-dhfr-MOD-5014.

[025] **Фигура 2А.** Показано схематическое изображение процесса очистки FVII-СТР₃. Партию 31 получали для исследования PK/PD.

[026] **Фигура 2В.** Показано схематическое изображение процесса очистки FVII-СТР₃. Партию 38 получали для исследования выживаемости.

[027] **Фигура 3А.** Показаны картины SDS-PAGE и вестерн-блоттинга конечного FVII и FVIIa. На каждую дорожку геля для SDS-PAGE, окрашенного кумасси, загружали 10 мкг (партия 31) или 5 мкг (партия 38). 1. Полипептид FVII-СТР₃. 2. Тяжелая цепь, в том числе 3х СТР. 3. Легкая цепь. Все три антитела выявляли FVII.

[028] **Фигура 3В.** Показаны картины SDS-PAGE и вестерн-блоттинга конечного FVII и FVIIa. На каждую дорожку геля для SDS-PAGE, окрашенного кумасси, загружали 10 мкг (партия 31) или 5 мкг (партия 38). 1. Полипептид FVII-СТР₃. 2. Тяжелая цепь, в том числе 3х СТР. 3. Легкая цепь.

[029] **Фигура 3С.** Показаны картины SDS-PAGE и вестерн-блоттинга конечного FVII и FVIIa. На каждую дорожку геля для

SDS-PAGE, окрашенного кумасси, загружали 10 мкг (партия 31) или 5 мкг (партия 38). 1. Полипептид FVII-СТР₃. 2. Тяжелая цепь, в том числе 3х СТР. 3. Легкая цепь.

[030] **фигура 3D.** Показаны картины SDS-PAGE и вестерн-блоттинга конечного FVII и FVIIa. На каждую дорожку геля для SDS-PAGE, окрашенного кумасси, загружали 10 мкг (партия 31) или 5 мкг (партия 38). 1. Полипептид FVII-СТР₃. 2. Тяжелая цепь, в том числе 3х СТР. 3. Легкая цепь.

[031] **фигура 3E.** Показаны картины SDS-PAGE и вестерн-блоттинга конечного FVII и FVIIa. На каждую дорожку геля для SDS-PAGE, окрашенного кумасси, загружали 10 мкг (партия 31) или 5 мкг (партия 38). 1. Полипептид FVII-СТР₃. 2. Тяжелая цепь, в том числе 3х СТР. 3. Легкая цепь.

[032] **фигура 3F.** Показаны картины SDS-PAGE и вестерн-блоттинга конечного FVII и FVIIa. На каждую дорожку геля для вестерн-блоттинга загружали 1 мкг белка. 1. Полипептид FVII-СТР₃. 2. Тяжелая цепь, в том числе 3х СТР. 3. Легкая цепь. Все три антитела выявляли FVII. Легкую цепь FVIIa выявляли с помощью обоих α -FVII.

[033] **фигура 3G.** Показаны картины SDS-PAGE и вестерн-блоттинга конечного FVII и FVIIa. На каждую дорожку геля для вестерн-блоттинга загружали 1 мкг белка. 1. Полипептид FVII-СТР₃. 2. Тяжелая цепь, в том числе 3х СТР. 3. Легкая цепь. Все три антитела выявляли FVII. Тяжелую цепь FVIIa выявляли с помощью α -СТР.

[034] **фигура 3H.** Показаны картины SDS-PAGE и вестерн-блоттинга конечного FVII и FVIIa. На каждую дорожку геля для вестерн-блоттинга загружали 1 мкг белка. 1. Полипептид FVII-СТР₃. 2. Тяжелая цепь, в том числе 3х СТР. 3. Легкая цепь. Все три антитела выявляли FVII. Тяжелую цепь FVIIa выявляли с помощью α -Gla.

[035] **фигура 4.** Показано, что в результате очистки на колонке с керамическим гидроксипатитом (НА) повышается хромогенная активность FVII-СТР₃. Сравнительную оценку удельной активности *in vitro* для собранного материала, содержащего FVII-СТР₃, фракций, отбираемых в ходе процесса, и очищенного FVII-СТР₃

в сравнении с пулом нормальной плазмы крови человека выполняли с помощью коммерчески доступного набора для тестирования хромогенной активности BIOPHEN (Hyphen BioMed 221304). Собранный материал, содержащий FVII-СТР₃, и сам белок подвергали серийному разведению, и удельную активность оценивали путем сравнения кривой зависимости доза-ответ с кривой эталонного препарата нормальной плазмы крови человека.

[036] **фигура 5.** Показан РК-профиль FVIIa-СТР₃ в сравнении с NovoSeven® у мышей с дефицитом FVIII. FVIIa-СТР₃ получали после отбора FVII, процесса очистки на НА и активации. FVIIa-СТР₃ или NovoSeven® вводили в виде однократной внутривенной инъекции FVIII-/- мышам с гемофилией. Образцы крови забирали из ретроорбитального синуса через 0,083, 0,5, 2, 8, 24, 48 и 72 часа после введения дозы. Цитратную плазму крови (0,38%) получали сразу после отбора образцов и хранили при -20°C до проведения анализа, и РК-профиль устанавливали на основании свертывающей активности FVIIa с помощью коммерческого набора STACLOT.

[037] **фигура 6А.** Показано, что FVIIa-СТР₃ получали после отбора FVII, процесса очистки на НА и активации. FVIIa-СТР₃ или NovoSeven® вводили в виде однократной внутривенной инъекции FVIII-/- мышам с гемофилией. Образцы крови забирали из ретроорбитального синуса через 0,083, 0,5, 2, 8, 24, 48 и 72 часа после введения дозы. Цитратную плазму крови (0,38%) получали сразу после отбора образцов и хранили при -20°C до проведения анализа. Параметры образования тромбина оценивали в ходе РК-эксперимента, и оценивали параметры, включающие отношение максимального количества к времени достижения пика.

[038] **фигура 6В.** Показано, что FVIIa-СТР₃ получали после отбора FVII, процесса очистки на НА и активации. FVIIa-СТР₃ или NovoSeven® вводили в виде однократной внутривенной инъекции FVIII-/- мышам с гемофилией. Образцы крови забирали из ретроорбитального синуса через 0,083, 0,5, 2, 8, 24, 48 и 72 часа после введения дозы. Цитратную плазму крови (0,38%) получали сразу после отбора образцов и хранили при -20°C до проведения анализа. Параметры образования тромбина оценивали в

ходе РК-эксперимента, и оценивали параметры, включающие количество тромбина в каждый момент времени.

[039] **фигура 6С.** Показано, что FVIIa-СТР₃ получали после отбора FVII, процесса очистки на НА и активации. FVIIa-СТР₃ или NovoSeven® вводили в виде однократной внутривенной инъекции FVIII-/- мышам с гемофилией. Образцы крови забирали из ретроорбитального синуса через 0,083, 0,5, 2, 8, 24, 48 и 72 часа после введения дозы. Цитратную плазму крови (0,38%) получали сразу после отбора образцов и хранили при -20°C до проведения анализа. Параметры образования тромбина оценивали в ходе РК-эксперимента, и оценивали параметры, включающие скорость образования тромбина.

[040] **фигура 7А.** Показаны кривые выживаемости мышей с гемофилией после рассечения хвостовой вены (TVT). TVT выполняли через 15 мин. после введения. Выживаемость мышей наблюдали в течение 24 часов после TVT и регистрировали каждый час в течение первых 12 часов и спустя 24 часа. Данные контрольной группы (инертная среда) являются суммарными для 3 экспериментов с 5 мышами в каждом эксперименте.

[041] **фигура 7В.** Показаны кривые выживаемости мышей с гемофилией после рассечения хвостовой вены (TVT). TVT выполняли через 24 часа после введения. Выживаемость мышей наблюдали в течение 24 часов после TVT и регистрировали каждый час в течение первых 12 часов и спустя 24 часа. Данные контрольной группы (инертная среда) являются суммарными для 3 экспериментов с 5 мышами в каждом эксперименте.

[042] **фигура 7С.** Показаны кривые выживаемости мышей с гемофилией после рассечения хвостовой вены (TVT). TVT выполняли через 48 часов после введения. Выживаемость мышей наблюдали в течение 24 часов после TVT и регистрировали каждый час в течение первых 12 часов и спустя 24 часа. Данные контрольной группы (инертная среда) являются суммарными для 3 экспериментов с 5 мышами в каждом эксперименте.

[043] **фигура 7D.** Обобщенно представлена выживаемость мышей, регистрируемая через 24 часа после TVT.

[044] **фигура 8.** Показано сравнение активности расщепления

субстрата (Pefachrome FVIIa) между FVIIa (NovoSeven) и СТР-модифицированным фактором свертывания крови VIIa (MOD-5014).

[045] **Фигура 9.** Показано сравнение активности в отношении субстрата (Pefachrome FVIIa) между FVIIa (NovoSeven) и СТР-модифицированным фактором свертывания крови VIIa (MOD-5014), связанным с тканевым фактором.

[046] **Фигура 10.** Показано сравнение образования активированного фактора свертывания крови X под действием FVIIa (NovoSeven) или СТР-модифицированного FVIIa (MOD-5014) с учетом концентрации фактора свертывания крови VIIa.

[047] **Фигура 11.** Показано сравнение образования активированного фактора свертывания крови X под действием FVIIa (NovoSeven) или СТР-модифицированного FVIIa (MOD-5014) с учетом концентрации фактора свертывания крови X.

[048] **Фигуры 12А и 12В.** Показано сравнение скорости образования активированного фактора свертывания крови X под действием FVIIa (NovoSeven) или СТР-модифицированного FVIIa (MOD-5014) в отсутствие тканевого фактора и с учетом концентрации липидов (**фигура 12А**). Показано сравнение образования активированного фактора свертывания крови X под действием FVIIa (NovoSeven) или СТР-модифицированного FVIIa (MOD-5014) в отсутствие тканевого фактора и с учетом концентрации липидов (**фигура 12В**).

[049] **Фигура 13.** Показано сравнение образования активированного фактора свертывания крови X между FVIIa (NovoSeven) и MOD-5014 в отсутствие тканевого фактора и с учетом концентрации фактора свертывания крови X.

[050] **Фигура 14.** Показано сравнение ингибирования расщепления субстрата (Pefachrome FVIIa) под действием FVIIa (NovoSeven) и СТР-модифицированного FVIIa (MOD-5014) с учетом влияния полибрена.

[051] **Фигуры 15А–15С.** Показано сравнение ингибирования расщепления субстрата (Pefachrome FXa) под действием FVIIa (NovoSeven) и СТР-модифицированного FVIIa (MOD-5014) с учетом концентрации TFPI (**фигура 15А**), а также продолжительности воздействия TFPI для FVIIa (**фигура 15В**) и MOD-5014 (**фигура 15С**).

[052] **Фигура 16.** Показана блок-схема производственного процесса накопления биомассы, содержащей СТР-модифицированный FVII-СТР₃.

[053] **Фигура 17.** Представлена блок-схема процесса очистки СТР-модифицированного FVII-СТР₃.

[054] **Фигура 18.** Представлены результаты SDS-PAGE в восстанавливающих условиях для очищенного СТР-модифицированного FVII-СТР₃.

[055] **Фигура 19.** Показано, что процентное содержание заряженных N-гликанов в общем количестве N-гликанов было постоянным в ходе процесса очистки, при этом изначальное процентное содержание заряженных N-гликанов определяется процессом накопления биомассы культуры клеток.

[056] **Фигура 20.** Представлено содержание окисленных форм и других родственных форм, которое снижается на протяжении всего процесса очистки. Стадии очистки на колонках для хроматографии на мультимодальных матрицах и НИС оказывают наиболее значительное влияние на снижение количества окисленных форм и родственных форм.

[057] **Фигура 21.** Представлено удаление белков, не являющихся гамма-карбоксилированными, на колонке для хроматографии на мультимодальных матрицах. В колонке с СНТ обогащается фракция гамма-карбоксилированных белков путем удаления белков, не являющихся гамма-карбоксилированными.

[058] **Фигура 22.** Представлено содержание сиаловой кислоты на протяжении всего процесса очистки. Содержание сиаловой кислоты было постоянным в ходе процесса очистки, при этом изначальное содержание сиаловой кислоты определяется процессом накопления биомассы культуры клеток.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[059] В одном варианте осуществления раскрывается способ получения полипептида, являющегося фактором свертывания крови VII (FVII) человека, модифицированным карбоксиконцевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина человека, где указанный FVII содержит три молекулы СТР, присоединенные последовательно одна за другой к его С-концу, при этом способ включает стадии:

стабильной трансфекции предварительно определенного количества клеток вектором экспрессии, содержащим кодирующую часть, кодирующую указанный СТР-модифицированный FVII, где указанные трансфицированные клетки экспрессируют и секретируют указанный СТР-модифицированный FVII; получения клонов клеток, сверхэкспрессирующих указанный СТР-модифицированный FVII; размножения указанных клонов в растворе до предварительно определенного масштаба; сбора указанного раствора, содержащего указанные клоны; фильтрации указанного раствора, содержащего указанные клоны, с получением осветленного собранного раствора; и очистки указанного осветленного собранного раствора с получением очищенного раствора белка, имеющего желаемую концентрацию СТР-модифицированного FVII; с получением таким образом СТР-модифицированного FVII, где аминокислотная последовательность получаемого СТР-модифицированного FVII приведена под SEQ ID NO: 7.

[060] В одном варианте осуществления раскрывается фактор свертывания крови VII (FVII) человека, модифицированный карбоксиконцевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина человека, содержащий три молекулы СТР, присоединенные последовательно одна за другой к его С-концу, где указанный СТР-модифицированный FVII получен с помощью способа, включающего стадии: стабильной трансфекции предварительно определенного количества клеток вектором экспрессии, содержащим кодирующую часть, кодирующую указанный СТР-модифицированный FVII, где указанные трансфицированные клетки экспрессируют и секретируют указанный СТР-модифицированный FVII; получения клонов клеток, сверхэкспрессирующих указанный СТР-модифицированный FVII; размножения указанных клонов в растворе до предварительно определенного масштаба; сбора указанного раствора, содержащего указанные клоны; фильтрации указанного раствора, содержащего указанные клоны, с получением осветленного собранного раствора; и очистки указанного осветленного собранного раствора с получением очищенного раствора белка, имеющего желаемую концентрацию СТР-модифицированного FVII; где указанный получаемый СТР-модифицированный FVII содержит аминокислотную

последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 7.

[061] В одном варианте осуществления раскрывается композиция, содержащая фактор свертывания крови VII (FVII) человека, модифицированный карбоксиконцевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина человека, содержащий три молекулы СТР, присоединенные последовательно одна за другой к его С-концу. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный FVII включает в себя активированный СТР-модифицированный FVII (СТР-модифицированный FVIIa).

Полипептид, являющийся фактором свертывания крови VII, модифицированным карбоксиконцевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина человека

[062] Фактор свертывания крови VII (FVII) представляет собой гликопротеин размером 444 аминокислоты (50 кДа), секретируемый гепатоцитами в кровоток в виде неактивного профермента (зимогена). При повреждении тканей и контакте с циркулирующей кровью FVII образует комплекс с тканевым фактором (TF), который является истинным рецепторным белком для FVII и экспрессируется различными клетками, локализованными в более глубоких слоях стенки сосудов. Образование этого комплекса FVII-TF приводит к активации FVII. Активированный FVII (FVIIa) запускает внешний путь коагуляции посредством активации фактора свертывания крови IX и фактора свертывания крови X.

FVII относится к группе витамин-К-зависимых гликопротеинов, связанных с системой коагуляции. FVII синтезируется в виде предшественника с N-концевым пропептидом, за которым расположена зрелая аминокислотная последовательность. Пропептид содержит участок докинга для гамма-карбоксилазы, которая превращает остатки глутаминовой кислоты (Glu) в гамма-карбоксилированные остатки глутаминовой кислоты (Gla). Карбоксиглутаминовая кислота (Gla) представляет собой нестандартную аминокислоту, вводимую в белки посредством посттрансляционного карбоксилирования остатков глутаминовой кислоты. Данная модификация привносит сродство к ионам кальция, при этом для введения гамма-карбоксилирования факторов свертывания крови, в том числе фактора свертывания крови FVII, необходим витамин К. Домен Gla отвечает за

связывание ионов кальция с высоким сродством, которое играет важную роль в коагуляции. За данным доменом расположены два домена, подобных эпидермальному фактору роста (EGF), соединительная область (CR) и С-концевой домен сериновой протеазы. Перед секрецией пропептид FVII отщепляется, при этом сигнальный пептид удаляется, с образованием одноцепочечного гликопротеина FVII в виде зимогена размером 406 аминокислот. После секреции белок может быть активирован с образованием двухцепочечного гетеродимера FVIIa, стабилизированного дисульфидными связями, путем расщепления в CR. Концентрация FVII в плазме крови составляет 10 нМ, и у здоровых индивидуумов примерно 1% циркулирует в активной форме.

[063] В одном варианте осуществления в данном документе предусмотрен способ удлинения биологического периода полувыведения или способ улучшения площади под кривой (AUC) FVII или FVIIa, включающий стадию присоединения трех СТР к карбоксильному концу FVII или FVIIa, за счет чего удлиняется биологический период полувыведения или улучшается AUC FVII или FVIIa.

[064] В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается способ снижения частоты введения доз полипептида, являющегося фактором свертывания крови VIIa (FVIIa), включающий стадию присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, за счет чего снижается частота введения доз указанного полипептида FVIIa.

[065] В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается способ снижения скорости очищения от полипептида, являющегося фактором свертывания крови VIIa (FVIIa), включающий стадию присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, за счет чего снижается скорость очищения от указанного полипептида FVIIa.

[066] В одном варианте осуществления в данном документе раскрывается способ получения полипептида, являющегося активированным СТР-модифицированным фактором свертывания крови

VII (FVIIa), включающий стадию присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa с получением таким образом полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVIIa.

[067] В другом варианте осуществления фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению представляет собой белок. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению представляет собой пептид. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению представляет собой полипептид. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови представляет собой фермент. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови представляет собой сериновую протеазу. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови представляет собой гликопротеин. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови представляет собой витамин-К-зависимый гликопротеин. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови представляет собой витамин-К-независимый гликопротеин. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови представляет собой трансклутаминазу. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови представляет собой неактивный зимоген. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови представляет собой любой фактор свертывания крови, известный специалисту в данной области. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови представляет собой фактор свертывания крови VIIa (FVIIa).

[068] В другом варианте осуществления фактор свертывания крови представляет собой рекомбинантный белок. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови представляет собой рекомбинантный гликопротеин. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови представляет собой рекомбинантный FVII. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови представляет собой рекомбинантный FVIIa. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови содержит сигнальный пептид. В другом варианте осуществления рекомбинантный фактор

свертывания крови не содержит сигнальный пептид. В другом варианте осуществления активированный фактор свертывания крови не содержит сигнальный пептид.

[069] В другом варианте осуществления фактор свертывания крови содержит 3 повтора СТР, присоединенных к С-концу, и не содержит СТР, присоединенных к N-концу.

[070] В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VIIa (FVIIa), состоящий из полипептида FVIIa и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного FVIIa.

[071] В другом варианте осуществления фактор свертывания крови представляет собой фактор свертывания крови, имеющий доменную организацию, сходную с доменной организацией FVII или идентичную ей. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови синтезируется в виде предшественника с N-концевым пропептидом (сигнальной последовательностью). В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, находится в форме неактивного профермента. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, представляет собой неактивный зимоген, который был секретирован клеткой и не имеет N-концевой сигнальной последовательности. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, представляет собой активированный фактор свертывания крови. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный FVII, описываемый в данном документе, находится в форме неактивного профермента до момента его активации. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный FVII, описываемый в данном документе, представляет собой неактивный зимоген, который был секретирован клеткой и не имеет N-концевой сигнальной последовательности. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный FVII, описываемый в данном документе, представляет собой активированный фактор свертывания крови. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови

вырабатывается гепатоцитами. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови содержит участок докинга для гамма-карбоксилазы, которая превращает остатки глутаминовой кислоты (Glu) в гамма-карбоксилированные остатки глутаминовой кислоты (Gla). В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, используемый в данном документе, представляет собой коммерчески доступный фактор свертывания крови.

[072] В одном варианте осуществления в данном документе раскрывается полипептид, являющийся активным фактором свертывания крови VII (FVIIa) человека, модифицированным карбоксиконцевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина человека, содержащий три молекулы СТР, присоединенные последовательно одна за другой к С-концу FVIIa, где указанный полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVIIa, находится в по существу чистой и активной форме, при этом указанный полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVIIa, предусматривает: (a) высокое содержание сиаловой кислоты; (b) низкое содержание окисленной формы; (c) высокогликозилированную форму; (d) высокое процентное содержание карбоксилированных остатков глутаминовой кислоты; (e) высокое процентное содержание заряженных N-гликанов и (f) высокую удельную активность или любую их комбинацию, где указанный СТР-модифицированный FVIIa содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 7.

[073] В одном варианте осуществления в данном документе раскрывается полипептид, являющийся активным фактором свертывания крови VII (FVIIa) человека, модифицированным карбоксиконцевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина человека, содержащий три молекулы СТР, присоединенные последовательно одна за другой к С-концу FVIIa, где указанный полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVIIa, находится в по существу чистой и активной форме, при этом указанный полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVIIa, предусматривает: (a) высокое содержание сиаловой кислоты; (b) низкое содержание окисленной формы; (c) высокогликозилированную форму; (d) высокое процентное содержание карбоксилированных

остатков глутаминовой кислоты; (e) высокое процентное содержание заряженных N-гликанов и (f) удельную активность, составляющую по меньшей мере 10 ед./мг; или любую их комбинацию, где указанный СТР-модифицированный FVIIa содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 7.

[074] В связанном варианте осуществления высокое содержание сиаловой кислоты составляет по меньшей мере 15 моль/моль. В другом связанном аспекте высокогликозилированная форма предусматривает содержание O-гликанов, составляющее по меньшей мере 10 моль/моль. В другом связанном аспекте по существу чистая и активная форма содержит по меньшей мере 60% высокогликозилированной формы указанного активного СТР-модифицированного FVIIa. В другом связанном аспекте по меньшей мере 60% по существу чистой и СТР-модифицированной формы FVIIa предусматривает высокое процентное содержание карбоксилированных остатков глутаминовой кислоты (Gla). В другом связанном аспекте высокое процентное содержание карбоксилированных остатков глутаминовой кислоты (Gla) составляет по меньшей мере 90% остатков Gla. В другом связанном аспекте низкое процентное содержание окисленной формы составляет менее 5%. В другом связанном аспекте степень чистоты указанного по существу чистого и активного полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVII, составляет по меньшей мере 90%. В дополнительном связанном аспекте процентное значение степени чистоты выбрано из группы, состоящей из 97,3%, 97,6%, 97,4% и 97,0%. В другом связанном аспекте удельная активность указанного по существу чистого и активного полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVII, составляет по меньшей мере 10500 ед./мг. В дополнительном связанном аспекте удельная активность выбрана из группы, состоящей из 15563 ед./мг, 16720 ед./мг, 22478 ед./мг и 23608 ед./мг.

[075] В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается композиция, содержащая СТР-модифицированный FVIIa, который предусматривает: (a) высокое содержание сиаловой кислоты; (b) низкое содержание окисленной формы; (c) высокогликозилированную форму; (d) высокое процентное содержание

карбоксилированных остатков глутаминовой кислоты; (e) высокое процентное содержание заряженных N-гликанов и (f) высокую удельную активность или любую их комбинацию, где указанный СТР-модифицированный FVIIa содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 7, и фармацевтически приемлемый носитель.

[076] В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается композиция, содержащая СТР-модифицированный FVIIa, который предусматривает: (a) высокое содержание сиаловой кислоты; (b) низкое содержание окисленной формы; (c) высокогликозилированную форму; (d) высокое процентное содержание карбоксилированных остатков глутаминовой кислоты; (e) высокое процентное содержание заряженных N-гликанов и (f) удельную активность, составляющую по меньшей мере 10500 ед./мг; или любую их комбинацию, где указанный СТР-модифицированный FVIIa содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 7, и фармацевтически приемлемый носитель.

[077] В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается композиция, содержащая СТР-модифицированный FVIIa, где указанный полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVIIa, находится в по существу чистой и активной форме, при этом указанный полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVIIa, предусматривает:

- a. высокое содержание сиаловой кислоты;
 - b. высокогликозилированную форму; где указанный СТР-модифицированный FVIIa дополнительно предусматривает по меньшей мере одно из следующего:
 - c. низкого содержания окисленной формы;
 - d. высокого процентного содержания карбоксилированных остатков глутаминовой кислоты;
 - e. по меньшей мере 60% заряженных N-гликанов или
 - f. удельной активности, составляющей по меньшей мере 10500 ед./мг;
- или любую их комбинацию; и
- где указанный СТР-модифицированный FVIIa содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 7.

[078] В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается композиция, содержащая СТР-модифицированный FVIIa, где указанный полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVIIa, находится в по существу чистой и активной форме, при этом указанный полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVIIa, предусматривает:

- а. высокое содержание сиаловой кислоты;
- б. высокогликозилированную форму; где указанный СТР-модифицированный FVIIa дополнительно предусматривает по меньшей мере одно из следующего:
- с. низкого содержания окисленной формы;
- д. высокого процентного содержания карбоксилированных остатков глутаминовой кислоты;
- е. по меньшей мере 60% заряженных N-гликанов или
- ф. удельной активности, составляющей по меньшей мере 10500 ед./мг;

или любую их комбинацию; и

где указанный СТР-модифицированный FVIIa содержит аминокислотную последовательность, приведенную под SEQ ID NO: 7, где аминокислотная последовательность указанного СТР-модифицированного FVIIa представлена в структурном отношении в виде двухцепочечного гетеродимера, стабилизированного дисульфидными связями, содержащего дисульфидный (S-S) мостик между цистеиновым остатком 135 и цистеиновым остатком 262 в SEQ ID NO: 7, и где указанные две цепи включают в себя легкую цепь, содержащую аминокислоты 1-152, и тяжелую цепь, содержащую аминокислоты 153-490 из SEQ ID NO: 7.

[079] В одном варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая фактор свертывания крови VII, включает в себя следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

```
ctcgaggacatggtctcccaggccctcaggctcctctgccttctgcttgggcttcagggctgcc
tggctgcagtccttcgtaacccaggaggaagccacggcgctcctgcaccggcgccggcgcgccaa
cgcgttcctggaggagctgcggccgggctccctggagagggagtgcaaggaggagcagtgctcc
ttcaggaggagccgggagatcttcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggatttcttaca
gtgatggggaccagtggtgcctcaagtcctatgccagaatgggggctcctgcaaggaccagctcca
```

gtcctatatctgcttctgcctccctgccttcgagggccggaactgtgagacgcacaaggatgac
 cagctgatctgtgtgaacgagaacggcggtgtgagcagtactgcagtgaccacacgggcacca
 agcgctcctgtcgggtgccacgaggggtactctctgctggcagacgggggtgcctgcacacccac
 agttgaatatccatgtggaaaaatacctattctagaaaaaagaaatgccagcaaaccaccaaggc
 cgaattgtggggggcaaggtgtgccccaaaggggagtgtccatggcaggtcctgttggttgga
 atggagctcagttgtgtggggggaccctgatcaacaccatctgggtgggtctccgcggccactg
 tttcgacaaaatcaagaactggaggaacctgatcgcggtgctgggagagcacgacctcagcgag
 cacgacggggatgagcagagccggcggtggcgaggtcatcatccccagcacgtacgtcccg
 gcaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgcctgcaccagcccgtggtcctcactgacctgt
 ggtgcccctctgcctgcccgaacggacgttctctgagaggacgctggccttcgtgcgcttctca
 ttggtcagcggtgtggggccagctgctggaccgtggcgccacggccctggagctcatggtcctca
 acgtgccccggctgatgaccaggactgcctgcagcagtcacggaaggtgggagactccccaaa
 tatcacggagtacatgttctgtgcccggctactcggatggcagcaaggactcctgcaagggggac
 agtggagggccacatgccaccactaccggggcacgtggtacctgacgggcatcgtcagctggg
 gccagggctgcgcaaccgtggggccactttgggggtgtacaccaggggtctcccagtacatcgagt
 gctgcaaaagctcatgcgctcagagccacgcccaggagtcctcctgagagccccatttccctga
 ggatgcggccgc (SEQ ID NO: 1).

[080] В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность фактора свертывания крови VII включает в себя следующую аминокислотную последовательность :
 MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEE
 AREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLI
 CVNENGGCEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLADGVSCPTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIV
 GGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDG
 DEQSRRVAQVIIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVS
 GWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVG DSPNITEYMF CAGYS DGSKD SCKGDSGG
 PHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP
 (SEQ ID NO: 2).

[081] В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность фактора свертывания крови VII включает в себя следующую аминокислотную последовательность :
 MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEE
 AREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLI
 CVNENGGCEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLADGVSCPTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIV
 GGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDG
 DEQSRRVAQVIIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVS

GWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFAGYSKGSKDCKGDSGG
PHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFFPGCGR
(SEQ ID NO: 3).

[082] В другом варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид фактор свертывания крови VII-СТР-СТР-СТР (с присоединением к карбоксильному концу) включает в себя следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

ctcagaggacatggtctcccaggccctcaggctcctctgccttctgcttgggcttcagggctgcc
tggctgcagtcttcgtaacccaggaggaagcccacggcgctcctgcaccggcgccggcgcgccaa
cgcgttcctggaggagctgcggccgggctccctggagagggagtgcaaggaggagcagtgctcc
ttcagaggaggcccgaggagatcttcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggatttcttaca
gtgatggggaccagtgctgcctcaagtcctatgccagaatgggggctcctgcaaggaccagctcca
gtcctatatctgcttctgcctccctgccttcgagggccggaactgtgagacgcacaaggatgac
cagctgatctgtgtgaacgagaacggcggtgtgagcagtgactgcagtgaccacacgggcacca
agcgctcctgtcgggtgccacgaggggtactctctgctggcagacgggggtgtcctgcacaccac
agttgaatatccatgtggaaaaatacctattctagaaaaaagaaatgccagcaaaccccaagggc
cgaattgtggggggcaaggtgtgccccaaaggggagtgccatggcaggctcctgttggttgga
atggagctcagttgtgtggggggaccctgatcaacaccatctgggtgggtctccgcggccctctg
tttcgacaaaatcaagaactggaggaacctgatcgcggtgctggggcgagcacgacctcagcgag
cacgacggggatgagcagagccggcggtggcgaggtcatcatccccagcacgtacgtcccgg
gcaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgcctgcaccagcccgtggctcctcactgaccatgt
ggtgcccctctgcctgcccgaacggacgttctctgagaggacgctggccttcgtgcgcttctca
ttgggtcagcggtgtggggccagctgctggaccgtggcgccacggccctggagctcatgggtcctca
acgtgccccggctgatgaccaggactgcctgcagcagtcacggaaggtgggagactccccaaa
tatcacggagtacatgttctgtgcccggctactcggtatggcagcaaggactcctgcaagggggac
agtggaggcccatatgccaccactaccgggggcagtggtacctgaccggcatcgtgagctggg
gccagggctgcgccaccgtggggccacttcggcgtgtacaccaggggtgtccagttacatcgagt
gctgcagaaactgatgagaagcgagcccagacccggcggtgctgctgagagcccccttccccagc
agcagctccaagggccccctccccctagcctgccagccctagcagactgcctggggccagtgaca
ccccctatcctgcctcagctccagctccagcaaggccccccccctagcctgccttctccttctcg
gctgcctggccccagcgatactccaattctgccccagtcctccagcagtaaggctccccctcca
tctctgccatccccagcagactgccaggcccttctgatacaccatcctccacagtgatgag
gatccgcggccgcttaattaa (SEQ ID NO: 4).

[083] В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность полипептида фактор свертывания крови VII-СТР-

СТР-СТР (с присоединением к карбоксильному концу) включает в себя следующую аминокислотную последовательность:

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEE
AREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLI
CVNENGGCEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSL LADGV SCTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIV
GGKVC PKGEC PWQV LLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDG
DEQSR RVAQVII PSTYVP GTTNHDIALRLHQPVVLT DHVVP LCLPERTF SERTLAFVRFSLVS
GWGQL LDRGATALELMVLNVPRLMTQDC LQQSRKVG DSPNITEYMFCAGYSDGSKDSC KGDSGG
PHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSS
KAPPPSLPSPSR LPGPSDTPILPQSSSSSKAPPPSLPSPSR LPGPSDTPILPQSSSSSKAPPPSLP

SPSR LPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 5). В другом варианте осуществления аминокислоты 1-38 SEQ ID NO: 5 образуют сигнальную последовательность. В другом варианте осуществления сигнальная последовательность имеет аминокислотную последовательность MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRR (SEQ ID NO: 6).

[084] В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность полипептида фактор свертывания крови VII-СТР-СТР-СТР (с присоединением к карбоксильному концу), не имеющего сигнального пептида, включает в себя следующую аминокислотную последовательность: ANAFLEELRP GSLERECKEE QCSFEEAREI FKDAERTKLF
WISYSDGDQC ASSPCQNGGS CKDQLQSYIC FCLPAFEGRN CETHKDDQLI
CVNENGGCEQ YCS DHTGTR SCRCHEGYSL LADGV SCTPT VEYPCGKIPI
LEKRNASKPQ GRIVGGKVCP KGEC PWQVLL LVNGAQLCGG TLINTIWVVS
AAHCFDKIKN WRNLI AVLGE HDLSEHDGDE QSRRVAQVII PSTYVP GTTN
HDIALRLHQ PVVLT DHVVP LCLPERTFSE RTLAFVRFSL VSGWGQL LDR
GATALELMVL NVPRLMTQDC LQQSRKVGDS PNITEYMFCA GYSDGSKDSC
KGDSGGPHAT HYRG TWYLTG IVSWGQGCAT VGHFGVYTRV SQYIEWLQKL
MRSEPRPGVL LRAFPSSSS KAPPPSLPSP SRLPGPSDTP ILPQSSSSKA
PPPSLPSPSR LPGPSDTPIL PQSSSSKAPP PSLPSPSR LPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 7).

[085] В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность полипептида активированный фактор свертывания крови VII-СТР-СТР-СТР (с присоединением к карбоксильному концу) (FVIIa-СТР₃) не имеет сигнального пептида и включает в себя аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 7. В другом варианте осуществления FVIIa-СТР₃ не имеет

сигнального пептида и содержит гомолог SEQ ID NO: 7. В другом варианте осуществления FVIIa-CTP₃ не имеет сигнального пептида и содержит вариант SEQ ID NO: 7. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность FVIIa-CTP₃ расщепляется между аргининовым остатком (R) в положении 152 и изолейциновым остатком (I) в положении 153. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность FVIIa-CTP₃ представлена в структурном отношении в виде двухцепочечного гетеродимера, стабилизированного дисульфидными связями, содержащего дисульфидный мостик S-S между цистеиновыми остатками, присутствующими в каждой из цепей. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность FVIIa-CTP₃ представлена в структурном отношении в виде гетеродимера, содержащего легкую цепь и тяжелую цепь, соединенные дисульфидной связью -S-S- между цистеиновым остатком, присутствующим в легкой цепи, и цистеиновым остатком, присутствующим в тяжелой цепи. В другом варианте осуществления легкая цепь содержит N-концевой фрагмент аминокислотной последовательности FVIIa-CTP₃, а тяжелая цепь содержит C-концевой фрагмент аминокислотной последовательности FVIIa-CTP₃. В другом варианте осуществления цистеиновые остатки могут являться любыми цистеиновыми остатками в любой цепи. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность FVIIa-CTP₃ представлена в структурном отношении в виде двухцепочечного гетеродимера, стабилизированного дисульфидными связями, содержащего мостик S-S между цистеиновым остатком 135 и цистеиновым остатком 262 в SEQ ID NO: 7, где указанные две цепи включают в себя легкую цепь, содержащую аминокислоты 1-152, и тяжелую цепь, содержащую аминокислоты 153-490 из SEQ ID NO: 7.

[086] В другом варианте осуществления легкая цепь мигрирует на уровне приблизительно 25 кДа в SDS-PAGE в денатурирующих условиях. В другом варианте осуществления тяжелая цепь мигрирует на уровне приблизительно 50 кДа в SDS-PAGE в денатурирующих условиях. В другом варианте осуществления тяжелая цепь мигрирует на уровне приблизительно 60 кДа в SDS-PAGE в денатурирующих условиях.

[087] В другом варианте осуществления легкая цепь активированного FVII, модифицированного путем присоединения 3 CTP к его С-концу (FVIIa-CTP-CTP-CTP), содержит SEQ ID NO: 8 -

[088]

ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQ
LQSYICFCLPAFEGRNCEETHKDDQLICVNENGGCEQYCS DHTGTKRSCRCHEGYSLLADGV SCT
PTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGR (SEQ ID NO: 8).

[089] В другом варианте осуществления тяжелая цепь активированного FVII, модифицированного путем присоединения 3 CTP к его С-концу (FVIIa-CTP-CTP-CTP), содержит SEQ ID NO: 9 -

[090]

IVGGKVC PKGEC PWQV LLLVNGAQLCGGTLINTI WVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEN
DGDEQSR RVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHVPLCLPERTFSERTLAFVRFSL
VSGWGQLLD RGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDS PNITEYMFCAGYS DGSKD SCKGDS
GGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSS
SSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPS
LPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 9).

[091] В другом варианте осуществления в клетку, экспрессирующую полипептид фактор свертывания крови-CTP согласно настоящему изобретению, добавляют фурин. В другом варианте осуществления фурин увеличивает эффективность выработки полипептида фактор свертывания крови-CTP согласно настоящему изобретению в клетке. В другом варианте осуществления фурин вводят путем котрансфекции с вектором, содержащим последовательность, кодирующую полипептид фактор свертывания крови-CTP согласно настоящему изобретению. В другом варианте осуществления фурин кодируется отдельным вектором. В другом варианте осуществления фурин и полипептид фактор свертывания крови-CTP кодируются одним вектором. В другом варианте осуществления последовательность, кодирующая фурин, вставлена в pCI-DHFR. В другом варианте осуществления последовательность, кодирующая фурин, встроена в pCI-dhfr/SmaI+NotI, Furin/AsiI F.I.+NotI.

[092] В другом варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая фурин, включает в себя следующую последовательность нуклеиновой кислоты:

tctagagtcgacccccgcatggagctgagggcctgggttgctatgggtggtagcagcaacaggaa
ccttgggtcctgctagcagctgatgctcagggccagaaggtcttcaccaacacgtgggctgtgcg
catccctggaggcccagcgggtggccaacagtgtggcacggaagcatgggttcctcaacctgggc
cagatcttcggggactattaccacttctggcatcgaggagtacgaagcgggtccctgtcgctc
accgcccgcggcacagccggctgcagagggagcctcaagtacagtggctggaacagcaggtggc
aaagcgacggactaaacgggacgtgtaccaggagcccacagaccccaagtttcctcagcagtgg
tacctgtctgggtgtcactcagcgggacctgaatgtgaaggcggcctgggcgagggctacacag
ggcacggcattgtgggtctccattctggacgatggcatcgagaagaaccacccggacttggcagg
caattatgatcctggggccagttttgatgtcaatgaccaggaccctgacccccagcctcggtac
acacagatgaatgacaacaggcacggcacacgggtgtgcgggggaagtggctgcggtggccaaca
acgggtgtctgtgggtgtaggtgtggcctacaacgcccgcattggaggggtgcgcatgctggatgg
cgaggtgacagatgcagtggaggcacgctcgctgggcctgaaccccaaccacatccacatctac
agtgccagctggggccccgaggatgacggcaagacagtggatggggccagcccgcctcgccgagg
aggccttcttcctggtgggggttagccagggccgaggggggctgggctccatctttgtctgggcctc
ggggaacgggggcccgggaacatgacagctgcaactgcgacggctacaccaacagtatctacacg
ctgtccatcagcagcgccacgcagtttggaacgtgccgtggtacagcgaggcctgctcggtcca
cactggccacgacctacagcagtggcaaccagaatgagaagcagatcgtgacgactgacttgcg
gcagaagtgcacggagtctcacacgggcacctcagcctctgcccccttagcagccggcatcatt
gctctcaccctggaggccaataagaacctcacatggcgggacatgcaacacctgggtggtacaga
cctcgaagccagcccacctcaatgccaacgactggggccaccaatggtgtggggccggaaagtgag
ccactcatatgggtacgggcttttgagcgcaggcgccatggtggccctggcccagaattggacc
acagtggccccccagcgggaagtgcacatcgacatcctcaccgagcccaaagacatcgggaaac
ggctcgaggtgcggaagaccgtgaccgcgtgctgggagcccaaccacatcactcgggtgga
gcacgctcaggcgcggtcaccctgtcctataatcgccgtggcgacctggccatccacctggtc
agccccatgggcacccgctccacctgctggcagccaggccacatgactactccgcagatgggt
ttaatgactgggccttcatgacaactcattcctgggatgaggatccctctggcgagtgggtcct
agagattgaaaacaccagcgaagccaactatgggacgctgaccaagttcaccctcgctactc
tatggcaccgccccctgaggggctgcccgtacctccagaaagcagtggctgcaagacctcacgt
ccagtcaggcctgtgtggtgtgaggaaggcttctccctgcaccagaagagctgtgtccagca
ctgccctccaggcttcgcccccaagtctcgatacgactatagcaccgagaatgacgtggag
accatccgggcccagcgtctgcgccccctgccacgcctcatgtgccacatgccaggggcccggccc
tgacagactgcctcagctgccccagccacgcctccttgaccctgtggagcagacttgctcccg
gcaaagccagagcagccgagagtccccgccacagcagcagccacctcggtgcccccgagggtg
gaggcggggcaacggctgcgggcagggtgctgccctcacacctgctgaggtggtggccggcc
tcagctgcgcttcatcgtgctggtcttcgtcactgtcttcctggtcctgcagctgcgctctgg
ctttagttttcgggggggtgaaggtgtacaccatggaccgtggcctcatctcctacaaggggctg

ccccctgaagcctggcaggaggagtgcccgctctgactcagaagaggacgagggccggggscgaga
ggaccgcctttatcaaagaccagagcgccctctgaacgcggccgc (SEQ ID NO: 10).

[093] В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность фурина включает в себя следующую аминокислотную последовательность:

MELRPWLLWVVAATGTLVLLAADAQGQKVFTNTWAVRIPGGPAVANSVARKHGFLNLGQIFGDY
YHFWHRGVTKRSLSPHRPRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRRTKRDVYQEPTDPKFPQQWYLSGVT
QRDLNVKAAWAQGYTGHGIVVSILDDGIEKNHPDLAGNYDPGASFVDNDQDPDPQPRYTQMNDN
RHGTRCAGEVAAVANNGVCGVGVAYNARIGGVRMLDGEVTDAVEARSLGLNPNHIHIYSASWGP
EDDGKTVDPARLAEAAFFRGVSQGRGGLGSIFVWASGNGGREHDSNCNDGYTNSIYTLSSISSA
TQFGNVPWYSEACSSTLATTYSSGNQNEKQIVTTDLRQKCTESHTGTSASAPLAAGIIALTLEA
NKNLTWRDMQHLLVVQTSKPAHLNANDWATNGVGRKVSHSYGYGLLDAGAMVALAQNWTTVAPQR
KCIIDILTEPKDIGKRLEVRKTVTACLGEPNHITRLEHAQARLTLSYNRRGDLAIHLVSPMGTR
STLLAARPHDYSADGFNDWAFMTTHSWDEDPSGEWVLEIENTSEANNYGTLTkFTLVLYGTape
GLPVPPESSGCKTLTSSQACVVCEEGFSLHQKSCVQHCPPGFAPQVLDTHYSTENDVETIRASV
CAPCHASCATCQGPALTDCLSCPSHASLDPVEQTCSRQSQSSRESPPQQQPPRLPPEVEAGQRL
RAGLLPSHLPEVVAGLSCAFIVLVFVTVFLVLQLRSGFSFRGVKVYTMDRGLISYKGLPPEAWQ
EECPDSEEDDEGRGERTAFIKDQSAL (SEQ ID NO: 11).

[094] В одном варианте осуществления термин «фактор свертывания крови» дополнительно включает гомолог известного фактора свертывания крови. В одном варианте осуществления гомолог обладает коагуляционной активностью. В некоторых вариантах осуществления гомология в соответствии с настоящим изобретением также охватывает соответствующие варианты с делециями, вставками или заменами, в том числе с аминокислотными заменами, и соответствующие биологически активные фрагменты полипептидов. В одном варианте осуществления вариант содержит консервативные замены или делеции, вставки или замены, которые значительно не изменяют трехмерную структуру фактора свертывания крови. В другом варианте осуществления делеция, вставка или замена не изменяют функцию фактора свертывания крови, представляющую интерес, которая в одном варианте осуществления представляет собой связывание с конкретным партнером по связыванию.

[095] В другом варианте осуществления настоящее изобретение охватывает гомолог фактора свертывания крови. В другом варианте

осуществления настоящее изобретение охватывает гомолог фактора свертывания крови, обладающий коагуляционной активностью. В другом варианте осуществления настоящее изобретение охватывает гомолог фактора свертывания крови, характеризующийся функциональным связыванием. В другом варианте осуществления настоящее изобретение охватывает гомологи фактора свертывания крови, описываемого в данном документе, обладающие коагуляционной активностью. В другом варианте осуществления настоящее изобретение охватывает гомологи фактора свертывания крови, описываемого в данном документе, характеризующиеся функциональным связыванием. В другом варианте осуществления гомологи, например, полипептиды, являются на по меньшей мере 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% гомологичными фактору свертывания крови, что определено с помощью программного обеспечения BlastP Национального центра биотехнологической информации (NCBI) с использованием параметров по умолчанию.

[096] В другом варианте осуществления [(СТР) $n > 1$ -фактор свертывания крови], описываемый в данном документе, содержит полноразмерный фактор свертывания крови или его активный фрагмент, соединенный на своем карбоксильном конце пептидной связью с по меньшей мере одним звеном СТР и не содержащий СТР на своем аминоконце. В другом варианте осуществления [(СТР) $n > 1$ -фактор свертывания крови], описываемый в данном документе, содержит фактор свертывания крови или его активный фрагмент, соединенный пептидной связью с по меньшей мере одним звеном СТР, которое соединено пептидной связью с дополнительным звеном СТР, и не содержащий СТР на своем аминоконце. В другом варианте осуществления одна молекула нуклеиновой кислоты кодирует сконструированный фактор свертывания крови, содержащий по меньшей мере один СТР, присоединенный к его С-концу, и не содержащий СТР на своем аминоконце.

[097] В другом варианте осуществления СТР присоединен к фактору свертывания крови с помощью линкера. В другом варианте осуществления линкер, соединяющий последовательность СТР с фактором свертывания крови, представляет собой ковалентную связь. В другом варианте осуществления линкер, соединяющий последовательность СТР с фактором свертывания крови, представляет собой пептидную связь. В другом варианте осуществления линкер, соединяющий последовательность СТР с фактором свертывания крови, представляет собой замещенную пептидную связь. В другом варианте осуществления последовательность СТР содержит DPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL (SEQ ID NO: 12). В другом варианте осуществления последовательность СТР содержит SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 13). В другом варианте осуществления последовательность СТР включает в себя аминокислотную последовательность, выбранную из последовательностей, приведенных под SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13.

[098] В другом варианте осуществления карбоксиконцевой пептид (СТР), раскрываемый в данном документе, содержит аминокислотную последовательность из аминокислот в положениях 112–145 хорионического гонадотропина человека, приведенную под SEQ ID NO: 12. В другом варианте последовательность СТР, раскрываемая в данном документе, включает в себя аминокислотную последовательность из аминокислот в положениях 118–145 хорионического гонадотропина человека, приведенную под SEQ ID NO: 13. В другом варианте осуществления последовательность СТР также начинается с любого положения между положениями 112 и 118 и заканчивается в положении 145 хорионического гонадотропина человека. В некоторых вариантах осуществления последовательность СТР-пептида имеет длину 28, 29, 30, 31, 32, 33 или 34 аминокислоты и начинается в положении 112, 113, 114, 115, 116, 117 или 118 аминокислотной последовательности СТР.

[099] В другом варианте осуществления СТР-пептид представляет собой вариант СТР хорионического гонадотропина, который отличается от нативного СТР 1–5 консервативными аминокислотными заменами, как описано в патенте США № 5712122,

который включен в данный документ посредством ссылки. В другом варианте осуществления СТР-пептид представляет собой вариант СТР хорионического гонадотропина, который отличается от нативного СТР 1 консервативной аминокислотной заменой. В другом варианте осуществления СТР-пептид представляет собой вариант СТР хорионического гонадотропина, который отличается от нативного СТР 2 консервативными аминокислотными заменами. В другом варианте осуществления СТР-пептид представляет собой вариант СТР хорионического гонадотропина, который отличается от нативного СТР 3 консервативными аминокислотными заменами. В другом варианте осуществления СТР-пептид представляет собой вариант СТР хорионического гонадотропина, который отличается от нативного СТР 4 консервативными аминокислотными заменами. В другом варианте осуществления СТР-пептид представляет собой вариант СТР хорионического гонадотропина, который отличается от нативного СТР 5 консервативными аминокислотными заменами.

[0100] В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность СТР-пептида, раскрываемая в данном документе, является на по меньшей мере 70% гомологичной аминокислотной последовательности нативного СТР или соответствующему пептиду. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность СТР-пептида, раскрываемая в данном документе, является на по меньшей мере 80% гомологичной аминокислотной последовательности нативного СТР или соответствующему пептиду. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность СТР-пептида, раскрываемая в данном документе, является на по меньшей мере 90% гомологичной аминокислотной последовательности нативного СТР или соответствующему пептиду. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность СТР-пептида, раскрываемая в данном документе, является на по меньшей мере 95% гомологичной аминокислотной последовательности нативного СТР или соответствующему пептиду. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность СТР-пептида, раскрываемая в данном документе, является на по меньшей мере 98% гомологичной аминокислотной последовательности нативного СТР или соответствующему пептиду.

[0101] В другом варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий СТР-пептид, раскрываемый в данном документе, является на по меньшей мере 70% гомологичным последовательности ДНК, кодирующей нативный СТР человека или соответствующий пептид. В другом варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий СТР-пептид, раскрываемый в данном документе, является на по меньшей мере 80% гомологичным последовательности ДНК, кодирующей нативный СТР человека или соответствующий пептид. В другом варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий СТР-пептид, раскрываемый в данном документе, является на по меньшей мере 90% гомологичным последовательности ДНК, кодирующей нативный СТР или соответствующий пептид. В другом варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий СТР-пептид, раскрываемый в данном документе, является на по меньшей мере 95% гомологичным последовательности ДНК, кодирующей нативный СТР или соответствующий пептид. В другом варианте осуществления полинуклеотид, кодирующий СТР-пептид, раскрываемый в данном документе, является на по меньшей мере 98% гомологичным последовательности ДНК, кодирующей нативный СТР или соответствующий пептид.

[0102] В одном варианте осуществления по меньшей мере одна из аминокислотных последовательностей СТР хорионического гонадотропина является усеченной. В другом варианте осуществления обе аминокислотные последовательности СТР хорионического гонадотропина являются усеченными. В другом варианте осуществления 2 из аминокислотных последовательностей СТР хорионического гонадотропина являются усеченными. В другом варианте осуществления 3 из аминокислотных последовательностей СТР хорионического гонадотропина являются усеченными. В другом варианте осуществления 4 из аминокислотных последовательностей СТР хорионического гонадотропина являются усеченными. В другом варианте осуществления 5 из аминокислотных последовательностей СТР хорионического гонадотропина являются усеченными. В другом варианте осуществления 2 или более из аминокислотных последовательностей СТР хорионического гонадотропина являются усеченными. В другом варианте осуществления все из

аминокислотных последовательностей СТР хорионического гонадотропина являются усеченными. В одном варианте осуществления усеченный СТР содержит первые 10 аминокислот SEQ ID NO: 14. В другом варианте осуществления SEQ ID NO: 14 содержит следующую аминокислотную (AA) последовательность: SSSSKAPPPSLP. В другом варианте осуществления первые 10 аминокислот SEQ ID NO: 14 приведены под SEQ ID NO: 15: SSSSKAPPPS.

[0103] В одном варианте осуществления усеченный СТР содержит первые 10 аминокислот SEQ ID NO: 13.

[0104] В одном варианте осуществления усеченный СТР содержит первые 11 аминокислот SEQ ID NO: 13. В одном варианте осуществления усеченный СТР содержит первые 12 аминокислот SEQ ID NO: 13. В одном варианте осуществления усеченный СТР содержит первые 8 аминокислот SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14. В одном варианте осуществления усеченный СТР содержит первые 13 аминокислот SEQ ID NO: 13. В одном варианте осуществления усеченный СТР содержит первые 14 аминокислот SEQ ID NO: 13. В одном варианте осуществления усеченный СТР содержит первые 6 аминокислот SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14. В одном варианте осуществления усеченный СТР содержит первые 5 аминокислот SEQ ID NO: 13 или SEQ ID NO: 14.

[0105] В одном варианте осуществления по меньшей мере одна из аминокислотных последовательностей СТР хорионического гонадотропина является гликозилированной. В другом варианте осуществления 2 из аминокислотных последовательностей СТР хорионического гонадотропина являются гликозилированными. В другом варианте осуществления 3 из аминокислотных последовательностей СТР хорионического гонадотропина являются гликозилированными. В другом варианте осуществления 4 из аминокислотных последовательностей СТР хорионического гонадотропина являются гликозилированными. В другом варианте осуществления 5 из аминокислотных последовательностей СТР хорионического гонадотропина являются гликозилированными. В другом варианте осуществления 2 или более из аминокислотных последовательностей СТР хорионического гонадотропина являются

гликозилированными. В другом варианте осуществления все из аминокислотных последовательностей СТР хорионического гонадотропина являются гликозилированными.

[0106] В одном варианте осуществления последовательность СТР, раскрываемая в данном документе, содержит по меньшей мере один сайт гликозилирования. В одном варианте осуществления последовательность СТР, раскрываемая в данном документе, содержит 2 сайта гликозилирования. В одном варианте осуществления последовательность СТР, раскрываемая в данном документе, содержит 3 сайта гликозилирования. В одном варианте осуществления последовательность СТР, раскрываемая в данном документе, содержит 4 сайта гликозилирования. В одном варианте осуществления одна или более из аминокислотных последовательностей СТР хорионического гонадотропина являются полностью гликозилированными. В другом варианте осуществления одна или более из аминокислотных последовательностей СТР хорионического гонадотропина являются частично гликозилированными. В одном варианте осуществления «частично гликозилированный» означает, что в одном из сайтов гликозилирования СТР имеет место гликозилирование. В другом варианте осуществления гликозилирование имеет место в двух из сайтов гликозилирования СТР. В другом варианте осуществления гликозилирование имеет место в трех из сайтов гликозилирования СТР.

[0107] В некоторых вариантах осуществления модификация последовательности СТР является преимущественной в том, что позволяет использовать более низкие дозы. В некоторых вариантах осуществления модификация последовательностей СТР является преимущественной в том, что позволяет использовать меньшее количество доз. В некоторых вариантах осуществления модификация последовательностей СТР является преимущественной в том, что позволяет достигать безопасного пролонгированного эффекта.

[0108] В некоторых вариантах осуществления «полипептид», «сконструированный фактор свертывания крови» или «белок», как используется в данном документе, охватывает нативные полипептиды (продукты распада, полипептиды, синтезируемые синтетическим

путем, либо рекомбинантные полипептиды) и пептидомиметики (обычно полипептиды, синтезируемые синтетическим путем), а также пептоиды и полупептоиды, которые являются аналогами полипептидов, имеющие в некоторых вариантах осуществления модификации, делающие полипептиды, содержащие фактор свертывания крови, еще более стабильными при нахождении в организме или в большей степени способными к проникновению в клетки.

[0109] В некоторых вариантах осуществления модификации включают без ограничения модификацию С-конца, модификацию полипептидной связи, в том числе без ограничения $\text{CH}_2\text{-NH}$, $\text{CH}_2\text{-S}$, $\text{CH}_2\text{-S=O}$, O=C-NH , $\text{CH}_2\text{-O}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2$, S=C-NH , CH=CH или CF=CH , модификации остова и модификацию остатков. Способы получения пептидомиметических соединений хорошо известны из уровня техники и определены, например, в Quantitative Drug Design, C.A. Ramsden Gd., Chapter 17.2, F. Choplin Pergamon Press (1992), включенном посредством ссылки так, как если бы он был в полном объеме изложен в данном документе. Дополнительные подробности в этом отношении представлены ниже в данном документе.

[0110] В некоторых вариантах осуществления полипептидные связи (-CO-NH-) в полипептиде являются замещенными. В некоторых вариантах осуществления полипептидные связи замещены N-метилированными связями ($\text{-N(CH}_3\text{)-CO-}$). В некоторых вариантах осуществления полипептидные связи замещены сложноэфирными связями ($\text{-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-}$). В некоторых вариантах осуществления полипептидные связи замещены кетометиленовыми связями ($\text{-CO-CH}_2\text{-}$). В некоторых вариантах осуществления полипептидные связи замещены α -азасвязями (-NH-N(R)-CO-), где R представляет собой любой алкил, например, метил, карбасвязями ($\text{-CH}_2\text{-NH-}$). В некоторых вариантах осуществления полипептидные связи замещены гидроксметиленовыми связями ($\text{-CH(OH)-CH}_2\text{-}$). В некоторых вариантах осуществления полипептидные связи замещены тиамидными связями (-CS-NH-). В некоторых вариантах осуществления полипептидные связи замещены олефиновыми двойными связями (-CH=CH-). В некоторых вариантах осуществления полипептидные связи замещены ретроамидными связями (-NH-CO-). В некоторых вариантах осуществления полипептидные связи замещены

производными полипептидов ($-N(R)-CH_2-CO-$), где R представляет собой «нормальную» боковую цепь, в естественных условиях присутствующую при атоме углерода. В некоторых вариантах осуществления эти модификации имеют место в любой из связей вдоль полипептидной цепи и в одном варианте осуществления одновременно в нескольких связях (2–3 связях).

[0111] В некоторых вариантах осуществления природные ароматические аминокислоты полипептида, такие как Trp, Tyr и Phe, заменены синтетическими неприродными кислотами, такими как фенилглицин, TIC, нафтил-L-аланин (Nol), производные Phe с метилированным кольцом, галогензамещенные производные Phe или O-метил-Tyr. В некоторых вариантах осуществления полипептиды, раскрываемые в данном документе, содержат одну или более модифицированных аминокислот или один или более неаминокислотных мономеров (например, жирные кислоты, сложные углеводы и т. д.).

[0112] В некоторых вариантах осуществления природная аминокислота глутаминовая кислота (Glu) подвергается посттрансляционному карбоксилированию, в результате которого в СТР-модифицированном FVII или СТР-модифицированном FVIIa, описываемом в данном документе, присутствует карбоксиглутаминовая кислота (Gla).

[0113] В одном варианте осуществления «аминокислоту» или «аминокислотную последовательность» понимают как включающую 20 встречающихся в природе аминокислот; те аминокислоты, которые зачастую образуются в результате посттрансляционных модификаций *in vivo*, в том числе, например, гидроксипролин, фосфосерин и фосфотреонин; а также другие необычные аминокислоты, в том числе без ограничения 2-аминоадипиновую кислоту, гидроксизин, изодесмозин, норвалин, норлейцин и орнитин. В одном варианте осуществления «аминокислота» включает как D-, так и L-аминокислоты.

[0114] В некоторых вариантах осуществления полипептиды, раскрываемые в данном документе, используются в терапевтических средствах, для которых необходимо, чтобы полипептиды, содержащие фактор свертывания крови, находились в растворимой форме. В некоторых вариантах осуществления полипептиды, раскрываемые в

данном документе, содержат одну или более неприродных или природных полярных аминокислот, в том числе без ограничения серин и треонин, которые способны увеличивать растворимость полипептидов благодаря своей гидроксилсодержащей боковой цепи.

[0115] В некоторых вариантах осуществления сконструированный фактор свертывания крови, раскрываемый в данном документе, используется в линейной форме, хотя специалисту в данной области будет понятно, что в тех случаях, когда циклизация значительно не препятствует проявлению характеристик сконструированных факторов свертывания крови, также можно использовать циклические формы сконструированных факторов свертывания крови.

[0116] В некоторых вариантах осуществления сконструированные факторы свертывания крови, раскрываемые в данном документе, синтезируют биохимическим путем, как, например, путем применения стандартных твердофазных методик. В некоторых вариантах осуществления эти биохимические способы включают эксклюзивный твердофазный синтез, частичный твердофазный синтез, конденсацию фрагментов или классический синтез в растворе.

[0117] В некоторых вариантах осуществления для получения сконструированных факторов свертывания крови, раскрываемых в данном документе, применяют методики рекомбинантных белков. В некоторых вариантах осуществления методики рекомбинантных белков применяют для получения относительно длинных полипептидов (например, длинее 18-25 аминокислот). В некоторых вариантах осуществления методики рекомбинантных белков применяют для получения больших количеств сконструированных факторов свертывания крови, раскрываемых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные методики описаны в Bitter et al., (1987) *Methods in Enzymol.* 153:516-544, Studier et al. (1990) *Methods in Enzymol.* 185:60-89, Brisson et al. (1984) *Nature* 310:511-514, Takamatsu et al. (1987) *EMBO J.* 6:307-311, Coruzzi et al. (1984) *EMBO J.* 3:1671-1680 и Brogli et al., (1984) *Science* 224:838-843, Gurley et al. (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6:559-565 и Weissbach & Weissbach, 1988, *Methods for Plant*

Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463, которые включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0118] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрена молекула полинуклеотида, содержащая кодирующую часть гена, кодирующего полипептид, содержащий фактор свертывания крови и карбоксиконцевые пептиды гонадотропина, присоединенные к карбоксильному концу фактора свертывания крови, как описывается в данном документе выше. В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрена молекула полинуклеотида, состоящая из кодирующей части гена, кодирующего полипептид, содержащий фактор свертывания крови и карбоксиконцевые пептиды гонадотропина, присоединенные к карбоксильному концу фактора свертывания крови, как описывается в данном документе выше. В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрена молекула полинуклеотида, состоящая по сути из кодирующей части гена, кодирующего полипептид, содержащий фактор свертывания крови и карбоксиконцевые пептиды гонадотропина, присоединенные к карбоксильному концу фактора свертывания крови, как описывается в данном документе выше.

[0119] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен полинуклеотид, кодирующий полипептид, содержащий фактор свертывания крови и три карбоксиконцевых пептида гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, как описывается в данном документе выше. В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен полинуклеотид, кодирующий полипептид, состоящий из фактора свертывания крови и трех карбоксиконцевых пептидов гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, как описывается в данном документе выше. В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен полинуклеотид, кодирующий полипептид, состоящий по сути из фактора свертывания крови и трех карбоксиконцевых пептидов гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, как описывается в данном документе

выше. В одном варианте осуществления полинуклеотид представляет собой полинуклеотидную последовательность. В одном варианте осуществления полинуклеотид представляет собой молекулу полинуклеотида.

[0120] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен вектор экспрессии, содержащий молекулу полинуклеотида, описываемую в данном документе. В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида, являющегося фактором свертывания крови VII, и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVII. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный FVII, экспрессируемый из вектора экспрессии, описываемого в данном документе, может активироваться в некоторый момент времени после экспрессии с образованием в результате СТР-модифицированного FVIIa.

[0121] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрена клетка, содержащая вектор экспрессии, описываемый в данном документе. В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается клетка, содержащая вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида, являющегося фактором свертывания крови VII (FVII), и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa. В другом варианте осуществления СТР-FVII, экспрессируемый из вектора экспрессии, описываемого в данном документе и содержащегося в клетке, может активироваться после секреции из клетки.

[0122] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая вектор экспрессии, описываемый в данном документе. В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается композиция, содержащая вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из

полипептида, являющегося фактором свертывания крови VII (FVII), и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa.

[0123] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрена композиция, содержащая клетку, описываемую в данном документе. В другом варианте осуществления клетка представляет собой эукариотическую клетку. В другом варианте осуществления клетка представляет собой прокариотическую клетку.

[0124] В одном варианте осуществления в данном документе раскрывается способ получения СТР-модифицированного FVII, включающий стадию присоединения трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина к карбоксильному концу указанного FVII с получением таким образом СТР-модифицированного FVII.

[0125] В другом варианте осуществления сконструированные факторы свертывания крови, раскрываемые в данном документе, синтезируют с использованием молекулы полинуклеотида, кодирующей полипептид, раскрываемый в данном документе. В некоторых вариантах осуществления молекулу полинуклеотида, кодирующую сконструированные факторы свертывания крови, лигируют в вектор экспрессии, содержащий цис-действующую регуляторную последовательность, осуществляющую контроль транскрипции (например, промоторную последовательность). В некоторых вариантах осуществления цис-действующая регуляторная последовательность подходит для управления конститутивной экспрессией сконструированного фактора свертывания крови, раскрываемого в данном документе. В некоторых вариантах осуществления цис-действующая регуляторная последовательность подходит для управления тканеспецифической экспрессией сконструированных факторов свертывания крови. В некоторых вариантах осуществления цис-действующая регуляторная последовательность подходит для управления индуцируемой экспрессией сконструированных факторов свертывания крови.

[0126] В некоторых вариантах осуществления

тканеспецифические промоторы, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают в себя последовательности, функционирующие в одной или более специфических популяциях клеток. Примеры включают без ограничения такие промоторы, как промотор гена альбумина, который является печеночноспецифическим [Pinkert et al., (1987) Genes Dev. 1:268-277], лимфоид-специфические промоторы [Calame et al., (1988) Adv. Immunol. 43:235-275]; в частности, промоторы генов Т-клеточных рецепторов [Winoto et al., (1989) EMBO J. 8:729-733] и иммуноглобулинов; [Banerji et al. (1983) Cell 33:729-740], нейрон-специфические промоторы, такие как промотор гена белка нейрофиламентов [Byrne et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477], промоторы, специфические для поджелудочной железы [Edlun et al. (1985) Science 230:912-916], или промоторы, специфические для молочной железы, такие как промотор гена белка молочной сыворотки (патент США № 4873316 и публикация заявки на европейский патент No. 264166). Индуцируемые промоторы, подходящие для использования в настоящем изобретении, включают в себя, например, тетрациклин-индуцируемый промотор (Srouf, M.A., et al., 2003. Thromb. Haemost. 90: 398-405).

[0127] В одном варианте осуществления фраза «молекула полинуклеотида» относится к одонитевой или двухнитевой последовательности нуклеиновой кислоты, выделенной и представленной в форме последовательности РНК, комплементарной полинуклеотидной последовательности (кДНК), геномной полинуклеотидной последовательности и/или составных полинуклеотидных последовательностей (например, комбинации вышеперечисленного).

[0128] В одном варианте осуществления «комплементарная полинуклеотидная последовательность» относится к последовательности, образующейся в результате обратной транскрипции матричной РНК с помощью обратной транскриптазы или любой другой РНК-зависимой ДНК-полимеразы. В одном варианте осуществления последовательность можно впоследствии амплифицировать *in vivo* или *in vitro* с помощью ДНК-полимеразы.

[0129] В одном варианте осуществления «геномная

полинуклеотидная последовательность» относится к последовательности, полученной (выделенной) из хромосомы, и она, таким образом, представляет собой непрерывную часть хромосомы.

[0130] В одном варианте осуществления «составная полинуклеотидная последовательность» относится к последовательности, которая является по меньшей мере частично комплементарной и по меньшей мере частично геномной. В одном варианте осуществления составная последовательность может содержать некоторые экзонные последовательности, необходимые для кодирования полипептида, раскрываемого в данном документе, а также некоторые интронные последовательности, расположенные между ними. В одном варианте осуществления интронные последовательности могут быть получены из любого источника, в том числе из других генов, и обычно будут содержать консервативные последовательности сигналов сплайсинга. В одном варианте осуществления интронные последовательности содержат цис-действующие элементы, регулирующие экспрессию.

[0131] В одном варианте осуществления после экспрессии и перед секрецией сигнальные пептиды отщепляются от предшественников сконструированных факторов свертывания крови с образованием в результате зрелых сконструированных факторов свертывания крови, не имеющих сигнального пептида. В другом варианте осуществления после секреции указанный зрелый сконструированный фактор свертывания крови активируется.

[0132] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотиды, раскрываемые в данном документе, получают с помощью методик ПЦР или любого другого способа или процедуры, известных специалисту в данной области. В некоторых вариантах осуществления процедура предусматривает лигирование двух различных последовательностей ДНК (см., например, «Current Protocols in Molecular Biology», eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992).

[0133] В одном варианте осуществления полинуклеотиды, раскрываемые в данном документе, которые кодируют сконструированные факторы свертывания крови, вставлены в векторы экспрессии (т. е. конструкцию нуклеиновой кислоты) для обеспечения экспрессии рекомбинантного полипептида. В одном

варианте осуществления вектор экспрессии, раскрываемый в данном документе, содержит дополнительные последовательности, которые делают этот вектор подходящим для репликации и интеграции у прокариот. В одном варианте осуществления вектор экспрессии, раскрываемый в данном документе, содержит дополнительные последовательности, которые делают этот вектор подходящим для репликации и интеграции у эукариот. В одном варианте осуществления вектор экспрессии, раскрываемый в данном документе, включает в себя челночный вектор, что делает этот вектор подходящим для репликации и интеграции как у прокариот, так и у эукариот. В некоторых вариантах осуществления клонирующие векторы содержат последовательности инициации транскрипции и трансляции (например, промоторы, энхансеры) и терминаторы транскрипции и трансляции (например, сигналы полиаденилирования).

[0134] В одном варианте осуществления для экспрессии факторов свертывания крови, раскрываемых в данном документе, можно использовать разнообразные прокариотические или эукариотические клетки в качестве клеток-хозяев в экспрессионных системах. В некоторых вариантах осуществления они включают без ограничения микроорганизмы, такие как бактерии, трансформированные рекомбинантным вектором экспрессии на основе ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащим последовательность, кодирующую полипептид; дрожжи, трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии у дрожжей, содержащими последовательность, кодирующую полипептид; растительные клеточные системы, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, на основе вируса мозаики цветной капусты CaMV; вируса табачной мозаики TMV) или трансформированные рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии, такими как Ti-плазмида, содержащими последовательность, кодирующую полипептид.

[0135] В некоторых вариантах осуществления для экспрессии факторов свертывания крови, раскрываемых в данном документе, используются небактериальные экспрессионные системы (например, экспрессионные системы млекопитающих, такие как клетки CHO). В

одном варианте осуществления вектор экспрессии, используемый для экспрессии полинуклеотидов, раскрываемых в данном документе, в клетках млекопитающих, представляет собой вектор pCI-DHFR, содержащий промотор CMV и ген устойчивости к неомицину. Конструкция вектора pCI-dhfr описана в соответствии с одним вариантом осуществления в международной заявке № PCT/IL2016/050645, которая включена в данный документ в полном объеме.

[0136] В некоторых вариантах осуществления можно преимущественно выбрать ряд векторов экспрессии в бактериальных системах, раскрываемых в данном документе, в зависимости от предполагаемого применения экспрессируемого полипептида. В одном варианте осуществления желательными являются большие количества полипептида. В одном варианте осуществления желательными являются векторы, управляющие высокими уровнями экспрессии белкового продукта, возможно в виде продукта слияния с гидрофобной сигнальной последовательностью, которая направляет экспрессируемый продукт в периплазму бактерий или культуральную среду, где белковый продукт легко очищается. В одном варианте осуществления определенные слитые белки конструируют со специфическим сайтом расщепления, что способствует извлечению полипептида. В одном варианте осуществления векторы, легко приспособляемые к такой манипуляции, включают без ограничения векторы экспрессии у *E. coli* серии pET [Studier et al., *Methods in Enzymol.* 185:60-89 (1990)].

[0137] В одном варианте осуществления используют дрожжевые экспрессионные системы. В одном варианте осуществления у дрожжей можно использовать ряд векторов, содержащих конститутивные или индуцируемые промоторы, как раскрыто в заявке на патент США № 5932447, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В другом варианте осуществления используют векторы, содействующие интеграции чужеродных последовательностей ДНК в хромосомы дрожжей.

[0138] В одном варианте осуществления вектор экспрессии, раскрываемый в данном документе, может дополнительно содержать дополнительные полинуклеотидные последовательности, которые,

например, обеспечивают возможность трансляции нескольких белков с одной мРНК, такие как участок внутренней посадки рибосомы (IRES), и последовательности для интеграции в геном промотора и области, кодирующей химерный полипептид.

[0139] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные вирусные векторы являются применимыми для экспрессии *in vivo* факторов свертывания крови, раскрываемых в данном документе, поскольку они характеризуются такими преимуществами, как латеральное инфицирование и специфичность нацеливания. В одном варианте осуществления латеральное инфицирование присуще жизненному циклу, например, ретровируса и представляет собой процесс, посредством которого в одной инфицированной клетке образуется много вирионов-потомков, которые отпочковываются и инфицируют соседние клетки. В одном варианте осуществления в результате этого быстро инфицируется большая область, большая часть которой не была изначально инфицирована исходными вирусными частицами. В одном варианте осуществления получают вирусные векторы, неспособные к латеральному распространению. В одном варианте осуществления эта характеристика может быть применимой в том случае, если желаемой целью является введение конкретного гена лишь в ограниченное количество целевых клеток.

[0140] В одном варианте осуществления можно применять различные способы для введения вектора экспрессии, раскрываемого в данном документе, в клетки. Такие способы в общих чертах описаны в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), в Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., *Somatic Gene Therapy*, CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., *Gene Targeting*, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), *Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses*, Butterworths, Boston Mass. (1988) и Gilboa et al. [*Biotechniques* 4 (6): 504-512, 1986] и включают, например, стабильную или транзистентную трансфекцию, липофекцию, электропорацию и инфицирование рекомбинантными вирусными векторами. Кроме того, см. патенты США №№ 5464764 и 5487992, включенные в данный

документ посредством ссылки, в отношении способов позитивно-негативной селекции.

[0141] В некоторых вариантах осуществления введение нуклеиновой кислоты посредством инфицирования вирусом характеризуется некоторыми преимуществами по сравнению с другими способами, такими как липофекция и электропорация, поскольку благодаря инфекционной природе вирусов можно достичь более высокой эффективности трансфекции.

[0142] В одном варианте осуществления будет понятно, что сконструированные факторы свертывания крови, раскрываемые в данном документе, также могут экспрессироваться из конструкции нуклеиновой кислоты, вводимой индивидууму с использованием любого подходящего способа введения, описываемого в данном документе выше (например, генной терапии *in vivo*). В одном варианте осуществления конструкцию нуклеиновой кислоты вводят в подходящую клетку с помощью соответствующего средства/способа для доставки генов (трансфекции, трансдукции, гомологичной рекомбинации и т. д.) и экспрессионной системы в соответствии с необходимостью, и затем модифицированные клетки размножают в культуре и возвращают индивидууму (т. е. посредством генной терапии *ex vivo*).

[0143] В одном варианте осуществления используют векторы экспрессии у растений. В одном варианте осуществления экспрессия последовательности, кодирующей полипептид, управляется рядом промоторов. В некоторых вариантах осуществления используют вирусные промоторы, такие как промоторы генов 35S РНК и 19S РНК CaMV [Brisson et al., Nature 310:511-514 (1984)] или промотор гена белка оболочки TMV [Takamatsu et al., EMBO J. 6:307-311 (1987)]. В другом варианте осуществления используют растительные промоторы, такие как, например, промоторы гена малой субъединицы RUBISCO [Coruzzi et al., EMBO J. 3:1671-1680 (1984); and Brogli et al., Science 224:838-843 (1984)] или генов белков теплового шока, например, hsp17.5-Е или hsp17.3-В сои [Gurley et al., Mol. Cell. Biol. 6:559-565 (1986)]. В одном варианте осуществления конструкции вводят в растительные клетки с помощью Ti-плазмиды, Ri-плазмиды, вирусных векторов для экспрессии у растений, прямой

трансформации с помощью ДНК, микроинъекции, электропорации и других методик, хорошо известных специалисту в данной области. См., например, Weissbach & Weissbach [Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp 421-463 (1988)]. В настоящем изобретении также можно использовать другие экспрессионные системы, такие как системы на основе клеток-хозяев, являющихся клетками насекомых и млекопитающих, хорошо известные из уровня техники.

[0144] Будет понятно, что помимо того, что экспрессионная конструкция, раскрываемая в данном документе, содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей последовательности (кодирующей полипептид), она также может содержать последовательности, сконструированные для оптимизации стабильности, получения, очистки, выхода или активности экспрессируемого полипептида.

[0145] В некоторых вариантах осуществления трансформированные клетки культивируют в эффективных условиях, обеспечивающих возможность экспрессии рекомбинантных сконструированных факторов свертывания крови в высоких количествах. В некоторых вариантах осуществления эффективные условия культивирования включают без ограничения эффективные условия среды, биореактора, температуры, pH и содержания кислорода, которые позволяют получать белок. В одном варианте осуществления эффективная среда относится к любой среде, в которой культивируют клетки для получения рекомбинантного полипептида, раскрываемого в данном документе. В некоторых вариантах осуществления среда обычно включает в себя водный раствор, имеющий источники усвояемого углерода, азота и фосфата, а также необходимые соли, минеральные вещества, металлы и другие питательные вещества, такие как витамины. В некоторых вариантах осуществления клетки, раскрываемые в данном документе, можно культивировать в традиционных ферментационных биореакторах, встряхиваемых колбах, пробирках, микротитровальных чашках и чашках Петри. В некоторых вариантах осуществления культивирование осуществляют при температуре, pH и содержании кислорода, подходящих для рекомбинантной клетки. В некоторых

вариантах осуществления определение условий культивирования находится в пределах квалификации среднего специалиста в данной области.

[0146] В некоторых вариантах осуществления в зависимости от вектора и клеток-хозяев в экспрессионной системе, используемых для получения, получаемые в результате сконструированные факторы свертывания крови, раскрываемые в данном документе, остаются в рекомбинантной клетке, секретируются в ферментационную среду, секретируются в пространство между двумя клеточными мембранами, такое как периплазматическое пространство у *E. coli*; либо удерживаются на наружной поверхности клеточной или вирусной мембраны.

[0147] В одном варианте осуществления после истечения предварительно определенного периода времени в культуре осуществляют извлечение рекомбинантного сконструированного фактора свертывания крови.

[0148] В одном варианте осуществления фраза «извлечение рекомбинантного сконструированного фактора свертывания крови», используемая в данном документе, относится к сбору всей ферментационной среды, содержащей полипептид, и не обязательно предполагает дополнительные стадии отделения или очистки.

[0149] В одном варианте осуществления сконструированные факторы свертывания крови, раскрываемые в данном документе, очищают с помощью разнообразных стандартных методик очистки белков, таких как, без ограничения, аффинная хроматография, ионообменная хроматография, фильтрация, электрофорез, хроматография гидрофобных взаимодействий (HIC), гель-фильтрационная хроматография, обращенно-фазовая хроматография, хроматография на конканавалине А, хроматофокусирование и дифференциальная солюбилизация.

[0150] В одном варианте осуществления типом колонки для хроматографии гидрофобных взаимодействий является колонка C₁₈ Phenyl ImpRes (CIP).

[0151] В одном варианте осуществления для облегчения извлечения экспрессируемая кодирующая последовательность может быть сконструирована таким образом, чтобы она кодировала

сконструированный фактор свертывания крови, раскрываемый в данном документе, и слитый отщепляемый компонент. В одном варианте осуществления слитый белок может быть разработан таким образом, чтобы полипептид можно было легко выделить посредством аффинной хроматографии; например, путем иммобилизации на колонке с сорбентом, специфичным по отношению к отщепляемому компоненту. В одном варианте осуществления между сконструированным фактором свертывания крови и отщепляемым компонентом встроен сайт расщепления, и высвобождение полипептида из хроматографической колонки можно осуществлять путем обработки соответствующим ферментом или средством, осуществляющим специфичное расщепление слитого белка в данном сайте [например, см. Booth et al., Immunol. Lett. 19:65-70 (1988); и Gardella et al., J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990)].

[0152] В одном варианте осуществления сконструированный фактор свертывания крови, раскрываемый в данном документе, извлекают в «по существу чистой» форме. В другом варианте осуществления по существу чистый сконструированный фактор свертывания крови может дополнительно включать в себя активную форму фактора свертывания крови. В другом варианте осуществления по существу чистая форма является на по меньшей мере 90% чистой. В другом варианте осуществления по существу чистая форма является на по меньшей мере 95-99% чистой.

[0153] В одном варианте осуществления сконструированный фактор свертывания крови, раскрываемый в данном документе, также можно синтезировать с помощью экспрессионных систем *in vitro*. В одном варианте осуществления способы синтеза *in vitro* хорошо известны из уровня техники, и компоненты системы являются коммерчески доступными.

[0154] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные сконструированные факторы свертывания крови синтезируют и очищают; их терапевтическую эффективность можно оценивать *in vivo* либо *in vitro*. В одном варианте осуществления значения активности связывания рекомбинантных сконструированных факторов свертывания крови, раскрываемых в данном документе, можно установить с помощью различных анализов, известных специалисту в

данной области.

[0155] Следует понимать, что полипептиды, композиции, составы и способы, раскрываемые в данном документе, включающие в себя элементы или стадии, описываемые в данном документе, могут в другом варианте осуществления состоять из этих элементов или стадий или, в другом варианте осуществления, состоять по сути из этих элементов или стадий. В некоторых вариантах осуществления термин «содержать» относится к включению указанного активного вещества, такого как СТР-модифицированный фактор свертывания крови, а также к включению других активных веществ и фармацевтически приемлемых носителей, наполнителей, смягчающих средств, стабилизаторов и т. д., известных в фармацевтической промышленности. В некоторых вариантах осуществления термин «состоящий по сути из» относится к композиции, указанным активным ингредиентом которой является единственный активный ингредиент, при этом, однако, могут быть включены другие соединения, предназначенные для стабилизации, сохранения и т. д. состава, но непосредственно не задействованные в оказании терапевтического эффекта указанного активного ингредиента. В некоторых вариантах осуществления термин «состоящий по сути из» может относиться к компонентам, облегчающим высвобождение активного ингредиента. В некоторых вариантах осуществления термин «состоящий» относится к композиции, содержащей активный ингредиент и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

[0156] В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается полинуклеотид, кодирующий СТР-модифицированный полипептид, состоящий из полипептида, являющегося фактором свертывания крови VII (FVII), и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVII. В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается композиция, содержащая вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид, являющийся фактором свертывания крови VII (FVII), и три карбоксиконцевых пептида (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa. В одном

варианте осуществления СТР-модифицированный FVII содержит сигнальный пептид. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный FVII не содержит сигнальный пептид.

[0157] В одном варианте осуществления в данном документе раскрывается рекомбинантный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе выше. В одном варианте осуществления в данном документе раскрывается сконструированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе выше. В одном варианте осуществления сконструированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе выше, называют СТР-модифицированным фактором свертывания крови.

[0158] В одном варианте осуществления СТР, присоединенные к карбоксильному концу фактора свертывания крови, присоединены последовательно один за другим к карбоксильному концу.

[0159] В одном варианте осуществления сконструированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, обладает эквивалентной или улучшенной биологической активностью по сравнению с фактором свертывания крови, не модифицированным с помощью СТР. В другом варианте осуществления сконструированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, обладает эквивалентными или улучшенными фармакологическими показателями по сравнению с фактором свертывания крови, не модифицированным с помощью СТР. В другом варианте осуществления сконструированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, обладает эквивалентными или улучшенными фармакокинетическими параметрами по сравнению с фактором свертывания крови, не модифицированным с помощью СТР. В другом варианте осуществления сконструированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, обладает эквивалентными или улучшенными фармакодинамическими характеристиками по сравнению с фактором свертывания крови, не модифицированным с помощью СТР.

[0160] В другом варианте осуществления термины «СТР-пептид», «карбоксиконцевой пептид» и «последовательность СТР» используются в данном документе взаимозаменяемо. В другом варианте осуществления карбоксиконцевой пептид представляет

собой полноразмерный СТР.

[0161] В других вариантах осуществления термин «сконструированный фактор свертывания крови» относится к аминокислотной последовательности зрелого фактора свертывания крови. В других вариантах осуществления термин «сконструированный фактор свертывания крови» относится к аминокислотной последовательности фактора свертывания крови, содержащей его сигнальную последовательность или сигнальный пептид.

[0162] В другом варианте осуществления «сигнальная последовательность» и «сигнальный пептид» используются в данном документе взаимозаменяемо во всех случаях с одинаковыми свойствами и значениями. В другом варианте осуществления «последовательность» применительно к молекуле полинуклеотида может относиться к кодирующей части. В другом варианте осуществления сконструированный фактор свертывания крови, содержащий по меньшей мере один СТР, описываемый в данном документе, обладает повышенной биологической активностью *in vivo* по сравнению с тем же самым фактором свертывания крови, не содержащим по меньшей мере один СТР. В одном варианте осуществления повышенная биологическая активность обусловлена более длительным периодом полувыведения сконструированного фактора свертывания крови с сохранением при этом по меньшей мере некоторой биологической активности. В другом варианте осуществления повышенная биологическая активность обусловлена повышенной биологической активностью в результате модификации с помощью СТР. В другом варианте осуществления повышенная биологическая активность обусловлена как более длительным периодом полувыведения, так и повышенными функциональными возможностями СТР-модифицированного фактора свертывания крови.

[0163] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна последовательность СТР на карбоксильном конце фактора свертывания крови обеспечивает повышенную защиту от разрушения фактора свертывания крови. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна последовательность СТР на карбоксильном конце фактора свертывания крови обеспечивает повышенную защиту

от очищения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна последовательность СТР на карбоксильном конце фактора свертывания крови обеспечивает продление времени очищения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна последовательность СТР на карбоксильном конце фактора свертывания крови обеспечивает повышение его $С_{\text{max}}$. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна последовательность СТР на карбоксильном конце фактора свертывания крови обеспечивает повышение его T_{max} . В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна последовательность СТР на карбоксильном конце фактора свертывания крови обеспечивает продление его $T_{1/2}$.

[0164] В другом варианте осуществления конъюгированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению применяют таким же образом, как и немодифицированный конъюгированием фактор свертывания крови. В другом варианте осуществления конъюгированный фактор свертывания крови согласно настоящему изобретению характеризуется увеличенным периодом полувыведения из кровотока и временем удержания в плазме крови, уменьшенной интенсивностью очищения и увеличенной клинической активностью *in vivo*. В другом варианте осуществления благодаря улучшенным свойствам конъюгированного фактора свертывания крови, описываемого в данном документе, данный конъюгат вводят с меньшей частотой, чем немодифицированную форму того же самого фактора свертывания крови.

[0165] В другом варианте осуществления уменьшение частоты введения дает в результате улучшенную стратегию лечения, которая в одном варианте осуществления приводит к улучшению приверженности пациента к терапии, что обуславливает улучшение результатов лечения, а также улучшение качества жизни пациента. В другом варианте осуществления было обнаружено, что по сравнению с традиционными конъюгатами факторов свертывания крови конъюгаты, имеющие молекулярную массу и структуру линкеров конъюгатов согласно настоящему изобретению, характеризуются улучшенной удельной активностью, улучшенной стабильностью, повышенными уровнями AUC и повышенным периодом полувыведения из

кровотока.

Композиции и способы применения

[0166] В другом варианте осуществления сконструированный фактор свертывания крови, раскрываемый в данном документе, может предоставляться индивидууму *per se*. В одном варианте осуществления сконструированный фактор свертывания крови, раскрываемый в данном документе, может предоставляться индивидууму в качестве части фармацевтической композиции, в которой он смешан с фармацевтически приемлемым носителем.

[0167] В одном варианте осуществления «фармацевтическая композиция» или «фармацевтический состав» относится к препарату из одного или более активных ингредиентов, описываемых в данном документе, и других химических компонентов, таких как физиологически приемлемые носители и наполнители. Целью использования фармацевтической композиции или «фармацевтического состава» является облегчение введения соединения в организм. В определенных вариантах осуществления «фармацевтическая композиция» или «фармацевтический состав» представляет собой фармацевтическую лекарственную форму лекарственного средства. «Фармацевтические композиции» или «фармацевтические составы» в определенных вариантах осуществления включают технологии замедленного высвобождения, трансдермальные пластыри или любую лекарственную форму, известную из уровня техники.

[0168] В другом варианте осуществления «активный ингредиент» относится к полипептидной последовательности, представляющей интерес, которая отвечает за биологический эффект.

[0169] В другом варианте осуществления любая из композиций, раскрываемых в данном документе, будет содержать по меньшей мере одну последовательность СТР, связанную только с карбоксильным концом сконструированного фактора свертывания крови, представляющего интерес, в любой форме. В одном варианте осуществления в данном документе раскрываются комбинированные препараты. В одном варианте осуществления «комбинированный препарат» определяется, в частности, как «набор из частей» в том смысле, что партнеров по комбинации, определенных выше, можно

вводить дозами независимо или путем использования различных фиксированных комбинаций с различными количествами партнеров по комбинации, т. е. одновременно, параллельно, по отдельности или последовательно. В некоторых вариантах осуществления части набора из частей можно, таким образом, например, вводить одновременно или с хронологическим разнесением, то есть в разные моменты времени и с равными или разными временными интервалами для каждой части набора из частей. Соотношение общих количеств партнеров по комбинации в некоторых вариантах осуществления можно вводить в виде комбинированного препарата. В одном варианте осуществления компоненты комбинированного препарата можно варьировать, например, с целью удовлетворения потребностей подгруппы пациентов, подлежащей лечению, или потребностей одного пациента, различные потребности которого могут быть обусловлены конкретным заболеванием, тяжестью заболевания, возрастом, полом или массой тела, что может легко сделать специалист в данной области.

[0170] В другом варианте осуществления в данном документе раскрываются фармацевтическая композиция или фармацевтический состав, содержащие полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VIIa (FVIIa), состоящий из полипептида FVIIa и трех карбоксиконцевых пептидов (СТР) гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного FVIIa.

[0171] В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрена композиция, содержащая конъюгированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе. В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая конъюгированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе. В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество конъюгированного фактора свертывания крови, описываемого в данном документе. В одном варианте осуществления терапевтически эффективное количество конъюгированного фактора свертывания крови определяют в

соответствии с такими факторами, как конкретное состояние, лечение которого осуществляют, состояние пациента, лечение которого осуществляют, а также другие ингредиенты в композиции.

[0172] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен фармацевтический состав для применения в композициях, составах и способах согласно настоящему изобретению. В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрен фармацевтический состав, содержащий полипептид, состоящий из фактора свертывания крови и трех карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови. В другом варианте осуществления фармацевтический состав дополнительно содержит буфер и средство, регулирующее тоничность. В другом варианте осуществления буфер представляет собой 20 мМ цитрата и 13,3 мМ глицина, а средство, регулирующее тоничность, представляет собой 150 мМ NaCl. В другом варианте осуществления состав имеет pH, составляющий приблизительно 6,4. В другом варианте осуществления буфер представляет собой 20 мМ цитрата и 13,3 мМ глицина, а средство, регулирующее тоничность, представляет собой 150 мМ NaCl, и pH составляет 6,4. В другом варианте осуществления буфер представляет собой 20 мМ цитрата, 100 мМ аргинина и 2% трегалозу, и pH составляет 6,2. В другом варианте осуществления состав представляет собой жидкий состав. В другом варианте осуществления состав представляет собой лиофилизированный состав. В другом варианте осуществления жидкий состав можно получить с использованием лиофилизированного СТР-модифицированного фактора свертывания крови. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови представляет собой FVII-СТР3. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови представляет собой FVIIa-СТР3.

[0173] В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрена лекарственная форма для введения один раз в неделю, содержащая фармацевтический состав, предусмотренный в данном документе. В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрена лекарственная форма для введения один

раз в день, содержащая фармацевтический состав, предусмотренный в данном документе. В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрена лекарственная форма для введения один раз в два дня, содержащая фармацевтический состав, предусмотренный в данном документе. В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрена лекарственная форма для введения один раз в три дня, содержащая фармацевтический состав, предусмотренный в данном документе. В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрена лекарственная форма для введения два раза в неделю, содержащая фармацевтический состав, предусмотренный в данном документе. В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрена лекарственная форма для введения два раза в неделю, содержащая фармацевтический состав, предусмотренный в данном документе. В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрена лекарственная форма для еженедельного введения, содержащая фармацевтический состав, предусмотренный в данном документе. В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрена лекарственная форма для введения один раз в две недели (каждые две недели), содержащая фармацевтический состав, предусмотренный в данном документе.

[0174] В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается состав, содержащий полипептид, состоящий из фактора свертывания крови и трех СТР хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного фактора свертывания крови, и где указанный полипептид необязательно состоит из сигнального пептида, где указанный состав обладает увеличенной стабильностью. В одном варианте осуществления состав является стабильным в течение по меньшей мере одного года. В другом варианте осуществления состав является стабильным в течение по меньшей мере двух лет.

[0175] В одном варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, составлен в виде жидкого состава. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови VII, модифицированный с помощью СТР, составлен в виде жидкого состава. В другом варианте осуществления фактор

свертывания крови VIIa, модифицированный с помощью СТР, составлен в виде жидкого состава. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, составлен в виде лекарственной формы для интраназального введения. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, составлен в виде инъекционной лекарственной формы.

[0176] В другом варианте осуществления способы согласно настоящему изобретению включают увеличение приверженности к применению терапии факторами свертывания крови, включающее предоставление субъекту, нуждающемуся в этом, фактора свертывания крови, модифицированного с помощью СТР, за счет чего увеличивается приверженность к применению терапии факторами свертывания крови.

[0177] В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, вводят субъекту один раз в день. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, вводят субъекту один раз в два дня. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, вводят субъекту один раз в три дня. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, вводят субъекту один раз в четыре дня. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, вводят субъекту один раз в пять дней. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, вводят субъекту один раз в шесть дней. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, вводят субъекту один раз в неделю. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, вводят субъекту один раз в 7–14 дней. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, вводят субъекту один раз в 10–20 дней. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, вводят субъекту один раз в 5–15 дней. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, вводят

субъекту один раз в 15–30 дней.

[0178] В одном варианте осуществления препарат, раскрываемый в данном документе, составлен в виде жидких составов для инъекции с помощью шприца или шприц-ручки.

[0179] В одном варианте осуществления составы, предусмотренные в данном документе, также содержат консерванты, такие как хлорид бензалкония и тимеросал и т. п.; хелатообразователи, такие как эдетат натрия и другие; буферы, такие как фосфат, цитрат и ацетат; средства, регулирующие тоничность, такие как хлорид натрия, хлорид калия, глицерин, маннит и другие; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, ацетилцистеин, метабисульфит натрия и другие; ароматизирующие средства; регуляторы вязкости, такие как полимеры, в том числе целлюлоза и ее производные и поливиниловый спирт; а также кислоты и основания для регуляции pH этих водных композиций в соответствии с необходимостью. Композиции также содержат анестезирующие средства местного действия или другие активные вещества. Композиции можно применять в виде спреев, туманообразных аэрозолей, капель и т. п.

[0180] В одном варианте осуществления фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, представляет собой фактор свертывания крови человека.

[0181] В другом варианте осуществления конъюгированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, является применимым для лечения субъектов, страдающих нарушением коагуляции или свертывания крови. В другом варианте осуществления нарушение коагуляции или свертывания крови представляет собой гемофилию. В другом варианте осуществления конъюгированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, является применимым для профилактической терапии гемофилии, за счет чего снижается риск развития кровотечения и ассоциированных осложнений. В другом варианте осуществления при снижении риска развития кровотечения и ассоциированных осложнений снижается риск развития спонтанного кровотечения. В другом варианте осуществления при снижении риска развития кровотечения и ассоциированных осложнений снижается риск

развития обильного кровотечения. В другом варианте осуществления конъюгированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, является применимым для лечения субъектов, страдающих гемофилией, с обеспечением при этом снижения риска выработки ингибирующих антител к экзогенно вводимым факторам свертывания крови. В другом варианте осуществления конъюгированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, является применимым для лечения субъектов, страдающих гемофилией, за счет чего индуцируется гемостаз.

[0182] В одном варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови, раскрываемый в данном документе, имеет пути терапевтического применения. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови, раскрываемый в данном документе, имеет пути профилактического применения.

[0183] В другом варианте осуществления конъюгированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, является применимым для лечения субъектов, у которых проявляется обильное кровотечение или образование кровоподтеков или которые характеризуются длительным протромбиновым временем (РТ) или частичным тромбопластиновым временем (РТТ). В другом варианте осуществления конъюгированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, является применимым для лечения субъектов, имеющих приобретенное состояние, вызывающее кровотечение, такое как дефицит витамина К или заболевание печени. В другом варианте осуществления конъюгированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, является применимым для лечения субъектов, имеющих дефициты факторов свертывания крови, которые являются приобретенными (в связи с другими заболеваниями) или наследственными, легкими или тяжелыми, перманентными или временными. В другом варианте осуществления конъюгированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, является применимым для лечения субъектов, страдающих гемофилией А. В другом варианте осуществления конъюгированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, является применимым для лечения

субъектов, страдающих гемофилией В. В другом варианте осуществления конъюгированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, является применимым для лечения субъектов, имеющих приобретенные дефициты в связи с хроническими заболеваниями, такими как заболевание печени или рак; в связи с острым состоянием, таким как диссеминированная внутрисосудистая коагуляция (DIC), при котором факторы свертывания крови расходуются с большой скоростью; или в связи с дефицитом витамина К или лечением антагонистом витамина К, таким как варфарин (для выработки факторов свертывания крови II, VII, IX и X необходим витамин К). В другом варианте осуществления конъюгированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, является применимым для лечения субъектов, страдающих заболеванием, которое вызывает дисбалансы свертывания крови, как, например, без ограничения, в случае заболевания печени, уремии, рака, нарушения со стороны костного мозга, воздействия змеиного яда, дефицита витамина К, антикоагуляционной терапии, случайного приема внутрь антикоагулянта варфарина, многократных переливаний крови (хранящиеся единицы крови утрачивают некоторые из своих факторов свертывания крови) или их комбинации. В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается способ лечения тромбоза глубоких вен у субъекта, включающий введение СТР-модифицированного фактора свертывания крови, раскрываемого в данном документе. В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается способ предупреждения неконтролируемого кровотечения у субъекта с гемофилией, включающий введение СТР-модифицированного фактора свертывания крови, раскрываемого в данном документе. В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается способ предупреждения эпизодов кровотечения у субъекта с гемофилией, включающий введение СТР-модифицированного фактора свертывания крови, раскрываемого в данном документе. В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается способ контроля эпизодов кровотечения у субъекта с гемофилией В (врожденным дефицитом фактора свертывания крови IX).

[0184] В одном варианте осуществления композиция согласно

настоящему изобретению содержит состав, описываемый в данном документе. В другом варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению включает введение состава, описываемого в данном документе. В другом варианте осуществления способ согласно настоящему изобретению включает введение композиции, содержащей состав, описываемый в данном документе.

[0185] В одном варианте осуществления в данном документе раскрывается способ предупреждения или лечения нарушения свертывания крови или коагуляции. В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается способ предупреждения или лечения гемофилии у субъекта, включающий введение СТР-модифицированного фактора свертывания крови, раскрываемого в данном документе. В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается способ предупреждения и лечения гемофилии у субъекта, включающий введение СТР-модифицированного фактора свертывания крови, раскрываемого в данном документе. В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение СТР-модифицированного фактора свертывания крови VIIa, раскрываемого в данном документе.

[0186] В одном варианте осуществления гемофилия представляет собой гемофилию А. В другом варианте осуществления гемофилия представляет собой гемофилию В. В другом варианте осуществления способы согласно настоящему изобретению для предупреждения или лечения нарушения свертывания крови или коагуляции обеспечивают предупреждение или лечение гемофилии у пациентов, имеющих гемофилию А или В с ингибиторами FVIII или FIX соответственно. В другом варианте осуществления способы согласно настоящему изобретению предназначены для предупреждения или лечения пациентов с приобретенной гемофилией (гемофилией без ингибиторов). В другом варианте осуществления способы согласно настоящему изобретению для предупреждения или лечения нарушения свертывания крови или коагуляции обеспечивают предупреждение или лечение гемофилии А или В без ингибиторов. В другом варианте осуществления гемофилия представляет собой тяжелую гемофилию. В

другом варианте осуществления гемофилия представляет собой умеренную гемофилию. В другом варианте осуществления гемофилия представляет собой гемофилию от умеренной до тяжелой с ингибиторами или без них. Специалисту в данной области будет понятно, что термин «гемофилия от умеренной до тяжелой» относится к субъекту, имеющему содержание FVIII или FIX, меньшее или равное 3%. В другом варианте осуществления тяжелая гемофилия может охватывать уровни факторов свертывания крови, равные приблизительно 0–1%. В другом варианте осуществления гемофилия представляет собой умеренную гемофилию, что в другом варианте осуществления описывает гемофилию, при которой уровни факторов свертывания крови составляют 1–5%. В другом варианте осуществления гемофилия представляет собой легкую гемофилию, что в другом варианте осуществления описывает гемофилию, при которой уровни факторов свертывания крови составляют 5–50%.

[0187] В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается способ предупреждения или лечения нарушения свертывания крови или коагуляции у субъекта, включающий введение полипептида, являющегося СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII (FVII), содержащего полипептид FVIIa и три карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина (СТР), присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, указанному субъекту, за счет чего обеспечивается предупреждение или лечение нарушения свертывания крови или коагуляции у указанного субъекта.

[0188] В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается способ предупреждения или лечения гемофилии у субъекта, включающий введение полипептида, являющегося СТР-модифицированным фактором свертывания крови VIIa (FVIIa), содержащего полипептид FVIIa и три карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина (СТР), присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, указанному субъекту, за счет чего обеспечивается предупреждение или лечение гемофилии у указанного субъекта.

[0189] В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается способ лечения гемофилии у субъекта, включающий

введение одного или более СТР-модифицированных факторов свертывания крови, описываемых в данном документе, указанному субъекту. Таким образом, в одном варианте осуществления в данном документе раскрывается способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение полипептида, являющегося СТР-модифицированным фактором свертывания крови VIIa (FVIIa), содержащего полипептид FVIIa и три карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина (СТР), присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, указанному субъекту, за счет чего обеспечивается лечение гемофилии у указанного субъекта. В одном варианте осуществления СТР-модифицированный FVIIa вводят в одной и той же композиции в одно и то же время. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный FVIIa вводят в разных композициях в одно и то же время. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный FVIIa вводят в разных композициях в разное время.

[0190] В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается способ предупреждения или лечения гемофилии у субъекта, включающий введение полипептида FVIIa и трех карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина (СТР), присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, указанному субъекту, за счет чего обеспечивается предупреждение или лечение гемофилии у указанного субъекта.

[0191] В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается способ предупреждения или лечения гемофилии у субъекта, включающий подкожное или внутривенное введение полипептида, являющегося СТР-модифицированным фактором свертывания крови VIIa, содержащего полипептид FVIIa и три карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина (СТР), присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, указанному субъекту, за счет чего обеспечивается предупреждение или лечение гемофилии у указанного субъекта. В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрен способ предупреждения или лечения гемофилии у субъекта, при этом способ включает стадию введения субъекту СТР-модифицированного фактора свертывания крови, содержащего от трех

до пяти карбоксиконцевых пептидов (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида, являющегося фактором свертывания крови, где последовательность указанного СТР-модифицированного фактора свертывания крови выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 или 7, за счет чего обеспечивается предупреждение гемофилии у указанного субъекта. В другом варианте осуществления указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови выбран из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5 или 7. В другом варианте осуществления указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови состоит из SEQ ID NO: 7. В другом варианте осуществления указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови, состоящий из SEQ ID NO: 7, включает в себя активированный FVII (FVIIa).

[0192] В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение полипептида, являющегося активированным СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII (FVIIa), содержащего полипептид FVIIa и три карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина (СТР), присоединенных к карбоксильному концу указанного полипептида FVIIa, указанному субъекту, за счет чего обеспечивается лечение гемофилии у указанного субъекта.

[0193] В другом варианте осуществления подкожное (SC) введение приводит в результате к более высокой биодоступности СТР-модифицированного FVII по сравнению с рекомбинантным FVII. В другом варианте осуществления период полувыведения является более длительным, а биодоступность (AUC SC/AUC IV) является более высокой после SC введения FVIIa-СТР₃ по сравнению с SC введением NovoSeven®. В другом варианте осуществления при подкожной инъекции MOD-5014 демонстрируется улучшенная выживаемость мышей по сравнению с рекомбинантным FVII (NovoSeven®).

[0194] В одном варианте осуществления MOD-5014 представляет собой FVIIa-СТР₃ (имеющий три СТР-пептида, присоединенных к С-концу). В одном варианте осуществления MOD-5014 представляет собой фактор свертывания крови пролонгированного действия. В

одном варианте осуществления MOD-5014 обеспечивает более устойчивую и длительную реакцию свертывания крови по сравнению с рекомбинантным FVIIa человека. Специалисту в данной области будет понятно, что термины «MOD-5014» или «FVIIa-CTP₃» можно использовать взаимозаменяемо во всех случаях с одинаковыми свойствами и значениями, и в одном варианте осуществления они относятся к двухцепочечной гетеродимерной структуре, стабилизированной дисульфидными связями, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7. Кроме того, специалисту в данной области будет понятно, что при описании факторов свертывания крови или CTP-модифицированных факторов свертывания крови в данном документе, например, FVII-CTP₃, термин «FVII-CTP₃» может в некоторых случаях относиться к неактивной форме FVII-CTP₃. Специалисту в данной области будет определено понятно, какая форма упоминается, на основании связанных подробностей, таких как активность. Аналогично, при том, что термин «MOD-5014» является взаимозаменяемым с термином «FVIIa-CTP₃», т. е. представляет активную форму CTP-модифицированного фактора свертывания крови, в некоторых случаях термин «MOD-5014» может использоваться для обозначения активной формы FVII или нуклеотидной последовательности, кодирующей FVII-CTP₃, который будет затем экспрессироваться и секретироваться из клетки, а также очищаться и активироваться *in vitro* с образованием в результате активной формы FVIIa, представленной в виде молекулы MOD-5014.

[0195] В одном варианте осуществления деактивация MOD-5014 под действием ингибитора пути тканевого фактора (TFPI) является дозозависимой. В одном варианте осуществления деактивация MOD-5014 под действием TFPI характеризуется картиной дозозависимой деактивации, сходной с картиной для рекомбинантного FVIIa (NovoSeven®) под действием TFPI. В одном варианте осуществления MOD-5014 ингибируется под действием антитромбина III. В одном варианте осуществления ингибирование MOD-5014 под действием антитромбина III усиливается в присутствии гепарина. В одном варианте осуществления ингибирование MOD-5014 под действием антитромбина III характеризуется картиной ингибирования, сходной

с картиной для рекомбинантного FVIIa (NovoSeven®), в присутствии или в отсутствие гепарина.

[0196] В одном варианте осуществления MOD-5014 обеспечивает образование тромбина дозозависимым образом. В одном варианте осуществления MOD-5014 уменьшает длительность лаг-фазы образования тромбина. В одном варианте осуществления MOD-5014 уменьшает время свертывания крови. В одном варианте осуществления MOD-5014 увеличивает эффективность формирования сгустков крови. В одном варианте осуществления при введении MOD-5014 уменьшается время свертывания крови у субъекта. В одном варианте осуществления при введении MOD-5014 увеличивается эффективность формирования сгустков крови у субъекта. В одном варианте осуществления образование тромбина под действием MOD-5014 является сходным с тем, которое вызывается рекомбинантным FVIIa (NovoSeven®). В одном варианте осуществления уменьшение длительности лаг-фазы образования тромбина под действием MOD-5014 является сходным с тем, которое вызывается рекомбинантным FVIIa (NovoSeven®). В одном варианте осуществления уменьшение времени свертывания крови под действием MOD-5014 является сходным с тем, которое вызывается рекомбинантным FVIIa (NovoSeven®). В одном варианте осуществления увеличение эффективности формирования сгустков крови под действием MOD-5014 является сходным с тем, которое вызывается рекомбинантным FVIIa (NovoSeven®).

[0197] Как предусмотрено в данном документе, при присоединении СТР к факторам свертывания крови, например, фактору свертывания крови FVII, увеличивается период полувыведения фактора свертывания крови. Примеры демонстрируют, что присоединение СТР, например, присоединение трех СТР к FVIIA, по-видимому, не влияет на формы активности свертывания крови. В одном варианте осуществления присоединение СТР к FVII не препятствует формированию сгустков крови. В одном варианте осуществления присоединение СТР к FVII не препятствует увеличению эффективности формирования сгустков крови. В одном варианте осуществления присоединение СТР к FVII не препятствует уменьшению времени свертывания крови. В одном варианте

осуществления связывание фосфолипида с FVII сохраняется после присоединения СТР к фактору свертывания крови. В одном варианте осуществления присоединение СТР к FVIIA не препятствует формированию сгустков крови. В одном варианте осуществления присоединение СТР к FVIIA не препятствует увеличению эффективности формирования сгустков крови. В одном варианте осуществления присоединение СТР к FVIIA не препятствует уменьшению формирования сгустков крови. В одном варианте осуществления связывание фосфолипида с FVIIA сохраняется после присоединения СТР к фактору свертывания крови.

[0198] В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение СТР-модифицированных факторов свертывания крови, описываемых в данном документе, указанному субъекту.

[0199] В других вариантах осуществления сконструированный фактор свертывания крови предназначен для лечения пациентов с гемофилией В. Представлены результаты введения MOD-5014 крупным млекопитающим (собакам). Введение MOD-5014 обеспечивало наличие эффективного и безопасного FVIIa пролонгированного действия для коагуляции крови (см. международную заявку № PCT/IL2016/050645, которая включена в данный документ в полном объеме). Лечение с помощью MOD-5014 может быть профилактическим или по требованию. В одном варианте осуществления в данном документе раскрывается способ лечения гемофилии у субъекта, включающий введение MOD-5014 указанному субъекту, за счет чего обеспечивается лечение гемофилии у указанного субъекта. В одном варианте осуществления в данном документе раскрывается способ предупреждения обильного кровотечения у субъекта, включающий введение MOD-5014 указанному субъекту, за счет чего обеспечивается предупреждение обильного кровотечения у указанного субъекта. В одном варианте осуществления в данном документе раскрывается способ профилактического лечения гемофилии у субъекта, включающий введение MOD-5014 указанному субъекту, за счет чего обеспечивается профилактическое лечение гемофилии у указанного субъекта.

[0200] В одном варианте осуществления лечение гемофилии у

субъекта с помощью MOD-5014 предусматривает сниженную частоту введения MOD-5014 по сравнению с рекомбинантным FVIIa (NovoSeven®). В одном варианте осуществления профилактическое лечение гемофилии у субъекта с помощью MOD-5014 предусматривает сниженную частоту введения MOD-5014 по сравнению с рекомбинантным FVIIa (NovoSeven®). В одном варианте осуществления предупреждение обильного кровотечения у субъекта с помощью MOD-5014 предусматривает сниженную частоту введения MOD-5014 по сравнению с рекомбинантным FVIIa (NovoSeven®).

[0201] В одном варианте осуществления фактор свертывания крови VII, содержащий 3 СТР, расположенных последовательно один за другим на его карбоксильном конце, демонстрирует улучшенный РК-профиль в сравнении с NovoSeven® с сохранением при этом своей коагуляционной активности.

[0202] В другом варианте осуществления композиции, составы и способы, раскрываемые в данном документе, предназначены для лечения эпизодов кровотечения у пациентов с гемофилией А или В, имеющих ингибиторы FVIII или FIX, и у пациентов с приобретенной гемофилией; предупреждения кровотечения при хирургических вмешательствах или инвазивных процедурах у пациентов с гемофилией А или В, имеющих ингибиторы FVIII или FIX, и у пациентов с приобретенной гемофилией; лечения эпизодов кровотечения у пациентов с врожденным дефицитом FVII и предупреждения кровотечения при хирургических вмешательствах или инвазивных процедурах у пациентов с врожденным дефицитом FVII. Приобретенная гемофилия представляет собой спонтанное аутоиммунное нарушение, при котором у пациентов с ранее нормальным гемостазом вырабатываются аутоантитела к факторам свертывания крови, наиболее часто FVIII. Выработка аутоантител к FVIII приводит к дефициту FVIII, что обуславливает недостаточное образование тромбина под действием комплекса фактора свертывания крови IXa и фактора свертывания крови VIIa посредством внутреннего пути коагуляционного каскада. С приобретенной гемофилией А могут быть ассоциированы следующие состояния: идиопатия, беременность, аутоиммунные нарушения, воспалительное заболевание кишечника, неспецифический язвенный колит,

дерматологические нарушения (например, псориаз, пузырьчатка), респираторные заболевания (например, астма, хроническое обструктивное заболевание легких), аллергические реакции на лекарственные средства, сахарный диабет, острый инфекционный гепатит В, острый инфекционный гепатит С, солидные злокачественные опухоли (опухоли предстательной железы, легкого, ободочной кишки, поджелудочной железы, желудка, желчевыводящих путей, головы и шеи, шейки матки, молочной железы, меланомы, опухоли почки), гематологические злокачественные опухоли. Специалисту в данной области будет понятно, что аутоиммунные нарушения могут включать в себя ревматоидный артрит, системную красную волчанку, рассеянный склероз, височный артериит, синдром Шегрена, аутоиммунную гемолитическую анемию, синдром Гудпасчера, тяжелую миастению, болезнь Грейвса, аутоиммунный гипотиреоз. Специалисту в данной области будет понятно, что аллергические реакции могут иметь место у субъекта, которому вводят пенициллин и его производные, сульфамиды, фенитоин, хлорамфеникол, метилдопу, депо-форму тиоксантина, интерферон-альфа, флударабин, вакцину на основе бациллы Кальметта-Герена (BCG), десвенлафаксин. Специалисту в данной области будет понятно, что гематологические злокачественные опухоли могут включать в себя хронический лимфоцитарный лейкоз, неходжкинскую лимфому, множественную миелому, макроглобулинемию Вальденстрема, миелодиспластический синдром, миелофиброз и эритролейкоз. Соответственно, в одном варианте осуществления в данном документе предусмотрен способ лечения приобретенной гемофилии у субъекта, включающий введение субъекту любой из композиций, предусмотренных в данном документе.

[0203] В другом варианте осуществления композиции, составы и способы, раскрываемые в данном документе, предназначены для лечения или предупреждения мышечных кровотечений. В другом варианте осуществления композиции, составы и способы, раскрываемые в данном документе, предназначены для лечения или предупреждения суставных кровотечений. В другом варианте осуществления композиции, составы и способы, раскрываемые в данном документе, обеспечивают терапевтическое или

профилактическое лечение носового кровотечения и десневого кровотечения, кровотечения из слизистой оболочки, кровотечения в центральной нервной системе. В другом варианте осуществления композиции, составы и способы, раскрываемые в данном документе, обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение желудочно-кишечного или мозгового кровотечения. В другом варианте осуществления композиции, составы и способы, раскрываемые в данном документе, обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение редко встречающихся легких кровотечений. В другом варианте осуществления композиции, составы и способы, раскрываемые в данном документе, обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение редко встречающихся умеренных кровотечений. В другом варианте осуществления композиции, составы и способы, раскрываемые в данном документе, обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение часто встречающихся легких кровотечений. В другом варианте осуществления композиции, составы и способы, раскрываемые в данном документе, обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение часто встречающихся умеренных кровотечений.

[0204] В одном варианте осуществления композиции, составы и способы, раскрываемые в данном документе, обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение бессимптомной гемофилии. В другом варианте осуществления композиции, составы и способы, раскрываемые в данном документе, обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение гемофилии от легкой до умеренной. В другом варианте осуществления композиции, составы и способы, раскрываемые в данном документе, обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение тяжелой гемофилии.

[0205] В одном варианте осуществления композиции, составы и способы, раскрываемые в данном документе, обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение кровоизлияния, которое в одном варианте осуществления представляет собой неконтролируемое кровоизлияние, а в другом варианте осуществления – внутримозговое кровоизлияние. В другом варианте осуществления композиции, составы и способы, раскрываемые в

данном документе, обеспечивают терапевтическое или профилактическое лечение в случае форм неонатальной коагулопатии; тяжелого заболевания печени; хирургических процедур с высоким уровнем риска; травматической потери крови; трансплантации костного мозга; форм тромбоцитопении и нарушений функции тромбоцитов; экстренной отмены приема пероральных антикоагулянтов; врожденных дефицитов факторов свертывания крови V, VII, X и XI или болезни фон Виллебранда, в одном варианте осуществления болезни фон Виллебранда с ингибиторами фактора фон Виллебранда.

[0206] В одном варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови, раскрываемый в данном документе, предназначен для лечения гемофилии или сопутствующего заболевания, описываемого в данном документе, у субъекта. В одном варианте осуществления субъектом является человек. В другом варианте осуществления субъектом является человеческий ребенок. В другом варианте осуществления субъектом является одомашненное животное. В другом варианте осуществления субъектом является млекопитающее. В другом варианте осуществления субъектом является сельскохозяйственное животное. В другом варианте осуществления субъектом является обезьяна. В другом варианте осуществления субъектом является лошадь. В другом варианте осуществления субъектом является корова. В другом варианте осуществления субъектом является мышь. В другом варианте осуществления субъектом является крыса. В другом варианте осуществления субъектом является представитель псовых. В другом варианте осуществления субъектом является представитель кошачьих. В другом варианте осуществления субъектом является представитель быков, баранов, свиных, лошадиных, мышинных или оленьих. В одном варианте осуществления субъект имеет мужской пол. В другом варианте осуществления субъект имеет женский пол. В одном варианте осуществления субъектом является ребенок, в другом варианте осуществления подросток, в другом варианте осуществления взрослый или, в другом варианте осуществления, пожилой субъект. В другом варианте осуществления субъектом является педиатрический субъект, в другом варианте осуществления

– гериатрический субъект.

[0207] В другом варианте осуществления фразы «физиологически приемлемый носитель» и «фармацевтически приемлемый носитель» используются взаимозаменяемо в отношении носителя или разбавителя, который не вызывает в организме значительное раздражение и не подавляет биологическую активность и свойства вводимого соединения. В объем этих фраз включено вспомогательное средство. В одном варианте осуществления один из ингредиентов, включенных в фармацевтически приемлемый носитель, может представлять собой, например, полиэтиленгликоль (PEG), биосовместимый полимер с широким диапазоном растворимости как в органических, так и в водных средах.

[0208] В другом варианте осуществления «наполнитель» относится к инертному веществу, добавляемому в фармацевтическую композицию для дополнительного облегчения введения активного ингредиента. В одном варианте осуществления наполнители включают в себя карбонат кальция, фосфат кальция, различные сахара и типы крахмала, производные целлюлозы, желатин, растительные масла и полиэтиленгликоли.

[0209] Методики составления и введения лекарственных средств находятся в последнем издании «Remington's Pharmaceutical Sciences», Mack Publishing Co., Easton, PA, который включен в данный документ посредством ссылки.

[0210] В настоящем изобретении рассматриваются различные варианты осуществления диапазонов доз. Доза сконструированного фактора свертывания крови, раскрываемого в данном документе, в одном варианте осуществления находится в диапазоне 0,005–100 мг/день. В другом варианте осуществления доза находится в диапазоне 0,005–5 мг/день. В другом варианте осуществления доза находится в диапазоне 0,01–50 мг/день. В другом варианте осуществления доза находится в диапазоне 0,1–20 мг/день. В другом варианте осуществления доза находится в диапазоне 0,1–10 мг/день. В другом варианте осуществления доза находится в диапазоне 0,01–5 мг/день. В другом варианте осуществления доза находится в диапазоне 0,001–0,01 мг/день. В другом варианте осуществления доза находится в диапазоне 0,001–0,1 мг/день. В

мг/день. В одном варианте осуществления доза составляет 0,01 мг/день. В другом варианте осуществления доза составляет 0,1 мг/день. В другом варианте осуществления доза составляет 1 мг/день. В другом варианте осуществления доза составляет 0,530 мг/день. В другом варианте осуществления доза составляет 0,05 мг/день. В другом варианте осуществления доза составляет 50 мг/день. В другом варианте осуществления доза составляет 10 мг/день. В другом варианте осуществления доза составляет 20–70 мг/день. В другом варианте осуществления доза составляет 5 мг/день.

[0213] В одном варианте осуществления доза СТР-модифицированного фактора свертывания крови составляет 1–5 мг/день. В одном варианте осуществления доза СТР-модифицированного фактора свертывания крови составляет 1–3 мг/день. В другом варианте осуществления доза СТР-модифицированного фактора свертывания крови составляет 2 мг/день.

[0214] В другом варианте осуществления доза составляет 1–90 мг/день. В другом варианте осуществления доза составляет 1–90 мг/2 дня. В другом варианте осуществления доза составляет 1–90 мг/3 дня. В другом варианте осуществления доза составляет 1–90 мг/4 дня. В другом варианте осуществления доза составляет 1–90 мг/5 дней. В другом варианте осуществления доза составляет 1–90 мг/6 дней. В другом варианте осуществления доза составляет 1–90 мг/неделя. В другом варианте осуществления доза составляет 1–90 мг/9 дней. В другом варианте осуществления доза составляет 1–90 мг/11 дней. В другом варианте осуществления доза составляет 1–90 мг/14 дней.

[0215] В другом варианте осуществления доза фактора свертывания крови составляет 10–50 мг/день. В другом варианте осуществления доза составляет 10–50 мг/2 дня. В другом варианте осуществления доза составляет 10–50 мг/3 дня. В другом варианте осуществления доза составляет 10–50 мг/4 дня. В другом варианте осуществления доза составляет 10–50 миллиграммов (мг)/5 дней. В другом варианте осуществления доза составляет 10–50 мг/6 дня. В другом варианте осуществления доза составляет 10–50 мг/неделя. В

другом варианте осуществления доза составляет 10–50 мг/9 дней. В другом варианте осуществления доза составляет 10–50 мг/11 дней. В другом варианте осуществления доза составляет 10–50 мг/14 дней.

[0216] В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, составлен в виде лекарственной формы для интраназального введения. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, составлен в виде инъекционной лекарственной формы. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту в дозе в диапазоне от 0,0001 мг до 0,6 мг. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту в дозе в диапазоне от 0,001 мг до 0,005 мг. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту в дозе в диапазоне от 0,005 мг до 0,01 мг. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту в дозе в диапазоне от 0,01 мг до 0,3 мг. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту в дозе в диапазоне от 0,2 мг до 0,6 мг. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови не содержит СТР на своем аминоконце.

[0217] В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту в дозе в диапазоне 1–100 микрограммов. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту в дозе в диапазоне 10–80 микрограммов. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту в дозе в диапазоне 20–60 микрограммов. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей

мере одно звено СТР, вводят субъекту в дозе в диапазоне 10–50 микрограммов. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту в дозе в диапазоне 40–80 микрограммов. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту в дозе в диапазоне 10–30 микрограммов. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту в дозе в диапазоне 30–60 микрограммов.

[0218] В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту в дозе в диапазоне от 0,2 мг до 2 мг. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту в дозе в диапазоне от 2 мг до 6 мг. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту в дозе в диапазоне от 4 мг до 10 мг. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту в дозе в диапазоне от 5 мг до 15 мг.

[0219] В одном варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, вводят субъекту в дозе в диапазоне 10 мкг/кг – 1000 мкг/кг. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, вводят субъекту в дозе в диапазоне 25 мкг/кг – 600 мкг/кг. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, вводят субъекту в дозе в диапазоне 50 мкг/кг – 400 мкг/кг. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, вводят субъекту в дозе, составляющей приблизительно 25 мкг/кг. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, вводят субъекту в дозе, составляющей приблизительно 50 мкг/кг. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с

помощью СТР, вводят субъекту в дозе, составляющей приблизительно 100 мкг/кг. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, вводят субъекту в дозе, составляющей приблизительно 200 мкг/кг. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, вводят субъекту в дозе, составляющей приблизительно 300 мкг/кг. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, вводят субъекту в дозе, составляющей приблизительно 400 мкг/кг. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, вводят субъекту в дозе, составляющей приблизительно 500 мкг/кг. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, модифицированный с помощью СТР, вводят субъекту в дозе, составляющей приблизительно 600 мкг/кг.

[0220] В одном варианте осуществления доза СТР-модифицированного FVIIa содержит 50% от количества FVIIa, вводимого в составе рекомендованной дозы рекомбинантного FVIIa (например, NovoSeven®) пациентам в течение того же самого периода времени. В одном варианте осуществления доза СТР-модифицированного FVII содержит 50% количества FVII, вводимого в составе рекомендованной дозы рекомбинантного FVII пациентам в течение того же самого периода времени. Например, если NovoSeven® дают в дозе 90 мкг/кг один раз в два часа пациенту до или после операции (т. е. по 7,65 мг один раз в два часа или 45,9 мг в составе шести доз в течение 12-часового периода для пациента массой 85 кг), то СТР-модифицированный фактор свертывания крови, раскрываемый в данном документе, можно давать в дозе, составляющей 50% от 12-часовой дозы рекомбинантного FVIIa для пациента (т. е. в дозе 23 мг, даваемой один раз в течение 12-часового периода).

[0221] В другом варианте осуществления доза СТР-модифицированного фактора свертывания крови является такой, что она содержит 45% от количества фактора свертывания крови, вводимого при использовании фактора свертывания крови, не модифицированного с помощью СТР. В другом варианте осуществления доза СТР-модифицированного фактора свертывания крови является

такой, что она содержит 10% от количества фактора свертывания крови, вводимого при использовании фактора свертывания крови, не модифицированного с помощью СТР. В другом варианте осуществления доза СТР-модифицированного фактора свертывания крови является такой, что она содержит 25% от количества фактора свертывания крови, вводимого при использовании фактора свертывания крови, не модифицированного с помощью СТР. В другом варианте осуществления доза СТР-модифицированного фактора свертывания крови является такой, что она содержит 35% от количества фактора свертывания крови, вводимого при использовании фактора свертывания крови, не модифицированного с помощью СТР. В другом варианте осуществления доза СТР-модифицированного фактора свертывания крови является такой, что она содержит 75% от количества фактора свертывания крови, вводимого при использовании фактора свертывания крови, не модифицированного с помощью СТР. В другом варианте осуществления доза СТР-модифицированного фактора свертывания крови является такой, что она содержит 100% от количества фактора свертывания крови, вводимого при использовании фактора свертывания крови, не модифицированного с помощью СТР. Однако, даже если доза содержит такое же количество фактора свертывания крови (например, FIX), как и в случае с фактором свертывания крови, не модифицированным с помощью СТР, она по-прежнему является преимущественной для субъектов в том, что ее будут вводить с меньшей частотой ввиду ее увеличенного периода полувыведения по сравнению с рекомбинантными факторами свертывания крови.

[0222] В другом варианте осуществления терапевтически эффективное количество конъюгированного фактора свертывания крови составляет 10 μ мкг/кг – 500 μ мкг/кг для FVIIa. В другом варианте осуществления терапевтически эффективное количество конъюгированного фактора свертывания крови составляет 150–250 МЕ на кг массы тела при введении один раз в день. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая конъюгированный фактор свертывания крови, составлена при крепости, эффективной для введения пациенту-человеку различными способами.

[0223] В одном варианте осуществления СТР-модифицированный

фактор свертывания крови вводят субъекту еженедельно. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови вводят субъекту дважды в неделю. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови вводят субъекту один раз в две недели (каждые две недели). В другом варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови вводят субъекту дважды в месяц. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови вводят субъекту один раз в месяц. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови вводят субъекту ежедневно. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови вводят субъекту один раз в два дня.

[0224] В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту один раз в три дня. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту один раз в четыре дня. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту один раз в пять дней. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту один раз в шесть дней. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту один раз в 7-14 дней. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту один раз в 10-20 дней. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту один раз в 5-15 дней. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, вводят субъекту один раз в 15-30 дней.

[0225] В другом варианте осуществления способы согласно настоящему изобретению включают увеличение приверженности к

применению терапии факторами свертывания крови, включающее предоставление субъекту, нуждающемуся в этом, полипептида, содержащего фактор свертывания крови и по меньшей мере один карбоксиконцевой пептид (СТР) хорионического гонадотропина, присоединенный к карбоксильному концу фактора свертывания крови, за счет чего увеличивается приверженность к применению терапии факторами свертывания крови.

[0226] В другом варианте осуществления способы согласно настоящему изобретению включают увеличение приверженности к терапии у пациентов, страдающих хроническими заболеваниями, которые нуждаются в терапии факторами свертывания крови. В другом варианте осуществления способы согласно настоящему изобретению обеспечивают снижение частоты введения доз фактора свертывания крови посредством модификации фактора свертывания крови с помощью СТР, как описывается в данном документе выше.

[0227] В другом варианте осуществления термин «приверженность к терапии» включает соблюдение режима терапии. В другом варианте осуществления способы согласно настоящему изобретению включают увеличение приверженности к терапии у пациентов, нуждающихся в терапии факторами свертывания крови, посредством снижения частоты введения фактора свертывания крови. В другом варианте осуществления снижение частоты введения фактора свертывания крови достигается благодаря модификациям с помощью СТР, которые делают СТР-модифицированный фактор свертывания крови более стабильным. В другом варианте осуществления снижение частоты введения фактора свертывания крови достигается в результате увеличения $T_{1/2}$ фактора свертывания крови. В другом варианте осуществления снижение частоты введения фактора свертывания крови достигается в результате увеличения времени очищения или снижения скорости очищения от фактора свертывания крови.

[0228] В другом варианте осуществления снижение частоты введения фактора свертывания крови достигается в результате увеличения показателя AUC фактора свертывания крови.

[0229] В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрен способ снижения частоты введения доз фактора

свертывания крови, включающий стадию присоединения от одного до десяти СТР к карбоксильному концу фактора свертывания крови, за счет чего снижается частота введения доз фактора свертывания крови. В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрен способ снижения частоты введения доз фактора свертывания крови, включающий стадию присоединения от одного до пяти СТР к карбоксильному концу фактора свертывания крови, за счет чего снижается частота введения доз фактора свертывания крови. В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрен способ снижения частоты введения доз фактора свертывания крови, включающий стадию присоединения трех СТР к карбоксильному концу фактора свертывания крови, за счет чего снижается частота введения доз фактора свертывания крови. В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрен способ снижения частоты введения доз фактора свертывания крови, включающий стадию присоединения от трех до пяти СТР к карбоксильному концу фактора свертывания крови, за счет чего снижается частота введения доз фактора свертывания крови.

[0230] В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрен способ увеличения приверженности к применению терапии факторами свертывания крови, включающий предоставление субъекту, нуждающемуся в этом, полипептида, содержащего фактор свертывания крови и от одного до десяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, за счет чего увеличивается приверженность к применению терапии факторами свертывания крови. В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрен способ увеличения приверженности к применению терапии факторами свертывания крови, включающий предоставление субъекту, нуждающемуся в этом, полипептида, содержащего фактор свертывания крови и от одного до пяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, за счет чего увеличивается приверженность к применению терапии факторами свертывания крови. В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрен способ увеличения приверженности к

применению терапии факторами свертывания крови, включающий предоставление субъекту, нуждающемуся в этом, полипептида, содержащего фактор свертывания крови и три карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, за счет чего увеличивается приверженность к применению терапии факторами свертывания крови. В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрен способ увеличения приверженности к применению терапии факторами свертывания крови, включающий предоставление субъекту, нуждающемуся в этом, полипептида, содержащего фактор свертывания крови и от трех до пяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, за счет чего увеличивается приверженность к применению терапии факторами свертывания крови.

[0231] В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрен способ предупреждения или лечения нарушения свертывания крови или коагуляции у субъекта, включающий предоставление указанному субъекту полипептида, содержащего фактор свертывания крови и от одного до десяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, за счет чего обеспечивается лечение нарушения свертывания крови или коагуляции у указанного субъекта. В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрен способ предупреждения или лечения нарушения свертывания крови или коагуляции у субъекта, включающий предоставление субъекту, нуждающемуся в этом, полипептида, содержащего фактор свертывания крови и от одного до пяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, за счет чего обеспечивается предупреждение или лечение нарушения свертывания крови или коагуляции у указанного субъекта. В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрен способ предупреждения или лечения нарушения свертывания крови или коагуляции у субъекта, включающий предоставление субъекту,

нуждающемуся в этом, полипептида, содержащего фактор свертывания крови и три карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, за счет чего обеспечивается предупреждение или лечение нарушения свертывания крови или коагуляции у указанного субъекта.

[0232] В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрен способ предупреждения гемофилии у субъекта, включающий предоставление субъекту, нуждающемуся в этом, полипептида, содержащего фактор свертывания крови и три карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, за счет чего обеспечивается предупреждение гемофилии у указанного субъекта. В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрен способ предупреждения гемофилии у субъекта, включающий предоставление субъекту, нуждающемуся в этом, полипептида, содержащего фактор свертывания крови и от трех до пяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, за счет чего обеспечивается предупреждение гемофилии у указанного субъекта.

[0233] В другом варианте осуществления композиции, предусмотренные в данном документе, на удивление более эффективно всасываются в кровоток после SC введения (см. PCT/IL2016/050645, включенную в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Возможность подкожного введения FVIIa выступает в качестве преимущества, поскольку ее можно применять в профилактических путях применения. Подкожные инъекции также являются намного более простыми для пациентов при самоинъекции и являются преимущественными в тех случаях, когда пациенты являются очень молодыми, и их вены являются небольшими и сложными для обнаружения.

[0234] В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрен способ лечения гемофилии у субъекта, включающий предоставление указанному субъекту полипептида, содержащего фактор свертывания крови и от одного до десяти карбоксиконцевых

пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, за счет чего обеспечивается лечение гемофилии у указанного субъекта. В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрен способ лечения гемофилии у субъекта, включающий предоставление субъекту, нуждающемуся в этом, полипептида, содержащего фактор свертывания крови и от одного до пяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, за счет чего обеспечивается лечение гемофилии у указанного субъекта. В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрен способ лечения гемофилии у субъекта, включающий предоставление субъекту, нуждающемуся в этом, полипептида, содержащего фактор свертывания крови и три карбоксиконцевых пептида хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, за счет чего обеспечивается лечение гемофилии у указанного субъекта. В другом варианте осуществления в данном документе предусмотрен способ лечения гемофилии у субъекта, включающий предоставление субъекту, нуждающемуся в этом, полипептида, содержащего фактор свертывания крови и от трех до пяти карбоксиконцевых пептидов хорионического гонадотропина, присоединенных к карбоксильному концу фактора свертывания крови, за счет чего обеспечивается лечение гемофилии у указанного субъекта.

[0235] Пероральное введение в одном варианте осуществления предусматривает использование единичной лекарственной формы, включающей в себя таблетки, капсулы, пастилки, жевательные таблетки, суспензии, эмульсии и т. п. Такие единичные лекарственные формы содержат безопасное и эффективное количество желаемого фактора свертывания крови согласно настоящему изобретению, которое в каждом случае в одном варианте осуществления составляет от приблизительно 0,7 или 3,5 мг до приблизительно 280 мг/70 кг или в другом варианте осуществления от приблизительно 0,5 или 10 мг до приблизительно 210 мг/70 кг. Фармацевтически приемлемые носители, подходящие для получения единичных лекарственных форм для перорального введения, хорошо

известны из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления таблетки обычно содержат традиционные фармацевтически совместимые вспомогательные средства, как, например, инертные разбавители, такие как карбонат кальция, карбонат натрия, маннит, лактоза и целлюлоза; связующие вещества, такие как крахмал, желатин и сахароза; разрыхлители, такие как крахмал, альгиновая кислота и кроскармеллоза; смазывающие вещества, такие как стеарат магния, стеариновая кислота и тальк. В одном варианте осуществления можно использовать вещества, способствующие скольжению, такие как диоксид кремния, для улучшения характеристик текучести порошкообразной смеси. В одном варианте осуществления можно добавлять красящие средства, такие как красители FD&C, для придания эстетичного внешнего вида. Подсластители и вкусоароматические добавки, такие как аспартам, сахарин, ментоловые ароматизаторы, ароматизаторы с привкусом мяты перечной и фруктовые ароматизаторы, являются применимыми вспомогательными средствами для жевательных таблеток. Капсулы обычно содержат один или более твердых разбавителей, раскрываемых выше. В некоторых вариантах осуществления выбор компонентов носителей зависит от второстепенных учитываемых факторов, таких как вкус, стоимость и стабильность при хранении, которые не являются критически важными для целей настоящего изобретения, и может быть легко сделан специалистом в данной области.

[0236] В одном варианте осуществления лекарственная форма для перорального применения имеет предварительно определенный профиль высвобождения. В одном варианте осуществления лекарственная форма для перорального применения, раскрываемая в данном документе, включает в себя таблетки, капсулы, пастилки или жевательные таблетки с пролонгированным высвобождением. В одном варианте осуществления лекарственная форма для перорального применения, раскрываемая в данном документе, включает в себя таблетки, капсулы, пастилки или жевательные таблетки с замедленным высвобождением. В одном варианте осуществления лекарственная форма для перорального применения, раскрываемая в данном документе, включает в себя таблетки,

капсулы, пастилки или жевательные таблетки с немедленным высвобождением. В одном варианте осуществления лекарственная форма для перорального применения составлена в соответствии с желаемым профилем высвобождения фармацевтического активного ингредиента, известным специалисту в данной области.

[0237] В некоторых вариантах осуществления композиции для перорального применения включают в себя жидкие растворы, эмульсии, суспензии и т. п. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемые носители, подходящие для получения таких композиций, хорошо известны из уровня техники. В некоторых вариантах осуществления жидкие композиции для перорального применения содержат от приблизительно 0,001% до приблизительно 0,933% желаемых соединения или соединений или, в другом варианте осуществления, от приблизительно 0,01% до приблизительно 10%.

[0238] В некоторых вариантах осуществления композиции для применения в способах согласно настоящему изобретению включают в себя растворы или эмульсии, которые в некоторых вариантах осуществления представляют собой водные растворы или эмульсии, содержащие безопасное и эффективное количество соединений, раскрываемых в данном документе, и необязательно других соединений, предназначенных для местного интраназального введения. В некоторых вариантах осуществления композиции содержат от приблизительно 0,001% до приблизительно 10,0% вес/об. рассматриваемого соединения, более предпочтительно от приблизительно 0,01% до приблизительно 2,0, что используется для системной доставки соединений посредством интраназального пути.

[0239] В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, инъецируют в мышцу (внутримышечная инъекция). В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, инъецируют под кожу (подкожная инъекция). В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, инъецируют в мышцу. В другом варианте осуществления полипептид, содержащий фактор свертывания крови и по меньшей мере одно звено СТР, инъецируют в кожу. В другом

варианте осуществления фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, вводят посредством системного введения. В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, вводят путем внутривенной инъекции. В другом варианте осуществления введение может представлять собой парентеральную, внутрилегочную, пероральную, местную, внутрикожную, внутримышечную, внутрибрюшинную, внутривенную, подкожную, интраназальную, трансназальную, внутриглазную, офтальмическую, эпидуральную, трансбуккальную, ректальную, чресслизистую, внутрикишечную или парентеральную доставку, в том числе интрамедуллярные инъекции, а также интратекальное или прямое внутрижелудочковое введение.

[0240] В другом варианте осуществления препарат вводят локально, а не системно, например, путем прямой инъекции препарата в конкретную область тела пациента.

[0241] В одном варианте осуществления путь введения может быть энтеральным. В другом варианте осуществления путь может быть конъюнктивальным, чрескожным, внутрикожным, внутриартериальным, вагинальным, ректальным, внутриопухолевым, парасакральным, чресслизистым, внутримышечным, внутрисосудистым, внутрижелудочковым, внутричерепным, интраназальным, сублингвальным или их комбинацией.

[0242] В другом варианте осуществления фармацевтические композиции и фармацевтические составы вводят путем внутривенной, внутриартериальной или внутримышечной инъекции жидкого препарата. В некоторых вариантах осуществления жидкие составы включают в себя растворы, суспензии, дисперсии, эмульсии, масла и т. п. В одном варианте осуществления фармацевтические композиции и фармацевтические составы вводят внутривенно, и поэтому они составлены в форме, подходящей для внутривенного введения. В другом варианте осуществления фармацевтические композиции и фармацевтические составы вводят внутриартериально, и поэтому они составлены в форме, подходящей для внутриартериального введения. В другом варианте осуществления фармацевтические композиции и фармацевтические составы вводят внутримышечно, и поэтому они составлены в форме, подходящей для

внутримышечного введения.

[0243] Кроме того, в другом варианте осуществления фармацевтические композиции и фармацевтические составы вводят местным путем на поверхности тела, и поэтому они составлены в форме, подходящей для местного введения. Подходящие составы для местного применения включают в себя гели, мази, кремы, лосьоны, капли и т. п. Для местного введения соединения, раскрываемые в данном документе, объединяют с дополнительными соответствующими терапевтическими средством или средствами, получаемыми и применяемыми в качестве растворов, суспензий или эмульсий в физиологически приемлемом разбавителе с фармацевтическим носителем или без него.

[0244] В одном варианте осуществления фармацевтические композиции и фармацевтические составы, раскрываемые в данном документе, получают с помощью процессов, хорошо известных из уровня техники, например, посредством традиционных процессов смешивания, растворения, грануляции, дражирования, растирания в порошок во влажном состоянии, эмульгирования, инкапсулирования, улавливания или лиофилизации.

[0245] В одном варианте осуществления фармацевтические композиции и фармацевтические составы для применения в соответствии с настоящим изобретением составляют традиционным способом с использованием одного или более физиологически приемлемых носителей, включающих в себя наполнители и вспомогательные вещества, которые облегчают обработку активных ингредиентов с получением препаратов, которые можно применять в фармацевтике. В одном варианте осуществления составление зависит от выбранного пути введения.

[0246] В одном варианте осуществления инъекционные препараты согласно настоящему изобретению составлены в виде водных растворов. В одном варианте осуществления инъекционные препараты согласно настоящему изобретению составлены в виде физиологически совместимых буферов, таких как раствор Хенкса, раствор Рингера или буферный физиологический солевой раствор. В некоторых вариантах осуществления для чресслизистого введения в составе используются вещества, обеспечивающие проникновение,

соответствующие барьеру, через который нужно проникнуть. Такие вещества, обеспечивающие проникновение, являются общеизвестными из уровня техники.

[0247] В одном варианте осуществления препараты, описываемые в данном документе, составлены для парентерального введения, например, путем болюсной инъекции или непрерывной инфузии. В некоторых вариантах осуществления составы для инъекции представлены в виде единичной лекарственной формы, например, в ампулах или в многодозовых контейнерах, необязательно с добавлением консерванта. В некоторых вариантах осуществления композиции представляют собой суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных инертных средах и содержат вспомогательные вещества для состава, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства.

[0248] В некоторых вариантах осуществления композиции также содержат консерванты, такие как хлорид бензалкония и тимеросал и т. п.; хелатообразователи, такие как эдетат натрия и другие; буферы, такие как фосфат, цитрат и ацетат; средства, регулирующие тоничность, такие как хлорид натрия, хлорид калия, глицерин, маннит и другие; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, ацетилцистеин, метабисульфит натрия и другие; ароматизирующие средства; регуляторы вязкости, такие как полимеры, в том числе целлюлоза и ее производные и поливиниловый спирт; а также кислоты и основания для регуляции pH этих водных композиций в соответствии с необходимостью. В некоторых вариантах осуществления композиции также содержат анестезирующие средства местного действия или другие активные вещества. Композиции можно применять в виде спреев, туманообразных аэрозолей, капель и т. п.

[0249] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции и фармацевтические составы для парентерального введения содержат водные растворы активного препарата в водорастворимой форме. В дополнение, суспензии активных ингредиентов в некоторых вариантах осуществления получают в виде соответствующих масляных или водных инъекционных суспензий. Подходящие липофильные растворители или инертные среды в

некоторых вариантах осуществления включают в себя жирные масла, такие как кунжутное масло, или синтетические сложные эфиры жирных кислот, такие как этилолеат, триглицериды или липосомы. Водные инъекционные суспензии в некоторых вариантах осуществления содержат вещества, которые увеличивают вязкость суспензии, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлоза, сорбит или декстран. В другом варианте осуществления суспензия также содержит подходящие стабилизаторы или средства, увеличивающие растворимость активных ингредиентов, для обеспечения возможности получения высококонцентрированных растворов.

[0250] В другом варианте осуществления активное соединение может доставляться в везикуле, в частности, в липосоме (см. Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat et al., в *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, там же, pp. 317-327; J. E. Diederichs and al., *Pharm./nd.* 56 (1994) 267-275).

[0251] В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, доставляемая в системе с контролируемым высвобождением, составлена для внутривенной инфузии, введения с помощью имплантируемого осмотического насоса, трансдермального пластыря, липосом или других способов введения. В одном варианте осуществления используется насос (см. Langer, выше; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989). В другом варианте осуществления можно использовать полимерные материалы. В еще одном варианте осуществления система с контролируемым высвобождением может быть размещена рядом с терапевтической мишенью, т. е. головным мозгом, ввиду чего необходимой является лишь некоторая доля системной дозы (см., например, Goodson, в *Medical Applications of Controlled Release*, выше, vol. 2, pp. 115-138 (1984). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзорной статье Langer (*Science* 249:1527-1533 (1990)).

[0252] В некоторых вариантах осуществления активный ингредиент находится в порошкообразной форме, подлежащей

разбавлению подходящей инертной средой, например, стерильным апиrogenным водным раствором, перед применением. В некоторых вариантах осуществления композиции составлены для тонкого распыления и введения путем ингаляции. В другом варианте осуществления композиции содержатся в контейнере с прикрепленным к нему устройством для тонкого распыления.

[0253] В одном варианте осуществления препарат, раскрываемый в данном документе, составлен в виде композиций для ректального применения, таких как суппозитории или удерживающие клизмы, с использованием, например, традиционных суппозиторных основ, таких как масло какао или другие глицериды.

[0254] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции и фармацевтические составы, подходящие для применения в контексте, раскрываемом в данном документе, включают в себя композиции, в которых активные ингредиенты содержатся в количестве, эффективном для достижения намеченной цели. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество означает количество активных ингредиентов, которое является эффективным для предупреждения, облегчения или уменьшения интенсивности симптомов заболевания или продления выживаемости субъекта, получающего лечение.

[0255] В одном варианте осуществления определение терапевтически эффективного количества вполне находится в пределах профессиональной квалификации специалистов в данной области.

[0256] Некоторыми примерами веществ, которые могут выступать в качестве фармацевтически приемлемых носителей или их компонентов, являются сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; целлюлоза и ее производные, такие как натрий-карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и метилцеллюлоза; порошкообразный трагакант; солод; желатин; тальк; твердые смазывающие вещества, такие как стеариновая кислота и стеарат магния; сульфат кальция; растительные масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и масло какао; полиолы, такие как

пропиленгликоль, глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; альгиновая кислота; эмульгаторы, такие как эмульгаторы марки Tween™; смачивающие средства, такие как лаурилсульфат натрия; красящие средства; вкусоароматические добавки; средства для таблетирования, стабилизаторы; антиоксиданты; консерванты; апирогенная вода; изотонический солевой раствор и фосфатные буферные растворы. Выбор фармацевтически приемлемого носителя для применения в сочетании с соединением определяется главным образом путем, которым надлежит вводить соединение. Если рассматриваемое соединение подлежит инъекции, то фармацевтически приемлемый носитель в одном варианте осуществления представляет собой стерильный физиологический раствор, содержащий суспендирующее средство, совместимое с кровью, pH которого был доведен до приблизительно 7,4.

[0257] Кроме того, композиции дополнительно содержат связующие вещества (например, аравийскую камедь, кукурузный крахмал, желатин, карбомер, этилцеллюлозу, гуаровую камедь, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, повидон), разрыхлители (например, кукурузный крахмал, картофельный крахмал, альгиновую кислоту, диоксид кремния, кроскармеллозу натрия, кросповидон, гуаровую камедь, крахмалгликолят натрия), буферы (например, трис-HCl, ацетатный, фосфатный) с различными значениями pH и ионной силы, добавки, такие как альбумин или желатин, для предотвращения адсорбции на поверхностях, детергенты (например, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, соли желчных кислот), ингибиторы протеаз, поверхностно-активные вещества (например, лаурилсульфат натрия), усилители проницаемости, солюбилизующие средства (например, глицерин, полиэтиленгликоль), антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту, метабисульфит натрия, бутилированный гидроксианизол), стабилизаторы (например, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу), средства, увеличивающие вязкость (например, карбомер, коллоидный диоксид кремния, этилцеллюлозу, гуаровую камедь), подсластители (например, аспартам, лимонную кислоту), консерванты (например, тимеросал, бензиловый спирт, парабены), смазывающие вещества (например, стеариновую кислоту,

стеарат магния, полиэтиленгликоль, лаурилсульфат натрия), средства для повышения текучести (например, коллоидный диоксид кремния), пластификаторы (например, диэтилфталат, триэтилцитрат), эмульгаторы (например, карбомер, гидроксипропилцеллюлозу, лаурилсульфат натрия), полимерные покрытия (например, полуксамеры или полуксамины), покрывающие и пленкообразующие средства (например, этилцеллюлозу, акрилаты, полиметакрилаты) и/или вспомогательные средства.

[0258] Типичные компоненты носителей в сиропах, эликсирах, эмульсиях и суспензиях включают в себя этанол, глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, жидкую сахарозу, сорбит и воду. В суспензиях типичные суспендирующие средства включают в себя метилцеллюлозу, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, целлюлозу (например, Avicel™, RC-591), трагакант и альгинат натрия; типичные смачивающие средства включают в себя лецитин и полиоксиэтиленсорбитан (например, полисорбат 80). Типичные консерванты включают в себя метилпарабен и бензоат натрия. В другом варианте осуществления жидкие композиции для перорального применения также содержат один или более компонентов, таких как подсластители, вкусоароматические добавки и красители, раскрываемые выше.

[0259] Композиции также предусматривают включение активного материала в препараты или в состав препаратов полимерных соединений, таких как полимолочная кислота, полигликолевая кислота, гидрогели и т. д., в форме частиц или в липосомы, микроэмульсии, мицеллы, однослойные или многослойные везикулы, «тени» эритроцитов или сферопласты. Такие композиции будут влиять на физическое состояние, растворимость, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость очищения *in vivo*.

[0260] Настоящим изобретением также охватываются композиции в форме частиц, покрытые полимерами (например, полуксамерами или полуксаминами), и соединение, связанное с антителами, направленными на тканеспецифические рецепторы, лиганды или антигены, или связанное с тканеспецифическими рецепторами.

[0261] В некоторых вариантах осуществления соединения модифицированы путем ковалентного присоединения водорастворимых

полимеров, таких как полиэтиленгликоль, сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, карбоксиметилцеллюлоза, декстран, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон или полипролин. В другом варианте осуществления модифицированные соединения демонстрируют существенно более длительные периоды полувыведения из крови после внутривенной инъекции, чем соответствующие немодифицированные соединения. В одном варианте осуществления модификации также обеспечивают увеличение растворимости соединения в водном растворе, устранение агрегации, повышение физической и химической стабильности соединения и значительное снижение иммуногенности и реакционной способности соединения. В другом варианте осуществления желаемая биологическая активность *in vivo* достигается при введении таких аддуктов полимер-соединение с меньшей частотой или в более низких дозах, чем в случае с немодифицированным соединением.

[0262] В некоторых вариантах осуществления получение эффективных количества или дозы можно вначале рассчитать в анализах *in vitro*. В одном варианте осуществления доза может быть составлена в животных моделях, и такую информацию можно использовать для более точного определения применимых доз для людей.

[0263] В одном варианте осуществления токсичность и терапевтическую эффективность активных ингредиентов, описываемых в данном документе, можно определить с помощью стандартных фармацевтических процедур *in vitro*, в культурах клеток или у экспериментальных животных. В одном варианте осуществления данные, полученные в этих анализах *in vitro* и в культурах клеток и в исследованиях на животных, можно использовать при составлении диапазона доз для применения у людей. В одном варианте осуществления дозы варьируются в зависимости от используемой лекарственной формы и используемого пути введения. В одном варианте осуществления точные состав, путь введения и доза могут быть выбраны лечащим врачом с учетом состояния пациента. [См., например, Fingl, et al., (1975) «The Pharmacological Basis of Therapeutics», Ch. 1 p.1].

[0264] В одном варианте осуществления в зависимости от

тяжести и восприимчивости состояния, подлежащего лечению, введение доз может состоять из одного или множества введений, при этом курс лечения продолжается в течение периода от нескольких дней до нескольких недель или до наступления излечения или достижения ослабления болезненного состояния.

[0265] В одном варианте осуществления количество композиции, которое должно быть введено, будет, разумеется, зависеть от субъекта, получающего лечение, тяжести поражения, способа введения, мнения врача, назначающего лечение, и т. д.

[0266] В одном варианте осуществления композиции, содержащие препарат, раскрываемый в данном документе, составленный в совместимом фармацевтическом носителе, также получают, помещают в соответствующий контейнер и маркируют как предназначенные для лечения указанного состояния.

[0267] В другом варианте осуществления фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, представляет собой лиофилизированный (т. е. высушенный сублимацией) препарат в комбинации со сложными органическими наполнителями и стабилизаторами, такими как неионогенные поверхностно-активные средства (т. е. поверхностно-активные вещества), различные сахара, органические полиолы и/или человеческий сывороточный альбумин. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит описываемый лиофилизированный фактор свертывания крови в стерильной воде для инъекций. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит описываемый лиофилизированный фактор свертывания крови в стерильном PBS для инъекций. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит описываемый лиофилизированный фактор свертывания крови в стерильном 0,9% NaCl для инъекций.

[0268] В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, и сложные носители, такие как человеческий сывороточный альбумин, полиолы, сахара и анионные поверхностно-активные стабилизаторы. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит фактор свертывания крови,

описываемый в данном документе, а также лактобионовую кислоту и ацетатный/глициновый буфер. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, и аминокислоты, такие как аргинин или глутамат, которые увеличивают растворимость композиций на основе интерферона в воде. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит лиофилизированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, а также глицин или человеческий сывороточный альбумин (HSA), буфер (например, ацетатный) и изотоническое средство (например, NaCl). В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит лиофилизированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, а также фосфатный буфер, глицин и HSA.

[0269] В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, является стабилизированной при помещении в забуференные растворы, имеющие pH, составляющий от приблизительно 4 до 7,2. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, находится в забуференном растворе, имеющем pH, составляющий от приблизительно 4 до 8,5. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, находится в забуференном растворе, имеющем pH, составляющий от приблизительно 6 до 7. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, находится в забуференном растворе, имеющем pH, составляющий приблизительно 6,5. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, находится в забуференном растворе, имеющем pH, составляющий приблизительно 6,4. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, является стабилизированной при использовании аминокислоты в качестве стабилизатора и в некоторых случаях соли (если аминокислота не содержит заряженную боковую цепь).

[0270] В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, представляет собой жидкую композицию, содержащую стабилизатор в количестве от приблизительно 0,3% до 5% по весу, который является аминокислотой.

[0271] В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, обеспечивает точность дозирования и безопасность продукта. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, предусматривает биологически активный, стабильный жидкий состав для применения в инъекционных путях применения. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит нелиофилизированный фактор свертывания крови, описываемый в данном документе.

[0272] В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, предусматривает жидкий состав, допускающий хранение в жидком состоянии в течение длительного периода времени, что облегчает хранение и транспортировку перед введением.

[0273] В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, содержит твердые липиды в качестве материала матрицы. В другом варианте осуществления инъекционная фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, содержит твердые липиды в качестве материала матрицы. В другом варианте осуществления представлено получение липидных микрочастиц путем распылительного отверждения, описанного Speiser (Speiser and al., Pharm. Res. 8 (1991) 47-54), а затем получение липидных нанопеллет для перорального введения (Speiser EP 0167825 (1990)). В другом варианте осуществления используемые липиды (например, глицериды, образованные жирными кислотами, которые присутствуют в эмульсиях для парентерального питания) хорошо

переносятся организмом.

[0274] В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, содержит полимерные микрочастицы. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, содержит наночастицы. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, содержит липосомы. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, содержит липидную эмульсию. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, содержит микросферы. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, содержит липидные наночастицы. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, содержит липидные наночастицы, содержащие амфифильные липиды. В другом варианте осуществления фармацевтическая композиция, содержащая фактор свертывания крови, описываемый в данном документе, содержит липидные наночастицы, содержащие лекарственное средство, липидную матрицу и поверхностно-активное вещество. В другом варианте осуществления липидная матрица имеет содержание моноглицеридов, составляющее по меньшей мере 50% вес/вес.

[0275] В одном варианте осуществления композиции, раскрываемые в данном документе, представлены в упаковке или дозирующем устройстве, таком как набор, утвержденный FDA, который содержит одну или более единичных лекарственных форм, содержащих активный ингредиент. В одном варианте осуществления упаковка, например, содержит металлическую или пластиковую фольгу, как, например, блистерная упаковка. В одном варианте осуществления к упаковке или дозирующему устройству прилагаются

инструкции по введению. В одном варианте осуществления упаковка или дозатор снабжены уведомлением, предоставляемым вместе с контейнером, в форме, установленной государственным органом, регулирующим производство, использование или реализацию фармацевтических препаратов, при этом данное уведомление отражает одобрение органом формы композиции или ее введения в медицине или в ветеринарии. Такое уведомление в одном варианте осуществления представляет собой этикетку, утвержденную Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств США для рецептурных лекарственных средств, или утвержденный листок-вкладыш.

[0276] В одном варианте осуществления будет понятно, что факторы свертывания крови, раскрываемые в данном документе, можно предоставлять индивидууму вместе с дополнительными активными средствами для достижения улучшенного терапевтического эффекта по сравнению с лечением каждым из средств по отдельности. В другом варианте осуществления предпринимают определенные меры (например, дозирование и выбор дополняющего средства) во избежание нежелательных побочных явлений, связанных с видами комбинированной терапии.

Получение

[0277] В одном варианте осуществления раскрывается способ получения полипептида, являющегося фактором свертывания крови VIIa, модифицированным СТР-пептидом хорионического гонадотропина человека, при этом способ включает стадии: (a) стабильной трансфекции предварительно определенного количества клеток вектором экспрессии, содержащим кодирующую часть, кодирующую указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII, где указанная трансфицированная клетка экспрессирует и необязательно секретирует указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII; (b) получения клонов клеток, сверхэкспрессирующих указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII; (c) размножения указанных клонов в растворе до предварительно определенного масштаба; (d) сбора указанного раствора, содержащего указанные клоны; (e) фильтрации указанного раствора, содержащего указанные клоны, с получением осветленного

собранного раствора; и (f) очистки и активации указанного осветленного собранного раствора с получением очищенного раствора белка, имеющего желаемую концентрацию СТР-модифицированного фактора свертывания крови VIIa, с получением таким образом полипептида, являющегося фактором свертывания крови VIIa, модифицированным СТР-пептидом хорионического гонадотропина человека. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII секретируется. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII не секретируется. При получении СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII трансфекция является ранней стадией. После отбора конечного клона с высоким уровнем экспрессии каждая процедура получения включает размораживание главного банка клеток (МСВ), размножение, сбор материала и очистку. (См. пример 3, стадии 1-5, описывающие процессы от размножения клонов до сбора материала; стадии 6-14, описывающие очистку и активацию). В одном варианте осуществления раскрывается способ получения полипептида, являющегося активным фактором свертывания крови VII (FVIIa) человека, модифицированным карбоксиконцевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина человека, где указанный полипептид содержит три молекулы СТР, присоединенные последовательно одна за другой к С-концу FVII, при этом способ включает стадии: стабильной трансфекции предварительно определенного количества клеток вектором экспрессии, содержащим кодирующую часть, кодирующую указанный СТР-модифицированный FVII, где указанные трансфицированные клетки экспрессируют и секретируют указанный СТР-модифицированный FVII; получения клонов клеток, сверхэкспрессирующих указанный СТР-модифицированный FVII; размножения указанных клонов в растворе до предварительно определенного масштаба; сбора указанного раствора, содержащего указанные клоны; фильтрации указанного раствора, содержащего указанные клоны, с получением осветленного собранного раствора, содержащего указанный СТР-модифицированный FVII; и очистки и активации СТР-модифицированного FVII из указанного осветленного собранного раствора с получением очищенного раствора белка,

имеющего желаемую концентрацию СТР-модифицированного FVIIa; где указанный получаемый СТР-модифицированный FVIIa предусматривает по меньшей мере одно из следующего:

- a. низкого содержания окисленной формы;
- b. высокого процентного содержания карбоксилированных остатков глутаминовой кислоты;
- c. по меньшей мере 60% заряженных N-гликанов или
- d. удельной активности, составляющей по меньшей мере 10500 ед./мг;

с получением таким образом СТР-модифицированного FVIIa, и где аминокислотная последовательность получаемого СТР-модифицированного FVIIa приведена под SEQ ID NO: 7.

[0278] В одном варианте осуществления полинуклеотиды, раскрываемые в данном документе, вставлены в векторы экспрессии (т. е. конструкцию нуклеиновой кислоты) для обеспечения экспрессии рекомбинантного полипептида. В одном варианте осуществления вектор экспрессии, раскрываемый в данном документе, содержит дополнительные последовательности, которые делают этот вектор подходящим для репликации и интеграции у прокариот. В одном варианте осуществления вектор экспрессии, раскрываемый в данном документе, содержит дополнительные последовательности, которые делают этот вектор подходящим для репликации и интеграции у эукариот. В одном варианте осуществления вектор экспрессии, раскрываемый в данном документе, включает в себя челночный вектор, что делает этот вектор подходящим для репликации и интеграции как у прокариот, так и у эукариот. В некоторых вариантах осуществления клонирующие векторы содержат последовательности инициации транскрипции и трансляции (например, промоторы, энхансеры) и терминаторы транскрипции и трансляции (например, сигналы полиаденилирования).

[0279] В одном варианте осуществления способ получения полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVIIa, включает стадию, включающую использование вектора экспрессии, где указанный вектор экспрессии содержит промотор, последовательность, кодирующую полипептид, являющийся СТР-

модифицированным FVII, и последовательность полиаденилирования. В другом варианте осуществления последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность полиаденилирования вируса обезьян (SV) 40.

[0280] В одном варианте осуществления для экспрессии полипептидов, раскрываемых в данном документе, можно использовать разнообразные прокариотические или эукариотические клетки в качестве клеток-хозяев в экспрессионных системах. В некоторых вариантах осуществления они включают без ограничения микроорганизмы, такие как бактерии, трансформированные рекомбинантным вектором экспрессии на основе ДНК бактериофага, плазмидной ДНК или космидной ДНК, содержащим последовательность, кодирующую полипептид; дрожжи, трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии у дрожжей, содержащими последовательность, кодирующую полипептид; растительные клеточные системы, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, на основе вируса мозаики цветной капусты CaMV; вируса табачной мозаики TMV) или трансформированные рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии, такими как Ti-плазида, содержащими последовательность, кодирующую полипептид.

[0281] В одном варианте осуществления для экспрессии полипептида, раскрываемого в данном документе, используются небактериальные экспрессионные системы (например, экспрессионные системы млекопитающих, такие как клетки CHO или клетки, полученные из клеток CHO). В одном варианте осуществления вектор экспрессии, используемый для экспрессии полинуклеотидов, раскрываемых в данном документе, в клетках млекопитающих, представляет собой вектор pCI-DHFR, содержащий промотор CMV и ген устойчивости к неомицину.

[0282] В одном варианте осуществления вектор экспрессии, раскрываемый в данном документе, может дополнительно содержать дополнительные полинуклеотидные последовательности, которые, например, обеспечивают возможность трансляции нескольких белков с одной мРНК, такие как участок внутренней посадки рибосомы (IRES), и последовательности для интеграции в геном промотора и

области, кодирующей химерный полипептид.

[0283] В некоторых вариантах осуществления векторы экспрессии у млекопитающих включают без ограничения pcDNA3, pcDNA3.1(+/-), pGL3, pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, pSinRep5, DH26S, DHBB, pNMT1, pNMT41, pNMT81, доступные от Invitrogen, pCI, доступный от Promega, pMbac, pPbac, pBK-RSV и pBK-CMV, доступные от Stratagene, pTRES, доступный от Clontech, и их производные.

[0284] В некоторых вариантах осуществления в способах, раскрываемых в данном документе, используются векторы экспрессии, содержащие регуляторные элементы из вирусов эукариот, таких как ретровирусы. Векторы на основе SV40 включают в себя pSVT7 и pMT2. В некоторых вариантах осуществления векторы, полученные из вируса папилломы крупного рогатого скота, включают в себя pBV-1MTNA, и векторы, полученные из вируса Эпштейна-Барр, включают в себя pHEBO и p205. Другие иллюстративные векторы включают в себя pMSG, pAV009/A⁺, pMT010/A⁺, pMAMneo-5, бакуловирусный вектор, pDSVE и любой другой вектор, обеспечивающий возможность экспрессии белков под управлением раннего промотора SV-40, позднего промотора SV-40, промотора гена металлотioneина, промотора вируса опухоли молочной железы мышей, промотора вируса саркомы Рауса, промотора гена полиэдрина или других промоторов, продемонстрировавших эффективность в отношении экспрессии в эукариотических клетках.

[0285] В одном варианте осуществления можно применять различные способы для введения вектора экспрессии, кодирующего СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII, раскрываемый в данном документе, в клетки. «Трансфекцию» эукариотических клеток-хозяев полинуклеотидом или вектором экспрессии с получением в результате генетически модифицированных клеток или трансгенных клеток можно выполнять с помощью любого способа, хорошо известного из уровня техники и описанного, например, в Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory, New York (1989, 1992), в Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Baltimore, Md. (1989), Chang et al., Somatic Gene Therapy,

CRC Press, Ann Arbor, Mich. (1995), Vega et al., Gene Targeting, CRC Press, Ann Arbor Mich. (1995), Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses, Butterworths, Boston Mass. (1988) и Gilboa et al. [Biotechniques 4 (6): 504-512, 1986], и она включает в себя, например, стабильную или транзистентную трансфекцию и электропорацию. Кроме того, см. патенты США №№ 5464764 и 5487992 в отношении способов позитивно-негативной селекции. Способы трансфекции дополнительно включают без ограничения трансфекцию, опосредованную липосомами, совместное осаждение фосфатом кальция, электропорацию, трансфекцию, опосредованную поликатионами (такими как DEAE-декстран), слияние протопластов, инфицирование вирусами (в том числе инфицирование рекомбинантными вирусами) и микроинъекцию. Трансфекция предпочтительно представляет собой стабильную трансфекцию. Преимущественным является способ трансфекции, который обеспечивает оптимальную частоту трансфекции и экспрессию гетерологичных генов, кодирующих пептид, представляющий интерес, раскрываемый в данном документе, в конкретных линии и типе клеток-хозяев. Подходящие способы можно определить с помощью обычных процедур. Для получения стабильных трансфектантов конструкции интегрируются в геном клетки-хозяина или искусственную хромосому/мини-хромосому либо располагаются эпизомно так, чтобы стабильно поддерживаться в клетке-хозяине.

[0286] При практическом осуществлении настоящего изобретения, раскрываемом в данном документе, будут использоваться, если не указано иное, традиционные методики клеточной биологии, молекулярной биологии, культивирования клеток, иммунологии и т. п., которые находятся в пределах квалификации специалиста в данной области. Эти методики в полном объеме раскрыты в современной литературе. См., например, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1987, обновленное издание); Brown ed., Essential Molecular Biology, IRL Press (1991); Goeddel ed., Gene Expression Technology, Academic Press (1991); Bothwell et al. eds., Methods

for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes, Bartlett Publ. (1990); Wu et al., eds., Recombinant DNA Methodology, Academic Press (1989); Kriegler, Gene Transfer and Expression, Stockton Press (1990); McPherson et al., PCR: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1991); Gait ed., Oligonucleotide Synthesis (1984); Miller & Calos eds., Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (1987); Butler ed., Mammalian Cell Biotechnology (1991); Pollard et al., eds., Animal Cell Culture, Humana Press (1990); Freshney et al., eds., Culture of Animal Cells, Alan R. Liss (1987); Studzinski, ed., Cell Growth and Apoptosis, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1995); Melamed et al., eds., Flow Cytometry and Sorting, Wiley-Liss (1990); Current Protocols in Cytometry, John Wiley & Sons, Inc. (обновленное издание); Wirth & Hauser, Genetic Engineering of Animals Cells, в: Biotechnology Vol. 2, Pühler ed., VCH, Weinheim 663-744; серию Methods of Enzymology (Academic Press, Inc.) и Harlow et al., eds., Antibodies: A Laboratory Manual (1987).

[0287] Гетерологичный ген, представляющий интерес, кодирующий СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII, может быть введен в клетку, раскрываемую в данном документе, с помощью различных способов, например, вирусной трансформации, трансфекции или микроинъекции. Гетерологичный ген, представляющий интерес, может быть введен в клетку в виде линейной ДНК или в качестве части вектора экспрессии. Известен ряд векторов экспрессии в эукариотических клетках, сайты множественного клонирования которых обеспечивают возможность вставки одного или более гетерологичных генов и их экспрессии. Коммерческие поставщики включают, среди прочих, такие компании, как Stratagene, Ла-Хойя, Калифорния, США; Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США; Promega, Мэдисон, Висконсин, США, или BD Biosciences Clontech, Пало-Альто, Калифорния, США. Трансфекцию клеток с помощью ДНК или вектора экспрессии, кодирующих один или более генов, представляющих интерес, осуществляют с помощью традиционных способов, описываемых, например, в Sambrook et al., 1989 или Ausubel et al., 1994. Подходящие способы трансфекции

включают, например, трансфекцию, опосредованную липосомами, совместное осаждение фосфатом кальция, электропорацию, трансфекцию, опосредованную поликатионами (например, DEAE-декстраном), слияние протопластов, микроинъекцию и инфицирование вирусами. Предпочтительно осуществляют стабильную трансфекцию, при которой молекулы ДНК интегрируются в геном клетки-хозяина или искусственную хромосому/мини-хромосому или содержатся эпизомно стабильным образом в клетке-хозяине. Предпочтительным является способ трансфекции, обеспечивающий оптимальную частоту трансфекции и экспрессию одного или более гетерологичных генов, представляющих интерес, в рассматриваемой клетке-хозяине.

[0288] В некоторых вариантах осуществления введение нуклеиновой кислоты посредством инфицирования вирусом характеризуется некоторыми преимуществами по сравнению с другими способами, такими как липофекция и электропорация, поскольку благодаря инфекционной природе вирусов можно достичь более высокой эффективности трансфекции.

[0289] В одном варианте осуществления будет понятно, что полипептиды, раскрываемые в данном документе, также могут экспрессироваться из конструкции нуклеиновой кислоты, вводимой индивидууму с использованием любого подходящего способа введения, описываемого в данном документе выше (например, генной терапии *in vivo*). В одном варианте осуществления конструкцию нуклеиновой кислоты вводят в подходящую клетку с помощью соответствующего средства/способа для доставки генов (трансфекции, трансдукции, гомологичной рекомбинации и т. д.) и экспрессионной системы в соответствии с необходимостью, и затем модифицированные клетки размножают в культуре и возвращают индивидууму (т. е. посредством генной терапии *ex vivo*).

[0290] Гетерологичный ген, представляющий интерес, обычно функционально связан с промотором, который обеспечивает транскрипцию гена, представляющего интерес, и с другими регуляторными элементами, обеспечивающими возможность транскрипции и трансляции (экспрессии) гена, представляющего интерес, или увеличивающие их эффективность.

[0291] Специалисту в данной области будет понятно, что

термин «промотор» может охватывать полинуклеотидную последовательность, которая обеспечивает и контролирует транскрипцию генов или последовательностей, функционально связанных с ней. Промотор содержит распознающие последовательности для связывания РНК-полимеразы и сайт для инициации транскрипции (сайт инициации транскрипции). Для целей экспрессии желаемой последовательности в определенном типе клеток или в клетке-хозяине следует выбрать подходящий функциональный промотор. Специалисту в данной области будут известны разнообразные промоторы из различных источников, в том числе конститутивные, индуцируемые и репресслируемые промоторы. Они депонированы в банках данных, таких как, например, GenBank, и могут быть получены в виде отдельных элементов или клонированных элементов в составе полинуклеотидных последовательностей из коммерческих или индивидуальных источников. У индуцируемых промоторов активность промотора может снижаться или увеличиваться в ответ на сигнал. Одним примером индуцируемого промотора является тетрациклин-чувствительный (tet) промотор. Он содержит последовательности тетрациклин-чувствительных операторов (tetO), которые могут индуцироваться трансактиваторным белком, регулируемым тетрациклином (tTA). В присутствии тетрациклина связывание tTA с tetO ингибируется. Примерами других индуцируемых промоторов являются промоторы генов *jun*, *fos*, металлотионеинов и белков теплового шока (см. также Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; Gossen, M. et al., *Curr Opin Biotech* 1994, 5, 516-520). Среди промоторов, особенно подходящих для высокого уровня экспрессии у эукариот, находятся, например, промотор гена убиквитина/S27a хомяка (WO 97/15664), ранний промотор SV40, главный поздний промотор аденовируса, промотор гена металлотионеина-1 мыши, область длинного концевой повтора вируса саркомы Рауса и ранний промотор цитомегаловируса человека. Примерами других гетерологичных промоторов млекопитающих являются промоторы генов актина, иммуноглобулинов или белков теплового шока.

[0292] Например, промотор может быть функционально связан с энхансерными последовательностями для целей увеличения транскрипционной активности. Для этого можно использовать один или более энхансеров и/или несколько копий энхансерной последовательности, например, энхансер CMV или SV40. Например, промотор может быть функционально связан с энхансерными последовательностями для целей увеличения транскрипционной активности. Для этого можно использовать один или более энхансеров и/или несколько копий энхансерной последовательности, например, энхансер CMV или SV40.

[0293] Специалисту в данной области будет понятно, что термин «энхансер» может охватывать полинуклеотидную последовательность, которая воздействует на активность промотора в цис-положении и таким образом стимулирует транскрипцию гена, функционально связанного с промотором. В отличие от промоторов, эффект энхансеров не зависит от положения и ориентации, и вследствие этого они могут располагаться впереди или позади транскрипционной единицы, в интроне или даже в кодирующей области. Энхансер может находиться как в непосредственной близости от транскрипционной единицы, так и на значительном расстоянии от промотора. Также возможно наличие физического и функционального перекрывания с промотором. Специалисту в данной области будет известен ряд энхансеров из различных источников (и депонированных в банках данных, таких как GenBank, например, энхансеры SV40, энхансеры CMV, энхансеры полиомавирусов, энхансеры аденовирусов), доступных в виде независимых элементов или клонированных элементов в составе полинуклеотидных последовательностей (например, депонированных в ATCC или доступных из коммерческих и индивидуальных источников). Ряд промоторных последовательностей также содержат энхансерные последовательности, как, например, часто используемый промотор CMV. Энхансер CMV человека является одним из наиболее сильных энхансеров, идентифицированных до настоящего времени. Одним примером индуцируемого энхансера является энхансер гена металлотioneина, который может стимулироваться глюкокортикоидами или тяжелыми металлами.

[0294] Говоря в целом, регуляторные элементы включают в себя промоторы, энхансеры, сигналы терминации и полиаденилирования и другие элементы, осуществляющие контроль экспрессии. Для различных типов клеток известны как индуцируемые, так и конститутивные регуляторные последовательности. «Элементы, регулирующие транскрипцию», как правило, включают в себя промотор выше последовательности гена, подлежащей экспрессии, сайты инициации и терминации транскрипции и сигнал полиаденилирования.

[0295] Специалисту в данной области будет понятно, что термин «сайт инициации транскрипции» может охватывать нуклеиновую кислоту в конструкции, которая соответствует первой нуклеиновой кислоте, включенной в состав первичного транскрипта, т. е. предшественника мРНК. Сайт инициации транскрипции может перекрываться с промоторными последовательностями.

[0296] Специалисту в данной области будет понятно, что термин «сайт терминации транскрипции» может охватывать нуклеотидную последовательность, обычно находящуюся на 3'-конце гена, представляющего интерес, или участка гена, который должен транскрибироваться, приводящую к терминации транскрипции под действием РНК-полимеразы.

[0297] Специалисту в данной области будет понятно, что термин «сигнал полиаденилирования» может охватывать сигнальную последовательность, которая обуславливает расщепление в конкретном сайте на 3'-конце эукариотической мРНК и посттранскрипционное включение последовательности из приблизительно 100–200 адениновых нуклеотидов (поли(А)-хвоста) на расщепленном 3'-конце. Сигнал полиаденилирования содержит последовательность ААТААА на приблизительно 10–30 нуклеотидов выше сайта расщепления, а также последовательность, расположенную ниже него. Известны различные элементы полиаденилирования, такие как поли(А) tk, ранний и поздний поли(А) SV40 или поли(А) BGH (описанные, например, в патенте США № 5122458).

[0298] «Элементы, регулирующие трансляцию» включают в себя сайт инициации трансляции (AUG), стоп-кодон и сигнал поли(А) для

каждого полипептида, который должен экспрессироваться. Для оптимальной экспрессии может быть целесообразным удаление, добавление или изменение 5'- и/или 3'-нетранслируемых областей последовательности нуклеиновой кислоты, которая должна экспрессироваться, с целью устранения любых потенциально неподходящих дополнительных кодонов инициации трансляции или других последовательностей, которые могут влиять на экспрессию на уровне транскрипции или экспрессии. Для целей стимуляции экспрессии непосредственно выше стартового кодона в качестве альтернативы могут быть вставлены консенсусные сайты связывания рибосомы. Для целей выработки секретируемого полипептида ген, представляющий интерес, обычно содержит сигнальную последовательность, которая кодирует сигнальный пептид предшественника, обеспечивающий транспорт синтезируемого полипептида к мембране ER и через нее. Сигнальная последовательность часто, но не всегда расположена на аминоконце секретируемого белка и отщепляется сигнальными пептидазами после фильтрации белка через мембрану ER. Последовательность гена обычно, но не обязательно будет содержать свою собственную сигнальную последовательность. Если нативная сигнальная последовательность отсутствует, то может быть введена гетерологичная сигнальная последовательность известным способом. Многочисленные сигнальные последовательности подобного рода известны специалисту в данной области и депонированы в банках данных последовательностей, таких как GenBank и EMBL.

[0299] Специалисту в данной области будет понятно, что термины «полипептиды», «полипептид» или их грамматические эквиваленты могут использоваться взаимозаменяемо для охвата аминокислотных последовательностей или белков и могут охватывать полимеры из аминокислот любой длины. Данный термин также включает белки, которые были подвергнуты посттрансляционным модификациям посредством таких реакций, как гликозилирование, фосфорилирование, ацетилирование или процессинг белков. Структура полипептида может быть модифицирована, например, посредством замен, делеций или вставок аминокислот и слияния с другими белками с сохранением при этом его биологической

активности.

[0300] С целью получения одного или более продуктов генов, представляющих интерес, в клетках клетки можно выращивать в бессывороточной культуральной среде и в суспензионной культуре в условиях, обеспечивающих возможность экспрессии гена, представляющего интерес. Если, например, ген, представляющий интерес, находится под контролем конститутивного промотора, то необходимость добавления специальных индукторов отсутствует. Если экспрессия гена, представляющего интерес, находится под контролем индуцируемого промотора, то, например, в среду для культивирования клеток нужно добавить соответствующий индуктор в достаточной, но нетоксичной концентрации. Клетки можно размножать по желанию путем многократного субпассирования и переносить в подходящие сосуды для культивирования клеток. Продукт(продукты) генов являются клеточными, мембраносвязанными либо секреторными продуктами или вырабатываются в качестве таковых.

[0301] В одном варианте осуществления стадия получения СТР-модифицированного фактора свертывания крови VIIa включает стабильную трансфекцию предварительно определенного количества клеток вектором экспрессии, содержащим кодирующую часть, кодирующую СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII. В другом варианте осуществления стадия получения СТР-модифицированного фактора свертывания крови VIIa включает стабильную трансфекцию клеток вектором экспрессии, содержащим кодирующую часть, кодирующую указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII. В одном варианте осуществления клетки представляют собой клетки CHO. В другом варианте осуществления клетки представляют собой клетки DG44. В другом варианте осуществления клетки являются любыми клетками, известными из уровня техники, подходящими для экспрессии и секреции СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII. В одном варианте осуществления экспрессируемый СТР-модифицированный FVII представляет собой зимоген FVII-СТР3, не имеющий сигнального пептида. В другом варианте осуществления аминокислотная последовательность экспрессируемого СТР-

модифицированного FVII приведена под SEQ ID NO: 7.

[0302] Специалисту в данной области будет понятно, что, хотя СТР-модифицированный FVII может экспрессироваться в виде зимогена в неактивном состоянии, зимоген может активироваться в ходе процесса очистки или после него. Термин «СТР-модифицированный FVII» может использоваться взаимозаменяемо с «СТР-модифицированным FVII/FVIIa» и может охватывать неактивные и активные формы полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVII. Аналогично, в отношении отдельных полипептидов, являющихся СТР-модифицированными факторами свертывания крови VII, например, FVII/FVIIa-СТР₃, также может использоваться наименование «FVII/FVIIa», представляющее неактивную либо активную формы или их обе. В одном варианте осуществления СТР-модифицированный полипептид, включающий в себя активированный FVIIa-СТР₃, содержит легкую цепь и тяжелую цепь, соединенные дисульфидной связью.

[0303] В другом варианте осуществления трансфицированные клетки экспрессируют СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII. В другом варианте осуществления экспрессируемый и получаемый FVII/FVIIa-СТР₃ состоит из двух СТР, присоединенных к карбоксильному концу указанного фактора свертывания крови VII/VIIa, и одного карбоксиконцевого пептида хорионического гонадотропина, присоединенного к аминоконцу указанного фактора свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления экспрессируемый и получаемый СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII/VIIa состоит из одного карбоксиконцевого пептида хорионического гонадотропина, присоединенного к карбоксильному концу указанного фактора свертывания крови VII/FVIIa. В другом варианте осуществления экспрессия СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII находится на высоком уровне экспрессии. В другом варианте осуществления указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII/VIIa является высокогликозилированным. В другом варианте осуществления указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII/VIIa является высокосиалилированным. В другом варианте осуществления указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII/VIIa имеет высокое содержание О-гликанов. В другом

варианте осуществления указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII/VIIa имеет высокое содержание N-гликанов. В другом варианте осуществления указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII/VIIa имеет высокое содержание заряженных N-гликанов. В другом варианте осуществления указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII/VIIa имеет высокое процентное содержание карбоксиглутаминовой кислоты. Как подробно описывается в данном документе, СТР-модифицированный фактор свертывания крови VIIa может иметь различные уровни и профили гликозилирования. СТР-модифицированный фактор свертывания крови VIIa, получаемый с помощью способов, раскрываемых в данном документе, может предусматривать любые из профилей и степеней гликозилирования, раскрываемых в данном документе. В целом, способ получения, представленный в данном документе, обеспечивает получение СТР-модифицированного фактора свертывания крови VIIa, имеющего высокий уровень гликозилирования и высокую процентную долю гликозилированных сайтов гликозилирования.

[0304] В другом варианте осуществления указанное высокое содержание O-гликанов в СТР-модифицированном факторе свертывания крови VII/VIIa составляет по меньшей мере 2 моль/моль. В другом варианте осуществления указанное высокое содержание O-гликанов в СТР-модифицированном факторе свертывания крови VII/VIIa составляет по меньшей мере 4 моль/моль. В другом варианте осуществления указанное высокое содержание O-гликанов в СТР-модифицированном факторе свертывания крови VII/VIIa составляет по меньшей мере 5 моль/моль. В другом варианте осуществления указанное высокое содержание O-гликанов в СТР-модифицированном факторе свертывания крови VII/VIIa составляет по меньшей мере 6 моль/моль. В другом варианте осуществления указанное высокое содержание O-гликанов в СТР-модифицированном факторе свертывания крови VII/VIIa составляет по меньшей мере 8 моль/моль. В другом варианте осуществления указанное высокое содержание O-гликанов в СТР-модифицированном факторе свертывания крови VII/VIIa составляет по меньшей мере 10 моль/моль. В другом варианте осуществления указанное высокое содержание O-гликанов в СТР-

модифицированном факторе свертывания крови VII/VIIa составляет по меньшей мере 12 моль/моль. В другом варианте осуществления указанное высокое содержание О-гликанов в СТР-модифицированном факторе свертывания крови VII/VIIa составляет по меньшей мере 14 моль/моль. В другом варианте осуществления указанное высокое содержание О-гликанов в СТР-модифицированном факторе свертывания крови VII/VIIa составляет по меньшей мере 16 моль/моль.

[0305] В одном варианте осуществления высокие уровень или содержание О-гликанов достигаются в результате процесса накопления биомассы в производственном процессе, раскрываемом в данном документе. В другом варианте осуществления высокие уровень или содержание О-гликанов достигаются в результате использования клона в производственном процессе, раскрываемом в данном документе. В другом варианте осуществления высокие содержание или уровни О-гликанов поддерживаются до получения конечной лекарственной субстанции.

[0306] В другом варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII/VIIa имеет высокое содержание сиаловой кислоты. В другом варианте осуществления указанное высокое содержание сиаловой кислоты в СТР-модифицированном факторе свертывания крови VII/VIIa составляет по меньшей мере 4 моль/моль. В другом варианте осуществления указанное высокое содержание сиаловой кислоты в СТР-модифицированном факторе свертывания крови VII/VIIa составляет по меньшей мере 6 моль/моль. В другом варианте осуществления указанное высокое содержание сиаловой кислоты в СТР-модифицированном факторе свертывания крови VII/VIIa составляет по меньшей мере 8 моль/моль. В другом варианте осуществления указанное высокое содержание сиаловой кислоты в СТР-модифицированном факторе свертывания крови VII/VIIa составляет по меньшей мере 10 моль/моль. В другом варианте осуществления указанное высокое содержание сиаловой кислоты в СТР-модифицированном факторе свертывания крови VII/VIIa составляет по меньшей мере 12 моль/моль. В другом варианте осуществления указанное высокое содержание сиаловой кислоты в СТР-модифицированном факторе свертывания крови VII/VIIa составляет по меньшей мере 14

[illegible]

факторе свертывания крови VII/VIIa составляет по меньшей мере 98%. В другом варианте осуществления указанное высокое процентное содержание карбоксиглутаминовой кислоты в СТР-модифицированном факторе свертывания крови VII/VIIa составляет по меньшей мере 99%. Специалисту в данной области будет понятно, что процентное содержание остатков карбоксиглутаминовой кислоты может быть выражено в инверсной форме как % доля без доменов с остатками карбоксиглутаминовой кислоты (доля без доменов Gla), где, например, если высокое процентное содержание Gla составляет 40%, то доля без доменов Gla составляет 60%.

[0308] В одном варианте осуществления стадия получения СТР-модифицированного фактора свертывания крови VIIa включает получение клонов клеток, сверхэкспрессирующих СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII. В другом варианте осуществления экспрессия СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII является оптимальной. В другом варианте осуществления уровень экспрессии составляет 30–1500 мг/л. В другом варианте осуществления уровень экспрессии составляет по меньшей мере 30 мг/л. В другом варианте осуществления уровень экспрессии составляет по меньшей мере 40 мг/л. В другом варианте осуществления уровень экспрессии составляет по меньшей мере 50 мг/л. В другом варианте осуществления уровень экспрессии составляет по меньшей мере 60 мг/л. В другом варианте осуществления уровень экспрессии составляет по меньшей мере 70 мг/л. В другом варианте осуществления уровень экспрессии составляет 50–70 мг/л. В другом варианте осуществления уровень экспрессии составляет по меньшей мере 200 мг/л. В другом варианте осуществления уровень экспрессии составляет по меньшей мере 300 мг/л. В другом варианте осуществления уровень экспрессии составляет по меньшей мере 400 мг/л. В другом варианте осуществления уровень экспрессии составляет по меньшей мере 500 мг/л. В другом варианте осуществления уровень экспрессии составляет по меньшей мере 600 мг/л. В другом варианте осуществления уровень экспрессии составляет по меньшей мере 700 мг/л. В другом варианте осуществления уровень экспрессии составляет по меньшей мере 800 мг/л. В другом

варианте осуществления уровень экспрессии составляет по меньшей мере 900 мг/л. В другом варианте осуществления уровень экспрессии составляет по меньшей мере 1000 мг/л. В другом варианте осуществления уровень экспрессии составляет по меньшей мере 1100 мг/л. В другом варианте осуществления уровень экспрессии составляет по меньшей мере 1200 мг/л. В другом варианте осуществления уровень экспрессии составляет по меньшей мере 1300 мг/л. В другом варианте осуществления уровень экспрессии составляет по меньшей мере 1400 мг/л. В другом варианте осуществления уровень экспрессии составляет по меньшей мере 1500 мг/л. В другом варианте осуществления клоны размножают в среде с образованием главного банка клеток (МСВ) и рабочего банка клеток (WCB). В одном варианте осуществления клоны на стадии (с) получают из МСВ. В другом варианте осуществления клоны получают из WCB.

[0309] СТР-модифицированный FVII получают из среды для культивирования клеток в виде секретируемого продукта гена. Если белок или полипептид экспрессируется без сигнала секреции, то продукт гена, тем не менее, также можно выделять из клеточных лизатов. С целью получения чистого однородного продукта, по существу не содержащего других рекомбинантных белков и белков клетки-хозяина, осуществляют традиционные процедуры очистки. Прежде всего клетки и клеточный дебрис многократно извлекают из культуральной среды или лизата. Желаемый продукт гена затем можно освобождать от загрязняющих растворимых белков, полипептидов и нуклеиновых кислот, например, посредством фракционирования на колонках для иммуноаффинной и ионообменной хроматографии, колонках для аффинной хроматографии, осаждения этанолом, обращенно-фазовой HPLC или хроматографии на Sephadex, гидроксипатите, кремнеземе или катионообменных смолах, таких как DEAE (см. примеры в данном документе). Общие методики, известные из уровня техники и приводящие к очистке гетерологичного белка, экспрессируемого рекомбинантными клетками-хозяевами, известны специалисту в данной области и описаны в литературе, например, у Harris et al. (Harris et al., Protein Purification: A Practical Approach, Pickwood and Hames,

eds., IRL Press, Oxford, 1995) и Scopes (Scopes, R., Protein Purification, Springer Verlag, 1988). Эти способы можно использовать полностью или частично в способах, раскрываемых в данном документе.

[0310] В другом варианте осуществления в данном документе раскрывается способ получения СТР-модифицированного FVII в клетках млекопитающих в бессывороточных условиях, характеризующийся тем, что (i) клетки млекопитающих содержат ген, кодирующий СТР-модифицированный FVII; (ii) клетки млекопитающих выращивают в бессывороточных условиях, обеспечивающих возможность воспроизведения клеток млекопитающих; (iii) в каждом случае по меньшей мере одну (1) из этих клеток млекопитающих помещают в сосуд для культивирования клеток в бессывороточных условиях; (iv) соответствующим образом помещенные клетки млекопитающих воспроизводятся в бессывороточных условиях; (v) воспроизводящиеся клетки культивируют в бессывороточных условиях, в которых экспрессируется СТР-модифицированный FVII; и (vi) продукт, представляющий собой СТР-модифицированный FVII, затем выделяют из клеток или надосадочной жидкости культуры и очищают и активируют. В другом варианте осуществления данного процесса клетка млекопитающего представляет собой трансфицированную клетку млекопитающего, в которую был введен ген СТР-модифицированного FVII. Соответственно, способы, раскрываемые в данном документе, также относятся к способу получения рекомбинантных продуктов генов, отличающемуся тем, что перед стадией (i) процесса, описываемого выше, клетки млекопитающих трансфицируют нуклеиновой кислотой, которая по меньшей мере кодирует СТР-модифицированный FVII. Предпочтительной является стабильная трансфекция соответствующей клетки млекопитающего.

[0311] Примеры бессывороточных, безбелковых сред или сред с химически определенным составом включают, например, коммерчески доступные среду Хэма F12 (Sigma, Дайзенхофен, Германия), RPMI 1640 (Sigma), среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM; Sigma), минимальную питательную среду (MEM; Sigma), среду Дульбекко в модификации Искова (IMDM; Sigma), CDCHO (Invitrogen, Карлсбад,

Калифорния, США), CHO-S-SFMII (Invitrogen), бессывороточную среду для культивирования клеток CHO (Sigma), среду CD-PowerCHO2 (Lonza) и безбелковую среду для культивирования клеток CHO (Sigma). Каждая из этих сред может быть при желании дополнена различными соединениями, такими как гормоны и/или другие факторы роста (например, инсулин, трансферрин, эпидермальный фактор роста, инсулиноподобный фактор роста), соли (например, хлорид натрия, соли кальция, магния, фосфаты), буферы (например, HEPES), нуклеозиды (например, аденозин, тимидин), глутамин, глюкоза или другие эквивалентные питательные вещества, антибиотики и/или следовые элементы или коммерчески доступная подпитка, такая как Power Feed A (Lonza). Если воспроизводимые клетки представляют собой рекомбинантные клетки, экспрессирующие один или более селектируемых маркеров, то в среду также можно добавлять один или более подходящих средств селекции, таких как антибиотики.

[0312] Будет понятно, что помимо того, что экспрессионная конструкция, раскрываемая в данном документе, содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей последовательности (кодирующей полипептид), она также может содержать последовательности, сконструированные для оптимизации стабильности, получения, очистки, выхода или активности экспрессируемого полипептида. В одном варианте осуществления нуклеотидная последовательность, кодирующая СТР-модифицированный FVII, приведена под SEQ ID NO: 4.

[0313] В некоторых вариантах осуществления трансформированные клетки культивируют в эффективных условиях, обеспечивающих возможность экспрессии рекомбинантного полипептида в высоких количествах. В некоторых вариантах осуществления эффективные условия культивирования включают без ограничения эффективные условия среды, биореактора, температуры, pH и содержания кислорода, которые позволяют получать белок. Специалисту в данной области будет понятно, что термин «эффективная среда» может охватывать любую среду, в которой культивируют клетку для получения рекомбинантного полипептида, раскрываемого в данном документе. В некоторых вариантах

осуществления среда обычно включает в себя водный раствор, имеющий источники усвояемого углерода, азота и фосфата, а также необходимые соли, минеральные вещества, металлы и другие питательные вещества, такие как витамины. В некоторых вариантах осуществления клетки, раскрываемые в данном документе, можно культивировать в традиционных ферментационных биореакторах, встряхиваемых колбах, пробирках, микротитровальных чашках и чашках Петри. В некоторых вариантах осуществления культивирование осуществляют при температуре, pH и содержании кислорода, подходящих для рекомбинантной клетки. В некоторых вариантах осуществления установление условий культивирования находится в пределах квалификации среднего специалиста в данной области.

[0314] В одном варианте осуществления условия культивирования включают содержание растворенного кислорода (DO), составляющее приблизительно 20–80%. В другом варианте осуществления содержание DO составляет приблизительно 20–30%. В другом варианте осуществления содержание DO составляет приблизительно 30–40%. В другом варианте осуществления содержание DO составляет приблизительно 40–50%. В другом варианте осуществления содержание DO составляет приблизительно 50–60%. В другом варианте осуществления содержание DO составляет приблизительно 60–70%. В другом варианте осуществления содержание DO составляет приблизительно 70–80%.

[0315] В одном варианте осуществления условия культивирования включают установление одного значения pH в качестве начального и его сдвиг к другому в ходе получения. В другом варианте осуществления pH имеет начальное значение, составляющее приблизительно 7,3, и сдвигается к приблизительно 6,7 в ходе инкубирования в биореакторе. В другом варианте осуществления pH имеет начальное значение, составляющее приблизительно 7,3, приблизительно 7,2 или приблизительно 7,1, и сдвигается к приблизительно 6,7, приблизительно 6,8, приблизительно 6,9 или приблизительно 7,0 в ходе инкубирования в биореакторе.

[0316] В некоторых вариантах осуществления в зависимости от

вектора и клеток-хозяев в экспрессионной системе, используемых для получения, получаемые в результате полипептиды, раскрываемые в данном документе, остаются в рекомбинантной клетке либо секретируются в среду.

[0317] В одном варианте осуществления после истечения предварительно определенного периода времени в культуре осуществляют извлечение рекомбинантного полипептида.

[0318] Специалисту в данной области будет понятно, что фраза «извлечение рекомбинантного полипептида», используемая в данном документе, может охватывать сбор всей среды, содержащей полипептид, и может предполагать дополнительные стадии отделения или очистки.

[0319] В одном варианте осуществления полипептиды, раскрываемые в данном документе, очищают с помощью разнообразных стандартных методик очистки белков, таких как, без ограничения, аффинная хроматография, ионообменная хроматография, фильтрация, электрофорез, хроматография гидрофобных взаимодействий, гель-фильтрационная хроматография, обращенно-фазовая хроматография, хроматография на конканавалине А, хроматография на гидроксипатите, хроматофокусирование и дифференциальная солюбилизация.

[0320] В одном варианте осуществления каждая колонка может функционировать при контролируемой или неконтролируемой температуре.

[0321] В одном варианте осуществления все стадии хроматографии проводят в режиме нисходящего потока. В другом варианте осуществления все стадии хроматографии выполняют в режиме восходящего потока.

[0322] В одном варианте осуществления для облегчения извлечения экспрессируемая кодирующая последовательность может быть сконструирована таким образом, чтобы она кодировала полипептид, раскрываемый в данном документе и слитый с отщепляемым компонентом. В одном варианте осуществления слитый белок может быть разработан таким образом, чтобы полипептид можно было легко выделить посредством аффинной хроматографии; например, путем иммобилизации на колонке с сорбентом,

специфичным по отношению к отщепляемому компоненту. В одном варианте осуществления между полипептидом и отщепляемым компонентом встроен сайт расщепления, и высвобождение полипептида из хроматографической колонки можно осуществлять путем обработки соответствующим ферментом или средством, осуществляющим специфичное расщепление слитого белка в данном сайте [например, см. Booth *et al.*, Immunol. Lett. 19:65-70 (1988); и Gardella *et al.*, J. Biol. Chem. 265:15854-15859 (1990)].

[0323] В одном варианте осуществления полипептид, раскрываемый в данном документе, извлекают в «по существу чистой» форме. Специалисту в данной области будет понятно, что фраза «по существу чистый» может охватывать степень чистоты, обеспечивающую возможность эффективного применения белка в путях применения, описываемых в данном документе. Такая форма также может включать в себя высокогликозилированные (с О-гликанами и/или N-гликанами) и высокосиалилированные формы, также раскрываемые в данном документе. В другом варианте осуществления такая форма может предусматривать формы с высоким процентным содержанием карбоксилированных остатков глутаминовой кислоты и/или низкое процентное содержание окисленной формы. В еще одном варианте осуществления полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVII, раскрываемым в данном документе, может включать в себя по существу чистую и активную форму полипептида.

[0324] В другом варианте осуществления процентное содержание окисленного СТР-модифицированного FVII/FVIIa, описываемого в данном документе, составляет менее 20% окисленной формы. В другом варианте осуществления процентное содержание окисленного СТР-модифицированного FVII/FVIIa, описываемого в данном документе, составляет менее 15% окисленной формы. В другом варианте осуществления процентное содержание окисленного СТР-модифицированного FVII/FVIIa, описываемого в данном документе, составляет менее 10% окисленной формы. В другом варианте осуществления процентное содержание окисленного СТР-модифицированного FVII/FVIIa, описываемого в данном документе, составляет менее 8% окисленной формы. В другом варианте

осуществления процентное содержание окисленного СТР-модифицированного FVII/FVIIa, описываемого в данном документе, составляет менее 5% окисленной формы. В другом варианте осуществления процентное содержание окисленного СТР-модифицированного FVII/FVIIa, описываемого в данном документе, составляет менее 4% окисленной формы. В другом варианте осуществления процентное содержание окисленного СТР-модифицированного FVII/FVIIa, описываемого в данном документе, составляет менее 3% окисленной формы.

[0325] В одном варианте осуществления снижение количества окисленных форм и контроль уровня окисленных форм выполняют на протяжении всего производственного процесса от накопления биомассы до получения конечной лекарственной субстанции.

[0326] В другом варианте осуществления степень чистоты указанного по существу чистого и активного полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVII, составляет по меньшей мере 40%. В другом варианте осуществления степень чистоты указанного по существу чистого и активного полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVII, составляет по меньшей мере 50%. В другом варианте осуществления степень чистоты указанного по существу чистого и активного полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVII, составляет по меньшей мере 60%. В другом варианте осуществления степень чистоты указанного по существу чистого и активного полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVII, составляет по меньшей мере 70%. В другом варианте осуществления степень чистоты указанного по существу чистого и активного полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVII, составляет по меньшей мере 75%. В другом варианте осуществления степень чистоты указанного по существу чистого и активного полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVII, составляет по меньшей мере 80%. В другом варианте осуществления степень чистоты указанного по существу чистого и активного полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVII, составляет по меньшей мере 85%. В другом варианте осуществления степень чистоты указанного по существу чистого и активного полипептида,

являющегося СТР-модифицированным FVII, составляет по меньшей мере 90%. В другом варианте осуществления степень чистоты указанного по существу чистого и активного полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVII, составляет по меньшей мере 91%. В другом варианте осуществления степень чистоты указанного по существу чистого и активного полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVII, составляет по меньшей мере 92%. В другом варианте осуществления степень чистоты указанного по существу чистого и активного полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVII, составляет по меньшей мере 93%. В другом варианте осуществления степень чистоты указанного по существу чистого и активного полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVII, составляет по меньшей мере 94%. В другом варианте осуществления степень чистоты указанного по существу чистого и активного полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVII, составляет по меньшей мере 95%. В другом варианте осуществления степень чистоты указанного по существу чистого и активного полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVII, составляет по меньшей мере 96%. В другом варианте осуществления степень чистоты указанного по существу чистого и активного полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVII, составляет по меньшей мере 97%. В другом варианте осуществления степень чистоты указанного по существу чистого и активного полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVII, составляет по меньшей мере 98%. В другом варианте осуществления степень чистоты указанного по существу чистого и активного полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVII, составляет по меньшей мере 99%. В дополнительном варианте осуществления процентное значение степени чистоты выбрано из группы, состоящей из 97,3%, 97,6%, 97,4% и 97,0%.

[0327] В одном варианте осуществления субъектом, раскрываемым в данном документе, является субъект-человек. В другом варианте осуществления субъектом является одомашненное животное. В другом варианте осуществления субъектом является домашний питомец. В другом варианте осуществления субъектом

является млекопитающее. В другом варианте осуществления субъектом является сельскохозяйственное животное. В другом варианте осуществления субъектом является обезьяна. В другом варианте осуществления субъектом является лошадь. В другом варианте осуществления субъектом является корова. В другом варианте осуществления субъектом является мышь. В другом варианте осуществления субъектом является крыса. В другом варианте осуществления субъектом является представитель псовых. В другом варианте осуществления субъектом является представитель кошачьих. В другом варианте осуществления субъектом является представитель быков, баранов, свиных, лошадиных, мышиных или оленьих. В одном варианте осуществления субъект имеет мужской пол. В другом варианте осуществления субъект имеет женский пол. В одном варианте осуществления субъектом является ребенок, в другом варианте осуществления подросток, в другом варианте осуществления взрослый или, в другом варианте осуществления, пожилой субъект. В другом варианте осуществления субъектом является педиатрический субъект, в другом варианте осуществления – гериатрический субъект.

[0328] В одном варианте осуществления полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVII, раскрываемый в данном документе, синтезируют с помощью экспрессионных систем *in vitro*. В одном варианте осуществления способы синтеза *in vitro* хорошо известны из уровня техники, и компоненты системы являются коммерчески доступными.

[0329] В одном варианте осуществления получение фактора свертывания крови VIIa, модифицированного с помощью СТР, выполняют с использованием технологии рекомбинантных ДНК.

[0330] В некоторых вариантах осуществления рекомбинантные полипептиды синтезируют и очищают; их терапевтическую эффективность можно оценивать *in vivo* либо *in vitro*. В одном варианте осуществления значения активности связывания рекомбинантного фактора свертывания крови VII/VIIa, модифицированного с помощью СТР, раскрываемого в данном документе, можно установить с помощью различных анализов.

[0331] В одном варианте осуществления способ получения СТР-

модифицированного фактора свертывания крови VIIa включает стадию получения клонов, характеризующихся оптимальной экспрессией указанного СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII, из указанного WCB и размножения указанных клонов. В другом варианте осуществления способ получения СТР-модифицированного фактора свертывания крови VIIa включает стадию получения клонов, характеризующихся оптимальной экспрессией указанного СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII, из указанного MCB и размножения указанных клонов. В другом варианте осуществления клоны клеток размножают в растворе посредством ряда стадий субкультивирования до уровня, характерного для производственного биореактора. В другом варианте осуществления раствор, содержащий указанные субкультивированные клоны, высевают в биореактор. В другом варианте осуществления биореактор представляет собой одноразовый биореактор. В другом варианте осуществления биореактор предусматривает биореактор из нержавеющей стали, биореактор с колебательным движением, такой как система Wave от GE, перфузионный биореактор или любую другую биореакторную систему, известную из уровня техники. В одном варианте осуществления извлечение клеток из биореактора осуществляют путем использования одноразовой фильтрационной системы. Если выполняется крупномасштабное производство, то перед использованием фильтрационной системы можно использовать непрерывное центрифугирование.

[0332] В одном варианте осуществления клоны клеток дополнительно размножают или получают в большем масштабе путем серийного культивирования указанных клеток в биореакторах увеличивающегося размера до достижения желаемого масштаба. В другом варианте осуществления биореактор функционирует в режиме периодического культивирования с подпиткой. В другом варианте осуществления биореактор функционирует в режиме периодического культивирования. В другом варианте осуществления биореактор функционирует в режиме повторяющегося периодического культивирования. В другом варианте осуществления биореактор функционирует в режиме перфузионного культивирования.

[0333] Пиковые значения плотности жизнеспособных клеток

различаются в зависимости от типа используемого биореактора. В одном варианте осуществления пиковая плотность жизнеспособных клеток в биореакторе, используемом в способах получения, раскрываемых в данном документе, составляет приблизительно $0,2 \times 10^6$ – $1,4 \times 10^6$ клеток/мл. В другом варианте осуществления пиковая плотность жизнеспособных клеток в биореакторе, используемом в способах получения, раскрываемых в данном документе, составляет приблизительно $0,05 \times 10^6$ – 100×10^6 . В другом варианте осуществления пиковая плотность жизнеспособных клеток в биореакторе составляет приблизительно $0,05 \times 10^6$ – $0,5 \times 10^6$. В другом варианте осуществления пиковая плотность жизнеспособных клеток в биореакторе составляет приблизительно $0,5 \times 10^6$ – 5×10^6 . В другом варианте осуществления пиковая плотность жизнеспособных клеток в биореакторе составляет приблизительно $5,0 \times 10^6$ – 50×10^6 . В другом варианте осуществления пиковая плотность жизнеспособных клеток в биореакторе составляет приблизительно 50×10^6 – 100×10^6 .

[0334] Схемы подпитки для использования биореактора могут быть различными, например, с повторяющейся ежедневной подпиткой, начиная с определенного дня, или с фиксированной подпиткой через некоторое количество дней, кроме того, % добавляемой подпитки может быть различным, составляя от нескольких % до даже 50% или больше.

[0335] В биореактор можно добавлять DMSO в различных концентрациях, как известно из уровня техники. В одном варианте осуществления в биореактор в ходе его использования добавляют 0,1–3% DMSO. В другом варианте осуществления добавляют 0,1–0,5% DMSO. В другом варианте осуществления добавляют 0,5–1,0% DMSO. В другом варианте осуществления добавляют 1,0–1,5% DMSO. В другом варианте осуществления добавляют 1,5–2,0% DMSO. В другом варианте осуществления добавляют 2,0–2,5% DMSO. В другом варианте осуществления добавляют 2,5–3,0% DMSO.

[0336] В одном варианте осуществления способ получения СТР-модифицированного фактора свертывания крови VIIa включает стадию очистки и активации осветленного собранного раствора с целью получения очищенного раствора активного СТР-модифицированного FVII. В другом варианте осуществления очищенный раствор белка,

[illegible]

[0337] В одном варианте осуществления осветленный собранный материал выдерживают в течение периода до 24 часов при 2–25°C. В другом варианте осуществления осветленный собранный материал хранят при по меньшей мере 5°C в течение периода до одного месяца.

[0338] В одном варианте осуществления осветленный собранный материал, полученный на данной стадии, тестируют в отношении бионагрузки, наличия бактериальных эндотоксинов, содержания специфического белка, наличия остаточной ДНК, вирусов, вирусоподобных частиц и/или микоплазм или любой их комбинации.

[0339] В одном варианте осуществления очистку осветленного собранного материала осуществляют путем последовательного выполнения стадий, включающих: (g) концентрирование, диафильтрацию и очистку указанного осветленного собранного раствора, где указанные концентрирование, диафильтрацию и очистку осуществляют с помощью кассеты с полуволоконной мембраной или кассеты для тангенциальной поточной фильтрации, с последовательным пропуском указанного осветленного собранного раствора через колонку для анионообменной хроматографии и колонку для хроматографии гидрофобных взаимодействий; (h) получение указанного осветленного собранного материала, полученного после данной стадии; и (i) инактивацию вирусов, присутствующих в указанном осветленном собранном материале, путем инкубирования в растворе, токсичном для указанных вирусов; (j) получение указанного осветленного собранного раствора после (h) и концентрирование, диафильтрацию и очистку указанного осветленного собранного раствора, где после указанных концентрирования, диафильтрации, активации и очистки выполняют последовательное пропускание указанного осветленного собранного раствора через колонку для аффинной хроматографии, колонку для хроматографии на мультимодальных матрицах или наполнителях смешанного типа, колонку для хроматографии гидрофобных взаимодействий (HIC) и колонку для анионообменной хроматографии; (j) получение указанного осветленного собранного раствора после стадии (i) и физическое удаление вирусов из указанного осветленного собранного раствора путем нанофильтрации; (k)

получение указанного осветленного собранного раствора после стадии (j) и концентрирование, диафильтрацию и очистку указанного осветленного собранного раствора с получением максимально очищенного осветленного собранного материала, содержащего указанную высокогликозилированную форму СТР-модифицированного FVII/FVIIa.

[0340] В одном варианте осуществления СТР-модифицированный FVII активируют в ходе очистки. В альтернативном варианте осуществления СТР-модифицированный FVII активируют после очистки. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный FVII активируют одновременно с проведением любой стадии очистки.

[0341] В одном варианте осуществления для концентрирования и фильтрации осветленного собранного материала можно выполнять ультрафильтрацию и диафильтрацию с использованием картриджа с полуволоконной мембраной или эквивалентную стадию UF/DF на основе метода TFF. Величина порога номинального отсека по молекулярной массе для картриджа составляет 10000 кДа. В другом варианте осуществления мембранный картридж может соответствовать мембранам из PES/PS/RC с порогом отсека от 3 кДа до 30 кДа. В другом варианте осуществления стадию UF/DF можно выполнять между стадиями хроматографии. В другом варианте осуществления стадию UF/DF можно выполнять до использования колонки для анионообменной хроматографии. В другом варианте осуществления стадию UF/DF можно выполнять до использования хроматографии гидрофобных взаимодействий (HIC). В другом варианте осуществления стадию UF/DF можно выполнять после использования хроматографии гидрофобных взаимодействий (HIC). В еще одном варианте осуществления UF/DF можно выполнять на нескольких стадиях, например, UF/DF можно выполнять после сбора материала, между стадиями хроматографии или в качестве стадии после удаления вирусов путем нанофильтрации или в любой их комбинации.

[0342] В другом варианте осуществления колонка для анионообменной хроматографии представляет собой колонку с DEAE-Sephrose Fast Flow. В другом варианте осуществления в колонке с DEAE происходит очистка высокогликозилированной формы указанного СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII/VIIa. В

одном варианте осуществления чем более высокой является степень гликозилирования, тем лучшими являются фармакодинамические характеристики СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления колонка для анионообменной хроматографии может включать в себя другие колонки для анионообменной хроматографии, известные из уровня техники, например, колонку для анионообменной хроматографии с Carpo DEAE или другими смолами, такими как Eshmuno Q.

[0343] В одном варианте осуществления колонка для хроматографии гидрофобных взаимодействий представляет собой колонку для хроматографии гидрофобных взаимодействий (HIC) с фенильными сорбентами. Количество циклов использования HIC с фенильными сорбентами может находиться в диапазоне, составляющем приблизительно 1-10. В одном варианте осуществления выполняют 1-3 цикла. В другом варианте осуществления выполняют 1-5 циклов. В другом варианте осуществления выполняют 1-6 циклов. В другом варианте осуществления выполняют 1-7 циклов. В другом варианте осуществления выполняют 1-8 циклов. В другом варианте осуществления выполняют 1-9 циклов. В другом варианте осуществления выполняют 1-10 циклов. В другом варианте осуществления для промывания и элюирования используют буферы, известные из уровня техники. В одном варианте осуществления элюирующий буфер содержит сульфат аммония и пропиленгликоль. В одном варианте осуществления элюирующий буфер содержит сульфат аммония и этиленгликоль.

[0344] В одном варианте осуществления колонка с гидроксипатитом для хроматографии на наполнителях смешанного типа включает в себя колонку с керамическим гидроксипатитом для хроматографии на наполнителях смешанного типа (СНТ). Количество циклов использования СНТ может находиться в диапазоне, составляющем приблизительно 1-10. В одном варианте осуществления выполняют 1-3 цикла. В другом варианте осуществления выполняют 1-5 циклов. В другом варианте осуществления выполняют 1-6 циклов. В другом варианте осуществления выполняют 1-7 циклов. В другом варианте осуществления выполняют 1-8 циклов. В другом варианте осуществления выполняют 1-9 циклов. В другом варианте

осуществления выполняют 1–10 циклов. Элюирование из колонки с СНТ можно выполнять приблизительно 3–10 объемами колонки (CV). В одном варианте осуществления элюирование выполняют приблизительно 3 CV. В другом варианте осуществления элюирование выполняют приблизительно 4 CV. В другом варианте осуществления элюирование выполняют приблизительно 5 CV. В другом варианте осуществления элюирование выполняют приблизительно 6 CV. В другом варианте осуществления элюирование выполняют приблизительно 7 CV. В другом варианте осуществления элюирование выполняют приблизительно 8 CV. В другом варианте осуществления элюирование выполняют приблизительно 9 CV. В другом варианте осуществления элюирование выполняют приблизительно 10 CV.

[0345] В одном варианте осуществления вирусы, которые могут присутствовать в осветленном собранном материале вследствие заражения, инактивируют в осветленном собранном материале. В другом варианте осуществления вирусы инактивируют с помощью 1% раствора Triton X-100. В другом варианте осуществления вирусы инактивируют с помощью 0,2–2% раствора Triton X-100. В другом варианте осуществления вирусы инактивируют с помощью 0,5% раствора Triton X-100. В другом варианте осуществления вирусы инактивируют с помощью 1–4% раствора Triton X-100. В другом варианте осуществления вирусы инактивируют с помощью 0,2–0,5% раствора Triton X-100. В другом варианте осуществления вирусы инактивируют с помощью 0,5–1,0% раствора Triton X-100. В другом варианте осуществления вирусы инактивируют с помощью 2% раствора Triton X-100. В другом варианте осуществления вирусы инактивируют с помощью 3% раствора Triton X-100. В другом варианте осуществления вирусы инактивируют с помощью 4% раствора Triton X-100. В другом варианте осуществления вирусы инактивируют с помощью 5–10% раствора Triton X-100. В другом варианте осуществления инактивация вирусов с помощью раствора Triton X-100 продолжается в течение приблизительно 0,5–24 часов. В другом варианте осуществления инактивация вирусов с помощью раствора Triton-X продолжается в течение приблизительно 0,5–1 часа. В другом варианте осуществления инактивация вирусов с помощью раствора Triton-X продолжается в течение приблизительно

1-2 часов. В другом варианте осуществления инаktivация вирусов с помощью раствора Triton-X продолжается в течение приблизительно 2-3 часов. В другом варианте осуществления инаktivация вирусов с помощью раствора Triton-X продолжается в течение приблизительно 3-4 часов. В другом варианте осуществления инаktivация вирусов с помощью раствора Triton-X продолжается в течение приблизительно 4-6 часов. В другом варианте осуществления инаktivация вирусов с помощью раствора Triton-X продолжается в течение приблизительно 6-8 часов. В другом варианте осуществления инаktivация вирусов с помощью раствора Triton-X продолжается в течение приблизительно 8-10 часов. В другом варианте осуществления инаktivация вирусов с помощью раствора Triton-X продолжается в течение приблизительно 10-12 часов. В другом варианте осуществления инаktivация вирусов с помощью раствора Triton-X продолжается в течение приблизительно 12-24 часов.

[0346] Специалисту в данной области будет понятно, что в способах, раскрываемых в данном документе, можно использовать другие концентрации или другие растворы, доступные в данной области техники и токсичные для этих вирусов, в том числе без ограничения холат натрия и Tween 80. В другом варианте осуществления для инаktivации вирусов на стадии (h) используют смесь три-н-бутилфосфата (TNBP) и полисорбата 80 (Tween 80).

[0347] В одном варианте осуществления вирусы удаляют физически путем использования нанофльтрации. Специалисту в данной области будет понятно, что в способах, раскрываемых в данном документе, для удаления вирусов можно применять любой фильтр, известный из уровня техники. В другом варианте осуществления нанофльтрацию осуществляют с помощью картриджа с фильтром Planova или типа Planova (1-60 мм²). После проведения таких способов выполняют подтверждение очищения осветленного собранного материала от вирусов с помощью способов, известных из уровня техники.

[0348] В одном варианте осуществления с помощью способов, раскрываемых в данном документе, достигают по меньшей мере 20% степени извлечения высокогликозилированного СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII/VIIa. В другом

варианте осуществления с помощью способов достигают степени извлечения, соответствующей по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15%, 20%, по меньшей мере 25%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99%, по меньшей мере 99,9% степени извлечения высокогликозилированного СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII/VIIa.

[0349] В одном варианте осуществления способы, раскрываемые в данном документе, дополнительно включают определение характеристик указанного СТР-модифицированного полипептида после очистки высокогликозилированного СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления определяют чистоту СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII. В другом варианте осуществления определяют уровень гликозилирования. В другом варианте осуществления определяют степень занятости сайтов гликозилирования. В одном варианте осуществления в получаемом СТР-модифицированном факторе свертывания крови VII/VIIa определяют чистоту, уровень гликозилирования и степень занятости сайтов гликозилирования.

[0350] В другом варианте осуществления клоны клеток, используемые в способах, раскрываемых в данном документе, хранятся в замороженном банке клеток. В другом варианте осуществления клоны клеток хранятся в лиофилизированном банке клеток.

[0351] В другом варианте осуществления банк клеток, используемый в способах и композициях, раскрываемых в данном документе, представляет собой главный банк клеток. В другом варианте осуществления банк клеток представляет собой рабочий банк клеток. В другом варианте осуществления банк клеток представляет собой банк клеток, соответствующий требованиям надлежащей производственной практики (GMP). В другом варианте осуществления банк клеток предназначен для получения клинически чистого материала. В другом варианте осуществления банк клеток соответствует практикам нормативного регулирования для

применения в медицине. В другом варианте осуществления банк клеток представляет собой банк клеток любого другого типа, известного из уровня техники.

[0352] В другом варианте осуществления «надлежащая производственная практика» определяется Сводом федеральных нормативных актов США (CFR, раздел 21, части 210–211). В другом варианте осуществления «надлежащая производственная практика» определяется другими стандартами производства клинически чистого или предназначенного для потребления человеком материала; например, стандартами государства, отличного от США. Каждая возможность представляет отдельный вариант осуществления, раскрываемый в данном документе.

[0353] В другом варианте осуществления среда, используемая для размножения клеток, содержит метотрексат (МХТ). В другом варианте осуществления среда представляет собой среду, не содержащую метотрексат. В другом варианте осуществления концентрация МХТ, присутствующего в среде, составляет приблизительно 0,1–2 мкМ. В другом варианте осуществления концентрация МХТ, присутствующего в среде, составляет приблизительно 0,1–0,5 мкМ. В другом варианте осуществления концентрация МХТ, присутствующего в среде, составляет приблизительно 0,5–1,0 мкМ. В другом варианте осуществления концентрация МХТ, присутствующего в среде, составляет приблизительно 1,0–1,5 мкМ. В другом варианте осуществления концентрация МХТ, присутствующего в среде, составляет приблизительно 1,5–2,0 мкМ. Будет хорошо понятно, что термин «среда» может охватывать жидкость, или гель, или порошок, подходящие для выращивания или культивирования клеток, содержащих СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII, раскрываемый в данном документе. Такая среда может в качестве альтернативы называться «средой для выращивания» или «культуральной средой» и может включать в себя без ограничения питательные среды, обогащенные среды, минимальные среды, дифференциальные среды, транспортные среды или селективные среды. В дополнительном аспекте селективная среда может подходить для отбора конкретной группы клеток в ходе

производственного процесса.

[0354] В одном варианте осуществления очищенный раствор белка содержит по меньшей мере 5–95% СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления очищенный раствор белка содержит по меньшей мере 5% СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления очищенный раствор белка содержит по меньшей мере 10% СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления очищенный раствор белка содержит по меньшей мере 15% СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления очищенный раствор белка содержит по меньшей мере 20% СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления очищенный раствор белка содержит по меньшей мере 30% СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления очищенный раствор белка содержит по меньшей мере 40% СТР-модифицированного фактора свертывания крови VIIa. В другом варианте осуществления очищенный раствор белка содержит по меньшей мере 50% СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления очищенный раствор белка содержит по меньшей мере 60% СТР-модифицированного фактора свертывания крови VIIa. В другом варианте осуществления очищенный раствор белка содержит по меньшей мере 70% СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления очищенный раствор белка содержит по меньшей мере 80% СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления очищенный раствор содержит по меньшей мере 90–95% СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления очищенный раствор содержит 95,1–99,9% СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления очищенный раствор содержит 100% СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII/VIIa.

[0355] В одном варианте осуществления получаемый СТР-модифицированный фактор свертывания крови имеет высокий %

уровень гамма-карбоксилирования. Специалисту в данной области будет понятно, что процентный уровень (%) гамма-карбоксилирования фактора свертывания крови может быть прямо пропорционален удельной активности СТР-модифицированного фактора свертывания крови. В одном варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя по меньшей мере 50% уровень гамма-карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя по меньшей мере 60% уровень гамма-карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя по меньшей мере 70% уровень гамма-карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя по меньшей мере 80% уровень гамма-карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя по меньшей мере 90% уровень гамма-карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя по меньшей мере 92% уровень гамма-карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя по меньшей мере 93% уровень гамма-карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя по меньшей мере 94% уровень гамма-карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя по меньшей мере 95% уровень гамма-карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя по меньшей мере 96% уровень гамма-карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя по меньшей мере 97% уровень гамма-карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя по меньшей мере 98% уровень гамма-

карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя по меньшей мере 99% уровень гамма-карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя 100% уровень гамма-карбоксилирования.

[0356] В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя 40-50% уровень гамма-карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя 50-60% уровень гамма-карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя 60-70% уровень гамма-карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя 70-80% уровень гамма-карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя 80-85% уровень гамма-карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя 85-90% уровень гамма-карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя 90-92% уровень гамма-карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя 90-95% уровень гамма-карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя 95-97% уровень гамма-карбоксилирования. В другом варианте осуществления % уровень гамма-карбоксилирования FVII-СТРЗ или FVIIa-СТРЗ включает в себя 95-100% уровень гамма-карбоксилирования.

[0357] В одном варианте осуществления удаление форм с низким уровнем гамма-карбоксилирования выполняют на стадии хроматографии на мультимодальных матрицах или наполнителях смешанного типа производственного процесса, раскрываемого в

данном документе (см. стадию 9, фигуру 17).

[0358] В одном варианте осуществления получаемый СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII/VIIa является высокогликозилированным. Специалисту в данной области будет хорошо понятно, что термин «высокогликозилированный» применительно к СТР-модифицированному фактору свертывания крови VII/VIIa может охватывать уровень гликозилирования, составляющий приблизительно 70–80% от всего полипептида, являющегося СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления высокогликозилированный СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII/VIIa имеет уровень гликозилирования, составляющий по меньшей мере 70%. В другом варианте осуществления высокогликозилированный СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII/VIIa имеет уровень гликозилирования, составляющий по меньшей мере 80%. В другом варианте осуществления данный термин может охватывать уровень гликозилирования, составляющий приблизительно 81–90% от всего полипептида, являющегося СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления высокогликозилированный СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII/VIIa имеет уровень гликозилирования, составляющий по меньшей мере 90%. В другом варианте осуществления данный термин может охватывать уровень гликозилирования, составляющий приблизительно 91–95% от всего полипептида, являющегося СТР-модифицированным фактором свертывания крови VIIa. В другом варианте осуществления данный термин может охватывать уровень гликозилирования, составляющий приблизительно 95,1–99% от всего полипептида, являющегося СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления данный термин может охватывать уровень гликозилирования, составляющий 100% от всего полипептида, являющегося СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa. Высокогликозилированные полипептиды, являющиеся СТР-модифицированными факторами свертывания крови VII/VIIa, могут обладать благоприятными свойствами в способах применения фактора свертывания крови VII/VIIa пролонгированного действия,

обеспечивающими снижение частоты введения. Высокие уровни гликозилирования способствуют значительному увеличению гидродинамического объема СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII/VIIa, например, СТР-модифицированного фактора свертывания крови VIIa, по сравнению с рекомбинантным фактором свертывания крови VII/VIIa. Это может приводить к удлинению времени циркуляции в кровотоке СТР-модифицированного фактора свертывания крови VIIa.

[0359] В одном варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один СТР составляет по меньшей мере 4-6. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один СТР составляет 4-6. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один СТР составляет по меньшей мере 4-8. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один СТР составляет 4-8. В одном варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один СТР составляет по меньшей мере 6-8. В одном варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один СТР составляет 6-8. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один СТР составляет по меньшей мере 4. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один СТР составляет по меньшей мере 5. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один СТР составляет по меньшей мере 6. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один СТР составляет по меньшей мере 7. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один СТР составляет 8.

[0360] В одном варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим один присоединенный СТР, составляет по меньшей мере 4-6. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим один присоединенный СТР, составляет по меньшей мере 6-8. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-

модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим один присоединенный СТР, составляет по меньшей мере 4–8. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим два присоединенных звена СТР, составляет по меньшей мере 8–12. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим два присоединенных звена СТР, составляет по меньшей мере 12–16. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим два присоединенных звена СТР, составляет по меньшей мере 8–16. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим три присоединенных звена СТР, составляет по меньшей мере 12–18. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим три присоединенных звена СТР, составляет по меньшей мере 18–24. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим три присоединенных звена СТР, составляет по меньшей мере 12–24. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим четыре присоединенных звена СТР, составляет по меньшей мере 16–24. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим четыре присоединенных звена СТР, составляет по меньшей мере 24–32. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим четыре присоединенных звена СТР, составляет по меньшей мере 16–32. В другом варианте

осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим пять присоединенных звеньев СТР, составляет по меньшей мере 20-30. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим пять присоединенных звеньев СТР, составляет по меньшей мере 30-40. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим пять присоединенных звеньев СТР, составляет по меньшей мере 20-40. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим шесть присоединенных звеньев СТР, составляет по меньшей мере 24-36. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим шесть присоединенных звеньев СТР, составляет по меньшей мере 36-48. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим шесть присоединенных звеньев СТР, составляет по меньшей мере 24-48. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим семь присоединенных звеньев СТР, составляет по меньшей мере 28-35. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим семь присоединенных звеньев СТР, составляет по меньшей мере 42-56. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим семь присоединенных звеньев СТР, составляет по меньшей мере 28-56. В другом варианте

осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим восемь присоединенных звеньев СТР, составляет по меньшей мере 32-48. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим восемь присоединенных звеньев СТР, составляет по меньшей мере 48-64. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим восемь присоединенных звеньев СТР, составляет по меньшей мере 32-64. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим девять присоединенных звеньев СТР, составляет по меньшей мере 36-54. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим девять присоединенных звеньев СТР, составляет по меньшей мере 54-72. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим девять присоединенных звеньев СТР, составляет по меньшей мере 36-72. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим десять присоединенных звеньев СТР, составляет по меньшей мере 40-60. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим десять присоединенных звеньев СТР, составляет по меньшей мере 60-80. В другом варианте осуществления количество О-гликанов в расчете на один полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, имеющим пять присоединенных звеньев СТР, составляет по меньшей мере 40-80.

[0361] В одном варианте осуществления степень занятости О-гликанами в расчете на один СТР составляет по меньшей мере 70%. В другом варианте осуществления степень занятости О-гликанами в расчете на один СТР составляет по меньшей мере 80%. В другом варианте осуществления степень занятости О-гликанами в расчете на один СТР составляет по меньшей мере 90%. В другом варианте осуществления степень занятости О-гликанами в расчете на один СТР составляет 100%.

[0362] В одном варианте осуществления высокая процентная доля N-гликанов в расчете на один СТР-модифицированный FVII/FVIIa является заряженной. В другом варианте осуществления процентная доля N-гликанов в расчете на один СТР-модифицированный FVII/FVIIa, которые являются заряженными, составляет по меньшей мере 40%. В другом варианте осуществления процентная доля N-гликанов в расчете на один СТР-модифицированный FVII/FVIIa, которые являются заряженными, составляет по меньшей мере 50%. В другом варианте осуществления процентная доля N-гликанов в расчете на один СТР-модифицированный FVII/FVIIa, которые являются заряженными, составляет по меньшей мере 60%. В другом варианте осуществления процентная доля N-гликанов в расчете на один СТР-модифицированный FVII/FVIIa, которые являются заряженными, составляет по меньшей мере 70%. В другом варианте осуществления процентная доля N-гликанов в расчете на один СТР-модифицированный FVII/FVIIa, которые являются заряженными, составляет по меньшей мере 80%. В другом варианте осуществления процентная доля N-гликанов в расчете на один СТР-модифицированный FVII/FVIIa, которые являются заряженными, составляет по меньшей мере 85%. В другом варианте осуществления процентная доля N-гликанов в расчете на один СТР-модифицированный FVII/FVIIa, которые являются заряженными, составляет по меньшей мере 90%. В другом варианте осуществления процентная доля N-гликанов в расчете на один СТР-модифицированный FVII/FVIIa, которые являются заряженными, составляет по меньшей мере 95%. В другом варианте осуществления процентная доля N-гликанов в расчете на один СТР-

[illegible]

гликанов в расчете на один СТР-модифицированный FVII/FVIIa, которые являются заряженными, составляет от приблизительно 85% до 90%. В другом варианте осуществления процентная доля N-гликанов в расчете на один СТР-модифицированный FVII/FVIIa, которые являются заряженными, составляет от приблизительно 65% до 95%. В другом варианте осуществления процентная доля N-гликанов в расчете на один СТР-модифицированный FVII/FVIIa, которые являются заряженными, составляет от приблизительно 90% до 95%. В другом варианте осуществления процентная доля N-гликанов в расчете на один СТР-модифицированный FVII/FVIIa, которые являются заряженными, составляет от приблизительно 95% до 100%.

[0365] В одном варианте осуществления высокий уровень заряженных N-гликанов достигается в результате процесса накопления биомассы в производственном процессе, раскрываемом в данном документе. В другом варианте осуществления уровень, превышающий 60% заряженных N-гликанов, достигается на ранней стадии DSP, и этот уровень поддерживается до получения конечной лекарственной субстанции.

[0366] В одном варианте осуществления высокий уровень заряженных N-гликанов достигается в результате процесса накопления биомассы в производственном процессе, раскрываемом в данном документе. В другом варианте осуществления уровень, превышающий 60% заряженных N-гликанов, достигается на ранней стадии DSP, и этот уровень поддерживается до получения конечной лекарственной субстанции.

[0367]

[0368] В одном варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII/VIIa является высокосиалилированным. Специалисту в данной области будет понятно, что термин «высокосиалилированный» применительно к СТР-модифицированному фактору свертывания крови VII/VIIa может охватывать уровень сиалилирования, составляющий приблизительно 70-80% от всего полипептида, являющегося СТР-модифицированным фактором свертывания крови VIIa. В другом варианте осуществления данный термин может охватывать уровень сиалилирования,

составляющий приблизительно 80–90% от всего полипептида, являющегося СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления данный термин может охватывать уровень сиалилирования, составляющий приблизительно 90–95% от всего полипептида, являющегося СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления данный термин может охватывать уровень сиалилирования, составляющий приблизительно 95,1–99% от всего полипептида, являющегося СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления данный термин может охватывать уровень сиалилирования, составляющий 100% от всего полипептида, являющегося СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления О-гликановая структура в СТР-модифицированном факторе свертывания крови VIIa содержит моносиалилированную сердцевину 1.

[0369] В одном варианте осуществления высокий процентный уровень сиалилирования и содержания О-связанных гликанов в СТР-модифицированном FVII/FVIIa, описываемом в данном документе, обеспечивает увеличение удельной активности СТР-модифицированного FVII/FVIIa. В другом варианте осуществления высокий процентный уровень сиалилирования и содержания О-связанных гликанов в СТР-модифицированном FVII/FVIIa, описываемом в данном документе, обеспечивает увеличение гидродинамического объема СТР-модифицированного FVII/FVIIa.

[0370] В одном варианте осуществления СТР-модифицированный FVII/FVIIa, описываемый в данном документе, обладает удельной активностью. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный FVII/FVIIa представляет собой по существу чистый и активный полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVII. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный FVII/FVIIa получают с помощью способа, описываемого в данном документе. В другом варианте осуществления удельная активность составляет по меньшей мере 5000 ед./мг. В другом варианте осуществления удельная активность составляет по меньшей мере 7500 ед./мг. В другом варианте осуществления удельная активность

составляет по меньшей мере 10000 ед./мг. В другом варианте осуществления удельная активность составляет по меньшей мере 10500 ед./мг. В другом варианте осуществления удельная активность составляет по меньшей мере 15000 ед./мг. В другом варианте осуществления удельная активность составляет по меньшей мере 20000 ед./мг. В другом варианте осуществления удельная активность составляет по меньшей мере 25000 ед./мг. В другом варианте осуществления удельная активность составляет по меньшей мере 27500 ед./мг. В другом варианте осуществления удельная активность составляет по меньшей мере 30000 ед./мг. В другом варианте осуществления удельная активность составляет по меньшей мере 35000 ед./мг. В другом варианте осуществления удельная активность составляет по меньшей мере 40000 ед./мг. В дополнительном варианте осуществления удельная активность выбрана из группы, состоящей из 15563 ед./мг, 16720 ед./мг, 22478 ед./мг и 23608 ед./мг.

[0371] В одном варианте осуществления полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, состоит из двух СТР, присоединенных к карбоксильному концу указанного фактора свертывания крови VII/VIIa, и одного карбоксиконцевого пептида хорионического гонадотропина, присоединенного к аминоконцу указанного фактора свертывания крови VII/VIIa. В другом варианте осуществления полипептид, являющийся СТР-модифицированным фактором свертывания крови VII/VIIa, состоит из одного карбоксиконцевого пептида хорионического гонадотропина, присоединенного к карбоксильному концу указанного фактора свертывания крови VII/VIIa.

[0372] В одном варианте осуществления вектор экспрессии, содержащий кодирующую часть, кодирующую указанный СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII/VIIa, также содержит промотор, последовательность, кодирующую указанный СТР-модифицированный полипептид, и последовательность полиаденилирования. В одном варианте осуществления последовательность полиаденилирования представляет собой последовательность полиаденилирования вируса обезьян (SV) 40.

[0373] В одном варианте осуществления СТР-модифицированный

[illegible]

[illegible]

мг/л. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII экспрессируется на уровне, составляющем по меньшей мере 1101–1200 мг/л. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII экспрессируется на уровне, составляющем по меньшей мере 1200 мг/л. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII экспрессируется на уровне, составляющем по меньшей мере 1201–1300 мг/л. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII экспрессируется на уровне, составляющем по меньшей мере 1300 мг/л. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII экспрессируется на уровне, составляющем по меньшей мере 1301–1400 мг/л. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII экспрессируется на уровне, составляющем по меньшей мере 1400 мг/л. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII экспрессируется на уровне, составляющем по меньшей мере 1401–1500 мг/л. В другом варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII экспрессируется на уровне, составляющем по меньшей мере 1500 мг/л.

[0374] Специалисту в данной области будет понятно, что термин «экспрессия» может охватывать транскрипцию и/или трансляцию гетерологичной последовательности нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. Уровень экспрессии желаемого продукта/белка, представляющего интерес, в клетке-хозяине можно определить, исходя из количества соответствующей мРНК или кДНК, присутствующей в клетке, либо количества желаемого полипептида/белка, представляющего интерес, кодируемого выбранной последовательностью, как указано в настоящих примерах. Например, мРНК, транскрибируемую с выбранной последовательности, можно определить количественно с помощью гибридизации с использованием нозерн-блоттинга, анализа защиты РНК от рибонуклеаз, гибридизации *in situ* с клеточной РНК или с помощью ПЦР (см. Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1987, обновленное издание). Белки, кодируемые выбранной

последовательностью, можно определить количественно с помощью различных способов, например, с помощью ELISA, с помощью вестерн-блоттинга, с помощью радиоиммунологических анализов, с помощью иммунопреципитации, с помощью анализа биологической активности белка, с помощью иммуноокрашивания белка с последующим FACS-анализом (см. Sambrook et al., 1989; Ausubel et al., 1987, обновленное издание) или с помощью анализов методом гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF). В одном варианте осуществления количественное определение СТР-модифицированного фактора свертывания крови VIIa включает применение обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC). В другом варианте осуществления система для RP-HPLC содержит колонку C-18. В другом варианте осуществления система для RP-HPLC содержит колонку C-8. В другом варианте осуществления в способах, раскрываемых в данном документе, применяется RP-HPLC для количественного определения СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII в собранном материале (см. пример 3, стадии 2-5). В другом варианте осуществления в способах, раскрываемых в данном документе, применяется RP-HPLC для количественного определения СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII в ходе очистки.

[0375] В другом варианте осуществления банк клеток или запас замороженных клеток, раскрываемый в данном документе, демонстрирует жизнеспособность после размораживания, превышающую 90%. В другом варианте осуществления хранение продолжается в течение неопределенного промежутка времени.

[0376] В другом варианте осуществления хранения хранение продолжается в течение 2 недель. В другом варианте осуществления хранения хранение продолжается в течение 3 недель. В другом варианте осуществления хранения хранение продолжается в течение 1 месяца. В другом варианте осуществления хранения хранение продолжается в течение 2 месяцев. В другом варианте осуществления хранения хранение продолжается в течение 3 месяцев. В другом варианте осуществления хранения хранение продолжается в течение 5 месяцев. В другом варианте осуществления хранения хранение продолжается в течение 6 месяцев. В другом варианте осуществления хранения хранение продолжается в течение 9

месяцев. В другом варианте осуществления хранение продолжается в течение 1 года.

[0377] В другом варианте осуществления банк клеток или запас замороженных клеток, раскрываемый в данном документе, подвергают криоконсервации с помощью способа, включающего выращивание культуры клеток в среде определенного состава, раскрываемой в данном документе, замораживание культуры в растворе, содержащем глицерин, и хранение клонов клеток при температуре ниже -20 градусов Цельсия. В другом варианте осуществления температура составляет приблизительно -70 градусов Цельсия. В другом варианте осуществления температура составляет приблизительно $-70 - -80$ градусов Цельсия. В другом варианте осуществления в данном способе можно использовать любую среду определенного состава, раскрываемую в данном документе. Каждая среда определенного состава представляет отдельный вариант осуществления, раскрываемый в данном документе.

[0378] В другом варианте осуществления способов и композиций, раскрываемых в данном документе, культуру высевают из банка клеток. В другом варианте осуществления культуру высевают из запаса замороженных клеток. В другом варианте осуществления культуру высевают из стартовой культуры. В другом варианте осуществления культуру высевают из колонии. В другом варианте осуществления культуру высевают в середине логарифмической фазы роста. В другом варианте осуществления культуру высевают примерно в середине логарифмической фазы роста. В другом варианте осуществления культуру высевают в другой фазе роста.

[0379] В другом варианте осуществления способов и композиций, раскрываемых в данном документе, раствор, используемый для замораживания, содержит DMSO в количестве 2–20%. В другом варианте осуществления количество составляет 2%. В другом варианте осуществления количество составляет 20%. В другом варианте осуществления количество составляет 1%. В другом варианте осуществления количество составляет 1,5%. В другом варианте осуществления количество составляет 3%. В другом варианте осуществления количество составляет 4%. В другом

варианте осуществления количество составляет 5%. В другом варианте осуществления количество составляет 2%. В другом варианте осуществления количество составляет 2%. В другом варианте осуществления количество составляет 7%. В другом варианте осуществления количество составляет 7,5%. В другом варианте осуществления количество составляет 9%. В другом варианте осуществления количество составляет 10%. В другом варианте осуществления количество составляет 12%. В другом варианте осуществления количество составляет 14%. В другом варианте осуществления количество составляет 16%. В другом варианте осуществления количество составляет 18%. В другом варианте осуществления количество составляет 22%. В другом варианте осуществления количество составляет 25%. В другом варианте осуществления количество составляет 30%. В другом варианте осуществления количество составляет 35%. В другом варианте осуществления количество составляет 40%.

[0380] В другом варианте осуществления добавка представляет собой сахарозу. В другом варианте осуществления добавка представляет собой любую другую добавку с коллигативными свойствами или добавку со свойствами предохранения от замерзания, известную из уровня техники. Каждая возможность представляет отдельный вариант осуществления, раскрываемый в данном документе.

[0381] В одном варианте осуществления замораживающий раствор, используемый в способах и в композициях, раскрываемых в данном документе, содержит кондиционированную среду и DMSO. В одном варианте осуществления замораживающий раствор, используемый в способах и в композициях, раскрываемых в данном документе, содержит приблизительно 46,255% кондиционированной среды и 7,5% DMSO.

[0382] В одном варианте осуществления культуру клеток выращивают с помощью методик, обычных в данной области техники. В другом варианте осуществления в ходе выращивания культуры клеток поддерживают постоянное значение pH. В другом варианте осуществления pH поддерживают при приблизительно 7,0. В другом варианте осуществления pH составляет приблизительно 6. В другом

варианте осуществления pH составляет приблизительно 6,5. В другом варианте осуществления pH составляет приблизительно 7,5. В другом варианте осуществления pH составляет приблизительно 8. В другом варианте осуществления pH составляет приблизительно 6,5–7,5. В другом варианте осуществления pH составляет приблизительно 6–8. В другом варианте осуществления pH составляет приблизительно 6–7. В другом варианте осуществления pH составляет приблизительно 7–8.

[0383] В другом варианте осуществления в ходе выращивания культуры поддерживают постоянную температуру. В другом варианте осуществления температуру поддерживают при приблизительно 37°C. В другом варианте осуществления температура составляет 37°C. В другом варианте осуществления температура составляет 25°C. В другом варианте осуществления температура составляет 27°C. В другом варианте осуществления температура составляет 28°C. В другом варианте осуществления температура составляет 30°C. В другом варианте осуществления температура составляет 32°C. В другом варианте осуществления температура составляет 34°C. В другом варианте осуществления температура составляет 35°C. В другом варианте осуществления температура составляет 36°C. В другом варианте осуществления температура составляет 38°C. В другом варианте осуществления температура составляет 39°C.

[0384] В другом варианте осуществления в ходе выращивания культуры поддерживают постоянную концентрацию растворенного кислорода. В другом варианте осуществления концентрацию растворенного кислорода поддерживают при 20% уровне насыщения. В другом варианте осуществления концентрация соответствует 15% уровню насыщения. В другом варианте осуществления концентрация соответствует 16% уровню насыщения. В другом варианте осуществления концентрация соответствует 18% уровню насыщения. В другом варианте осуществления концентрация соответствует 22% уровню насыщения. В другом варианте осуществления концентрация соответствует 25% уровню насыщения. В другом варианте осуществления концентрация соответствует 30% уровню насыщения. В другом варианте осуществления концентрация соответствует 35% уровню насыщения. В другом варианте осуществления концентрация

соответствует 40% уровню насыщения. В другом варианте осуществления концентрация соответствует 45% уровню насыщения. В другом варианте осуществления концентрация соответствует 50% уровню насыщения. В другом варианте осуществления концентрация соответствует 55% уровню насыщения. В другом варианте осуществления концентрация соответствует 60% уровню насыщения. В другом варианте осуществления концентрация соответствует 65% уровню насыщения. В другом варианте осуществления концентрация соответствует 70% уровню насыщения. В другом варианте осуществления концентрация соответствует 75% уровню насыщения. В другом варианте осуществления концентрация соответствует 80% уровню насыщения. В другом варианте осуществления концентрация соответствует 85% уровню насыщения. В другом варианте осуществления концентрация соответствует 90% уровню насыщения. В другом варианте осуществления концентрация соответствует 95% уровню насыщения. В другом варианте осуществления концентрация соответствует 100% уровню насыщения. В другом варианте осуществления концентрация соответствует уровню насыщения, близкому к 100%.

[0385] В другом варианте осуществления способов и композиций, раскрываемых в данном документе, культуру выращивают в среде, имеющей максимальный объем 2 литра (л) на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет максимальный объем 200 мл на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет максимальный объем 300 мл на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет максимальный объем 500 мл на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет максимальный объем 750 мл на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет максимальный объем 1 л на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет максимальный объем 1,5 л на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет максимальный объем 2,5 л на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет объем 3 л на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет объем 5 л на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет объем по меньшей мере 5 л на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет объем по меньшей мере 10 л на сосуд.

[0386] В другом варианте осуществления среда имеет минимальный объем 2 л на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет минимальный объем 500 мл на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет минимальный объем 750 мл на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет минимальный объем 1 л на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет минимальный объем 1,5 л на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет минимальный объем 2,5 л на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет минимальный объем 3 л на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет минимальный объем 4 л на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет минимальный объем 5 л на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет минимальный объем 6 л на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет минимальный объем 8 л на сосуд. В другом варианте осуществления среда имеет минимальный объем 10 л на сосуд.

[0387] В другом варианте осуществления стадию замораживания выполняют, когда культура имеет плотность 1×10^6 жизнеспособных клеток (VC)/мл. В другом варианте осуществления биомасса составляет $1,5 \times 10^6$ VC/мл. В другом варианте осуществления биомасса составляет $1,5 \times 10^6$ VC/мл. В другом варианте осуществления биомасса составляет 2×10^6 VC/мл. В другом варианте осуществления биомасса составляет 3×10^6 VC/мл. В другом варианте осуществления биомасса составляет 4×10^6 VC/мл. В другом варианте осуществления биомасса составляет 5×10^6 VC/мл. В другом варианте осуществления биомасса составляет 7×10^6 VC/мл. В другом варианте осуществления биомасса составляет 9×10^6 VC/мл. В другом варианте осуществления биомасса составляет 10×10^6 VC/мл. В другом варианте осуществления биомасса составляет 12×10^6 VC/мл. В другом варианте осуществления биомасса составляет 15×10^6 VC/мл. В другом варианте осуществления биомасса составляет 20×10^7 VC/мл. В другом варианте осуществления биомасса составляет 25×10^6 VC/мл. В другом варианте осуществления биомасса составляет 30×10^7 VC/мл. В другом варианте осуществления биомасса составляет 33×10^6 VC/мл. В другом варианте осуществления биомасса составляет 40×10^6 VC/мл. В другом

варианте осуществления биомасса составляет 50×10^6 ВС/мл. В другом варианте осуществления биомасса составляет более 50×10^6 ВС/мл.

[0388] В другом варианте осуществления способов и композиций, раскрываемых в данном документе, культуру клеток подвергают мгновенному замораживанию в жидком азоте с последующим хранением при конечной температуре замерзания. В другом варианте осуществления культуру замораживают более плавно; например, помещая культуру во флакон с конечной температурой хранения. В другом варианте осуществления культуру замораживают с помощью любого другого способа замораживания культур клеток, известного из уровня техники.

[0389] Специалисту в данной области будет понятно, что термины «культивирование клеток» и «культивирование тканей» могут использоваться взаимозаменяемо и обозначают поддержание клеток *in vitro* в суспензионной культуре в жидкой среде или на поверхности, такой как стекло, пластик или агар, на которой находится жидкая среда. В целом, для «культивирования клеток» необходима среда, забуференная для поддержания подходящего постоянного pH. Среда, используемые для культивирования клеток, как правило, составляют таким образом, чтобы они содержали достаточный запас необходимых питательных веществ, и их осмотические свойства можно приспосабливать к конкретным поддерживаемым клеткам, при этом температуру и состав газовой фазы также контролируют в подходящих пределах. Методики культивирования клеток хорошо известны из уровня техники. См., например, Morgan et al. 1993 *Animal Cell Culture*, BIOS Scientific Publishers, Oxford, UK; и Adams, R. L. P. 1990 *Cell Culture for Biochemists*, Second Edition, Elsevier.

[0390] Специалисту в данной области будет понятно, что термин «пассаж» может охватывать акт субкультивирования популяции клеток. Специалисту в данной области будет понятно, что термин «субкультура» может охватывать культуру клеток, формируемую путем высевания в стерильную среду, которая в одном варианте осуществления представляет собой свежую стерильную среду, образца из предыдущей культуры.

[0391] Специалисту в данной области также будет понятно, что термин «клеточная линия» может охватывать популяцию клеток, полученную из первичной культуры с помощью методик субкультивирования. Таким образом, первичную культуру можно субкультивировать с получением двух или более новых культур, и субкультивирование можно повторять через регулярные интервалы времени в течение нескольких месяцев для поддержания клеточной линии. Субкультивирование можно осуществлять с помощью хорошо известных методик культивирования клеток.

[0392] В одном варианте осуществления пассированные клеточные линии и иммортализованные линии клеток могут характеризоваться экспрессией в них специфических функциональных маркеров, таких как кератины, рецепторы гормонов и факторов роста и т. п.

[0393] В некоторых аспектах культивирование можно осуществлять в бессывороточных средах определенного состава с добавлением факторов роста. В других аспектах среда содержит сыворотку крови с добавлением или без добавления факторов роста. Такие модификации могут быть определены специалистом в данной области эмпирическим путем в целях оптимизации пролиферации клеток.

[0394] Специалисту в данной области будет понятно, что термин «линия клеток» может охватывать популяцию клеток, полученных из одного эксплантата, которые характеризуются наличием потенциала к неограниченной пролиферации *in vitro*. Линию клеток можно выделить из первичной культуры на основании ее способности к выживанию и продолжению роста в культуре. Линии клеток, которые изначально были получены из опухолевой ткани, могут быть трансформированы *in vivo*, хотя и не все популяции неопластических клеток обладают способностью к неопределенно долгому росту *in vitro*. Кроме того, линии клеток, как правило, сохраняют свою дифференцированную природу в течение многих циклов деления.

[0395] Подходящие субстраты для культивирования клеток, как правило, представляют собой контейнер, который может быть стерилизованным, из которого не выщелачиваются факторы

токсичности и который не искажает изображения, полученные с помощью микроскопа. Таким образом, пластины, изготовленные из стекла и пластика, являются подходящими субстратами в данном документе. Пластиковые контейнеры можно дополнительно обработать для содействия адгезии клеток с помощью методик, известных из уровня техники (Ramsey et al. 1984 *In vitro* 20:802). Подходящие среды для культивирования тканей, как правило, состоят из изотонической забуференной основной питательной среды, которая является источником энергии, в сочетании с неорганическими солями, аминокислотами, витаминами и различными добавками. Добавки могут включать в себя сыворотку крови (например, фетальную телячью сыворотку крови или т. п.), различные антибиотики для предотвращения заражения или для обеспечения селективных условий, факторы адгезии и роста или т. п. Из уровня техники известен ряд составов сред, таких как, без ограничения, минимальная питательная среда (MEM), среда Мемориального института Розуэлла Парка (RPMI) 1640 или среда Игла в модификации Дульбекко (DMEM). Подходящие условия культивирования тканей также известны из уровня техники. См., например, Morgan et al. 1993 *Animal Cell Culture*, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK, и Adams, R. L. P. 1990 *Cell Culture for Biochemists*, Second Edition, Elsevier. В другом варианте осуществления, раскрываемом в данном документе, способ получения СТР-модифицированного фактора свертывания крови VIIa представляет собой процесс без использования сыворотки крови. В другом варианте осуществления, раскрываемом в данном документе, способ получения СТР-модифицированного фактора свертывания крови VIIa представляет собой способ, в котором не используются материалы животного происхождения.

[0396] В другом варианте осуществления способов и композиций, раскрываемых в данном документе, температура хранения культуры составляет от -20 до -80 градусов Цельсия ($^{\circ}\text{C}$). В другом варианте осуществления температура составляет значительно менее -20°C . В другом варианте осуществления температура составляет не более -70°C . В другом варианте осуществления температура составляет -70°C . В другом варианте

осуществления температура составляет приблизительно -70°C . В другом варианте осуществления температура составляет -20°C . В другом варианте осуществления температура составляет приблизительно -20°C . В другом варианте осуществления температура составляет -30°C . В другом варианте осуществления температура составляет -40°C . В другом варианте осуществления температура составляет -50°C . В другом варианте осуществления температура составляет -60°C . В другом варианте осуществления температура составляет -80°C . В другом варианте осуществления температура составляет -30 – -70°C . В другом варианте осуществления температура составляет -40 – -70°C . В другом варианте осуществления температура составляет -50 – -70°C . В другом варианте осуществления температура составляет -60 – -70°C . В другом варианте осуществления температура составляет -30 – -80°C . В другом варианте осуществления температура составляет -40 – -80°C . В другом варианте осуществления температура составляет -50 – -80°C . В другом варианте осуществления температура составляет -60 – -80°C . В другом варианте осуществления температура составляет -70 – -80°C . В другом варианте осуществления температура составляет ниже -70°C . В другом варианте осуществления температура составляет ниже -80°C .

[0397] В другом варианте осуществления для криоконсервации клетки медленно замораживают до достижения ими температуры ниже -70°C в среде, содержащей криопротектор, и флаконы затем переносят в криогенный аппарат на базе жидкого азота для поддержания их при температурах ниже -130°C .

[0398] В другом варианте осуществления способов и композиций, раскрываемых в данном документе, криоконсервация, или хранение в замороженном состоянии, продолжается в течение не более 24 часов. В другом варианте осуществления криоконсервация, или хранение в замороженном состоянии, продолжается в течение не более 2 дней, продолжается в течение не более 3 дней, продолжается в течение не более 4 дней, продолжается в течение не более 1 недели, продолжается в течение не более 2 недель, продолжается в течение не более 3 недель, продолжается в течение не более 1 месяца, продолжается в течение не более 2 месяцев,

продолжается в течение не более 3 месяцев, продолжается в течение не более 5 месяцев, продолжается в течение не более 6 месяцев, продолжается в течение не более 9 месяцев или продолжается в течение не более 1 года. Каждая возможность, перечисленная выше, представляет собой вариант осуществления, раскрываемый в данном документе.

[0399] В другом варианте осуществления криоконсервация, или хранение в замороженном состоянии, продолжается в течение не менее 1 недели, продолжается в течение не менее 2 недель, продолжается в течение не менее 3 недель, продолжается в течение не менее 1 месяца, продолжается в течение не менее 2 месяцев, продолжается в течение не менее 3 месяцев, продолжается в течение не менее 5 месяцев, продолжается в течение не менее 6 месяцев, продолжается в течение не менее 9 месяцев, продолжается в течение не менее 1 года, продолжается в течение не менее 1,5 лет, продолжается в течение не менее 2 лет, продолжается в течение не менее 3 лет, продолжается в течение не менее 5 лет, продолжается в течение не менее 7 лет, продолжается в течение не менее 10 лет или продолжается дольше 10 лет. Каждая возможность, перечисленная выше, представляет собой вариант осуществления, раскрываемый в данном документе.

[0400] В другом варианте осуществления способов и композиций, раскрываемых в данном документе, клетки демонстрируют рост после размораживания, следующего за длительным периодом криоконсервации или хранения в замороженном состоянии. В другом варианте осуществления клетки демонстрируют рост в течение периода приблизительно 15–22 часов после высевания в свежую среду клеток из банка клеток или стартовой культуры. В другом варианте осуществления клетки демонстрируют рост в течение периода приблизительно 12–20 часов после высевания в свежую среду клеток из банка клеток или стартовой культуры. В одном варианте осуществления для обеспечения жизнеспособности, генетической стабильности и фенотипической стабильности линии клеток необходимо поддерживать в экспоненциальной фазе роста (путем регулярного субкультивирования).

[0401] «Длительный период» криоконсервации, или хранения в замороженном состоянии, в другом варианте осуществления составляет 1 месяц. В другом варианте осуществления период составляет 2 месяца. В другом варианте осуществления период составляет 3 месяца. В другом варианте осуществления период составляет 5 месяцев. В другом варианте осуществления период составляет 6 месяцев. В другом варианте осуществления период составляет 9 месяцев. В другом варианте осуществления период составляет 1 год. В другом варианте осуществления период составляет 1,5 года. В другом варианте осуществления период составляет 2 года. В другом варианте осуществления период составляет 2–7 лет. В другом варианте осуществления период составляет по меньшей мере 7 лет. В другом варианте осуществления период составляет по меньшей мере 10 лет.

[0402] В другом варианте осуществления клетки в способах и композициях, раскрываемых в данном документе, сохраняют жизнеспособность, составляющую более 90%, после размораживания, следующего за криоконсервацией. В другом варианте осуществления жизнеспособность после размораживания, следующего за периодом криоконсервации, является близкой к 100%. В другом варианте осуществления жизнеспособность после размораживания является близкой к 90%. В другом варианте осуществления жизнеспособность после размораживания составляет по меньшей мере 90%. В другом варианте осуществления жизнеспособность после размораживания составляет более 80%.

[0403] В другом варианте осуществления банк клеток, запас замороженных клеток или партию вакцинных доз, раскрываемые в данном документе, выращивают в среде определенного состава для культивирования клеток. Такие среды известны из уровня техники и могут включать без ограничения среду Игла в модификации Дульбекко (DMEM) (№ в ATCC® 30-2002), среду Дульбекко в модификации Искова (IMDM) (№ в ATCC® 30-2005), среду Hybri-Care (№ в ATCC® 46-X), среды МакКоя 5А и RPMI-1640 (№ в ATCC® 30-2007), питательные смеси Хэма (CCL-61™ в ATCC®), бессывороточную среду с химически определенным составом для культивирования клеток CHO PowerCHO™ (Lonza, № по кат. 12-771Q) или любую другую

среду, известную из уровня техники. В другом варианте осуществления эти среды могут быть дополнены антибиотиками или образцами сыворотки крови животных, что определит эмпирическим путем специалист в данной области.

[0404] В одном варианте осуществления в данном документе раскрываются биореакторы и способы, которые обеспечивают возможность культивирования клеток млекопитающих в крупномасштабных объемах. Кроме того, в другом варианте осуществления указанные биореакторы и способы обеспечивают возможность культивирования клеток млекопитающих в оптимальных условиях даже при выращивании в крупномасштабных объемах и, таким образом, обеспечивают возможность достижения производственных показателей и качества продукта независимо от размера биореактора. Продолжительность времени инкубирования в биореакторе можно варьировать, попросту изменяя масштаб и биореакторную систему, например, продолжительность может составлять 8–9 или она может составлять 15–16 дней. В другом варианте осуществления продолжительность инкубирования в биореакторе составляет приблизительно 7 дней, приблизительно 8 дней, приблизительно 9 дней, приблизительно 10 дней, приблизительно 11 дней, приблизительно 12 дней, приблизительно 13 дней, приблизительно 14 дней, приблизительно 15 дней, приблизительно 16 дней, приблизительно 17 дней, приблизительно 18 дней, приблизительно 19 дней, приблизительно 20 дней или больше. В другом варианте осуществления при использовании перфузионного биореактора продолжительность инкубирования может составлять до 7–120 дней.

[0405] В другом варианте осуществления в данном документе раскрываются крупномасштабные биореакторы, которые обеспечивают возможность культивирования клеток млекопитающих в среде, однородной с точки зрения таких параметров процесса, как pH, парциальное давление растворенного кислорода (DOT) и температура, с поддержанием хорошо перемешиваемой суспензии клеток и смешиванием подаваемых питательных веществ в биореакторе. В другом варианте осуществления биореактор представляет собой одноразовый биореактор.

[0406] С помощью способов, раскрываемых в данном документе, решаются технические задачи, лежащие в основе способов, раскрываемых в данном документе, путем обеспечения биореакторов, биореакторных систем и способов культивирования эукариотических клеток, в частности, клеток млекопитающих, в соответствии с формулой настоящего изобретения.

[0407] В одном варианте осуществления биореактор имеет объем, составляющий по меньшей мере 250 литров (л). В другом варианте осуществления биореактор имеет объем, составляющий по меньшей мере 500 л. В другом варианте осуществления объем составляет по меньшей мере 1000 л, по меньшей мере 2000 л, по меньшей мере 5000 л, по меньшей мере 10000 л, по меньшей мере 12000 л или по меньшей мере 15000 л.

[0408] В другом варианте осуществления клетки субкультивируют в биореакторах увеличивающегося объема (см. примеры).

[0409]

[0410] Как в целом известно из уровня техники, модифицированные пептиды и белки согласно настоящему изобретению могут быть связаны с метками, лекарственными средствами, нацеливающими средствами, носителями, твердыми подложками и т. п. в зависимости от желаемого применения. Меченые формы модифицированных биологических препаратов можно использовать для отслеживания их метаболической судьбы; подходящие метки для этой цели включают в себя, в частности, радиоизотопные метки, такие как йод-131, технеций-99, индий-111 и т. п. Метки также можно использовать для опосредования выявления модифицированных белков или пептидов в аналитических системах; в этом случае также можно использовать радиоактивные изотопы, а также ферментные метки, флуоресцентные метки, хромогенные метки и т. п. Использование таких меток является особенно целесообразным, если пептид или белок сам по себе представляет собой нацеливающее средство, такое как антитело или лиганд рецептора.

[0411] Аналогичные методики образования связей, наряду с другими, можно использовать для связывания модифицированных

пептидов и белков согласно настоящему изобретению с твердыми подложками. Будучи связанными, эти модифицированные пептиды и белки могут затем использоваться в качестве аффинных реагентов для отделения желаемых компонентов, с которыми демонстрируется специфическая реакция.

[0412] И наконец, модифицированные пептиды и белки согласно настоящему изобретению можно использовать для образования антител, характеризующихся специфической иммунореактивностью в отношении этих новых соединений. Эти антитела являются применимыми в разнообразных диагностических и терапевтических путях применения в зависимости от характера биологической активности немодифицированного пептида или белка. Следует понимать, что в настоящем изобретении предусмотрены антитела, которые характеризуются иммунореактивностью в отношении FVII или FVIIa, описываемых в данном документе. В одном варианте осуществления такие антитела можно применять для идентификации введенных СТР-модифицированных факторов свертывания крови или установления различий между ними и эндогенными факторами свертывания крови. В другом варианте осуществления антитела можно применять для определения локализации введенных СТР-модифицированных факторов свертывания крови.

[0413] Дополнительные цели, преимущества и новые признаки, раскрываемые в данном документе, будут очевидны среднему специалисту в данной области после изучения следующих примеров, которые не предназначены быть ограничивающими. В дополнение, каждый из различных вариантов осуществления и аспектов, раскрываемых в данном документе, которые в общих чертах описаны в данном документе выше и заявляются в разделе «Формула изобретения» ниже, находит экспериментальное подтверждение в следующих примерах.

ПРИМЕРЫ

[0414] Как правило, система наименований, используемая в данном документе, и лабораторные процедуры, используемые в настоящем изобретении, включают в себя методики молекулярной биологии, биохимии, микробиологии и рекомбинантных ДНК. Такие методики всесторонне объясняются в литературе. См, например,

«Molecular Cloning: A laboratory Manual» Sambrook et al., (1989); «Current Protocols in Molecular Biology» Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., «Current Protocols in Molecular Biology», John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, «A Practical Guide to Molecular Cloning», John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., «Recombinant DNA», Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) «Genome Analysis: A Laboratory Manual Series», Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); методики, изложенные в патентах США №№ 4666828; 4683202; 4801531; 5192659 и 5272057; «Cell Biology: A Laboratory Handbook», Volumes I-III, Cellis, J. E., ed. (1994); «Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique», Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Third Edition; «Current Protocols in Immunology» Volumes I-III, Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), «Basic and Clinical Immunology» (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), «Selected Methods in Cellular Immunology», W. H. Freeman and Co., New York (1980); доступные иммунологические анализы широко описаны в патентной и научной литературе, см., например, патенты США №№ 3791932; 3839153; 3850752; 3850578; 3853987; 3867517; 3879262; 3901654; 3935074; 3984533; 3996345; 4034074; 4098876; 4879219; 5011771 и 5281521; «Oligonucleotide Synthesis» Gait, M. J., ed. (1984); «Nucleic Acid Hybridization» Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); «Transcription and Translation» Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); «Animal Cell Culture» Freshney, R. I., ed. (1986); «Immobilized Cells and Enzymes» IRL Press, (1986); «A Practical Guide to Molecular Cloning» Perbal, B., (1984) и «Methods in Enzymology» Vol. 1-317, Academic Press; «PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications», Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., «Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual» CSHL Press (1996); все из которых включены посредством ссылки. Другие общие ссылки приведены по всему данному документу.

ПРИМЕР 1

Исследования осуществимости применения FVII-СТР₃ у мышей с

гемофилией с дефицитом FVIII

[0415] Проводили исследования, в которых тестировали PK-профиль и коагуляционную активность FVII-CTP, FVII-CTP₂ и FVII-CTP₃ в собранном материале в сравнении с коммерческим FVII. FVII-CTP₃ демонстрировал улучшенный PK-профиль в сравнении с FVII-CTP и FVII-CTP₂ в собранном материале или rhFVII с сохранением при этом своей коагуляционной активности. Для того, чтобы дополнительно охарактеризовать свойства FVII-CTP₃ *in vitro* и *in vivo*, создавали стабильный мини-пул, экспрессирующий и секретирующий белок, и разрабатывали процессы очистки и активации.

[0416] В настоящем исследовании фармакокинетические и фармакодинамические свойства FVIIa-CTP₃ тестировали у мышей с дефицитом FVIII. Оценивали PK-профиль белка. PK-профиль FVIIa устанавливали на основании специфической активности и сравнивали с профилем коммерческого продукта NovoSeven®. Кроме того, тестировали долговременные гемостатические способности FVIIa-CTP₃ *in vivo*, благодаря которым у мышей с дефицитом FVIII индуцируется коагуляция после рассечения хвостовой вены (исследование выживаемости).

[0417] Цели исследования

[0418] Оценивание фармакокинетических и фармакодинамических параметров FVIIa-CTP₃ в сравнении с коммерческим rhFVIIa (NovoSeven®) у мышей с дефицитом FVIII после однократного IV введения в аналогичных по активности дозах.

[0419] Определение способности FVIIa-CTP₃ поддерживать гемостаз у мышей с дефицитом FVIII *in vivo* путем однократного IV введения FVIIa-CTP₃ и NovoSeven® в аналогичных по активности дозах с последующей провокацией рассечением хвостовой вены (исследование выживаемости).

[0420] Получение собранного материала, содержащего FVII-CTP₃

[0421] Экспрессию FVII-CTP₃ обеспечивали в собственной лаборатории в клетках Dg44 с помощью вектора pCI-DHFR (**фигура 1**). Стабильно трансфицированный пул № 71 выращивали во встряхиваемых колбах в присутствии 25 нг/л витамина K3 (Sigma). Суспензию клеток культивировали и собирали после падения

жизнеспособности до 60–80%. Собранный материал фильтровали и замораживали при -70°C .

[0422] Определение уровня антигена FVII в собранном материале

[0423] Уровень антигена FVII определяли с помощью набора для ELISA FVII человека (Zymotest HyPhen) (таблица 1). Рассчитывали уровень антигена в каждой объединенной партии собранного материала.

Таблица 1. Уровень антигена FVII-СТР₃

Уровень антигена FVII			
	Исследование РК-PD		Исследование выживаемости
	Собранный материал 31A	Собранный материал 31B	Собранный материал 38
Av (мкг/мл)	16,0	15,9	16,6
STD	1,5	0,0	0,8
% CV	9,1	0,1	4,9

[0424] Процесс очистки FVII-СТР₃ (фигуры 2A–2B)

[0425] Краткое изложение процесса

[0426] После короткого исследования очистки выполняли следующий процесс очистки с использованием 2 колонок. γ -карбокситированный обогащенный белок FVII-СТР₃ очищали на колонке для аффинной хроматографии с VII-Select (GE) и керамическим гидроксипатитом 1 типа (HA) с размером частиц 40 μ мкм (Bio Rad). Самоактивацию индуцировали путем инкубирования очищенного FVII-СТР₃ в присутствии CaCl_2 в течение ночи при $2-8^{\circ}\text{C}$. Процесс очистки находится на своей конечной стадии разработки и оптимизируется, поэтому, хотя большинство стадий очистки являются сходными, некоторая часть стадий очистки не является идентичной в двух партиях.

[0427] Ультрафильтрация/диафильтрация (UF/DF) с помощью полуволоконной мембраны с порогом отсеечения 10 кДа или кассеты Pellicon

[0428] Осветленный собранный материал размораживали при 4°C в течение выходных (2–3 дней).

[0429] В партии 31 осветленный собранный материал (12 литров) концентрировали в 4 раза (за два последовательных прогона) с помощью картриджа с полуволоконной мембраной (GE Healthcare, № по каталогу UFP-10-C-4X2MA) с порогом отсечения по молекулярной массе 10 кДа. Концентрированный собранный материал подвергали диафильтрации против 1-2 объемов TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4).

[0430] В партии 38 осветленный собранный материал (8,5 литра) концентрировали в 4 раза с помощью кассеты Pellicon 2 (Millipore) с порогом отсечения по молекулярной массе 10 кДа. Концентрированный собранный материал загружали непосредственно в колонку с VII-Select.

[0431] Обе процедуры ультрафильтрации выполняли на льду с использованием ледяных буферов. Образцы, подвергнутые UF/DF, фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм перед загрузкой.

[0432] **Захватна колонке с FVII-Select**

[0433] Подвергнутый UF/DF или концентрированный собранный материал загружали в колонку с VII-Select (XK16/20, CV 18 мл), предварительно уравновешенную с помощью TBS с pH 7,4. Колонку промывали с помощью 50 mM трис-HCl, 0,5 M NaCl, pH 7,5, и FVII-СТР₃ элюировали с помощью 50 mM трис-HCl, 1 M NaCl, 50% (об./об.) пропиленгликоля, pH 7,5. Процесс выполняли за два последовательных цикла с использованием одной и той же колонки.

[0434] **Разделение по гамма-карбоксилированию на колонке с керамическим гидроксипатитом**

[0435] Элюированный продукт разбавляли 1:10 с помощью 10 mM фосфата натрия, pH 6,8, и загружали в колонки с керамическим гидроксипатитом (XK16/20, CV 24 мл). Колонку промывали с помощью 59 mM фосфата натрия, pH 6,8, и фракцию фактора свертывания крови VII, богатую γ-карбоксилированными остатками, элюировали с помощью 500 mM фосфата натрия, pH 6,8. Этот процесс выполняли за два последовательных цикла на одной и той же колонке. В каждой партии элюаты после двух циклов объединяли и концентрировали до 1,7-2 мг/мл и подвергали диафильтрации с использованием 20 mM трис-HCl, 100 mM NaCl, pH 8,2, для

уменьшения объема и получения материала для стадии активации.

[0436] **Активация FVII**

[0437] Очищенный FVII-СТР₃ разбавляли до 1 мг/мл и инкубировали в 20 mM трис-HCl, 100 mM NaCl и 1 mM CaCl₂, pH 8,2, при 2-8°C в течение 24 часов. Активацию прекращали путем замены буфера (UF/DF) на буфер для предварительного состава (20 mM цитратного буфера, 240 mM NaCl, 13,3 mM глицина, pH 6,9).

[0438] **Аналитические свойства FVII-СТР₃ и FVIIa-СТР₃**

[0439] **Процедуры SDS-PAGE и вестерн-блоттинга**

[0440] Очищенный FVII-СТР₃ и FVIIa-СТР₃ загружали в 12% трис-глициновый гель с использованием двухцветного маркера Precision Plus Protein (Bio-Rad). Анализ методом SDS-PAGE с окрашиванием кумасси выполняли путем окрашивания геля реагентом кумасси бриллиантовым синим (5 или 10 мкг белка/дорожка). Анализ методом вестерн-блоттинга выполняли (1 мкг белка/дорожка) с использованием поликлонального Ab к FVII человека (R&D Systems; AF2338), моноклонального антитела к гамма-карбоксилированным белкам человека (American Diagnostics, № по каталогу 499, 3570) и поликлонального Ab к СТР. В восстанавливающих условиях FVII-СТР₃ мигрировал на уровне 75 кДа, а FVIIa-СТР₃ мигрировал в виде двух основных полос: тяжелая цепь на уровне 50 кДа, а легкая цепь на уровне 25 кДа, которые представлены на **фигурах 3А-3Н** соответственно как полосы 2 и 3.

[0441] В результате процедуры очистки значительно обогащалась часть, соответствующая FVII-СТР₃, со снижением при этом количества примесей. Выход процесса очистки составлял 25-30% FVII (согласно ELISA). Большая часть белка, которая утрачивалась в ходе очистки, обладала низкой хромогенной активностью FVII или не обладала активностью. Как следует из картины SDS-PAGE с окрашиванием кумасси, восстановленный FVIIa-СТР₃ содержит больше, чем предсказанные полосы. Полоса, мигрирующая к примерно ~ 75 кДа, представляет неактивированный FVII (**фигуры 3А-3Н**, полоса 1). Эта полоса состоит из двух полос, незначительно различающихся по MW, что может отражать различный уровень γ-карбоксилирования. Наблюдались дополнительные полосы с MW менее 20 кДа. Они, как сообщалось ранее, соответствуют

продуктам распада тяжелой цепи.

[0442] **Хромогенная активность FVII-СТР₃**

[0443] Сравнительную оценку удельной активности *in vitro* для собранного материала, содержащего FVII-СТР₃, фракций, отбираемых в ходе процесса, и очищенного FVII-СТР₃ в сравнении с пулом нормальной плазмы крови человека выполняли с помощью коммерчески доступного набора для тестирования хромогенной активности BIORHEN (Hyphen BioMed 221304). Собранный материал, содержащий FVII-СТР₃, и сам белок подвергали серийному разведению, и удельную активность оценивали путем сравнения кривой зависимости доза-ответ с кривой эталонного препарата нормальной плазмы крови человека. После очистки FVII-СТР₃ хромогенная активность значительно улучшалась, а неактивные фракции отделяли главным образом на колонке с НА (**фигура 4**). Между хромогенной активностью FVII и выявлением FVII с помощью моноклональных антител к Gla в рамках вестерн-блоттинга наблюдалась сильная корреляция. На силу хромогенной активности FVII, отражающейся в значении EC50 в собранном материале, влияют как карбоксилированные, так и некарбоксилированные фракции FVII. После очистки и обогащения γ -карбоксилированной фракции FVII-СТР₃ активность улучшалась, что демонстрирует важный вклад γ -карбоксилирования в активность FVII (**фигура 4**). Этот параметр является критически важным для надлежащей активности FVII *in vivo*, и его будут дополнительно изучать в программе разработки клонов.

[0444] **Определение белка по A280**

[0445] Теоретический коэффициент экстинкции FVIIa-СТР₃ и NovoSeven® рассчитывали с помощью алгоритма ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam>). Расчет был основан на данных об аминокислотной последовательности. Расчетные коэффициенты экстинкции для FVII-СТР₃ и NovoSeven® составляют соответственно 1,186 и 1,406. Эти значения представляют поглощение при 1 г/л и 280 нм.

[0446] Различие в коэффициентах экстинкции между двумя белками обусловлено исключительно увеличением молекулярной массы FVIIa-СТР₃ по сравнению с NovoSeven®, поскольку СТР не имеет

ароматических и цистеиновых остатков и, таким образом, не вносит вклад в поглощение.

[0447] Определение белка по A280 применяют в отношении конечного FVII и в отношении очищенных образцов, отбираемых в ходе процесса, начиная с элюирования из колонки с VII-Select.

[0448] **Определение уровня антигена FVIIa**

[0449] Уровень антигена FVIIa определяли с помощью набора для ELISA FVIIa человека (IMUBIND, American Diagnostica). Рассчитывали уровень антигена в каждой партии. Однако, этот инструмент был неприменим для определения дозы для инъекции, поскольку он не представлял количество активного продукта.

[0450] **Анализ свертывающей активности FVIIa с помощью Staclot® VIIa-rTF**

[0451] FVIIa образуется в результате внутрипочечного расщепления одноцепочечного FVII. Нативный тканевой фактор (TF) является кофактором FVIIa. При связывании с TF FVII опосредует активацию фактора свертывания крови X с образованием Xa, а сам при этом превращается в FVIIa. Растворимый тканевой фактор представляет собой внеклеточную часть нативного тканевого фактора. Он больше не может активировать FVII путем самоактивации, однако FVIIa, связанный с тканевым фактором, может активировать FX с образованием FXa.

[0452] Специфичность рекомбинантного растворимого тканевого фактора (rsTF), используемого в данном анализе, к FVIIa используется для разработки теста свертывающей активности FVIIa. rsTF в присутствии FVIIa, кальция и фосфолипидов приводит к коагуляции плазмы крови, не активируя FVII с образованием FVIIa.

[0453] Наблюдаемое время свертывания крови в этой системе обратно пропорционально содержанию FVIIa в тестируемом образце и не искажается вследствие присутствия FVII в образце.

[0454] Анализ выполняли в Omri Laboratories (Нес-Циона, Израиль). Активность FVIIa оценивали как для NovoSeven® после разведения, так и для FVIIa-CTP₃ перед каждым исследованием. Активность NovoSeven® не коррелировала с предполагаемой активностью, указанной во флаконе, и при этом данное расхождение может быть обусловлено другим подходом к оцениванию активности.

В таблице 39 обобщенно представлена свертывающая активность FVIIa на единицу объема без учета концентрации белка.

Таблица 2. Свертывающая активность FVIIa в партиях продукта

Активность (ед./мл)	Исследование PK		Исследование выживаемости	
	FVIIa-3*CTP	NovoSeven®	FVIIa-3*CTP	NovoSeven®
	(FVIIa 31)		(FVIIa 38)	
	1,3E+06	2,5E+05	1,3E+06	7,4E+05

[0455] Удельная активность FVIIa-CTP₃

[0456] Удельную активность FVIIa (рассчитываемую как активность/мл, деленную на концентрацию белка) рассчитывали, исходя из значения A280, и она представлена в таблице 3. При сравнении удельной активности двух молекул, отличающихся по MW, следует вводить поправку с целью нормализации активности (т. е. вследствие различия в молекулярной массе количество активных центров в 1 мг NovoSeven® в 1,185 раза выше, чем в FVIIa-CTP₃). Расчет коэффициента перевода представлен в следующем уравнении:

$$\text{Нормализованная SA} = \frac{\text{SA (FVIIa-CTP}_3\text{)}}{\text{MW (нативный FVII)}} \times \text{MW (FVII CTP}_3\text{)}$$

$$= \frac{\text{SA (FVIIa CTP}_3\text{)}}{53419,5 \text{ Да}} \times 45079,1 \text{ Да} = \text{SA (FVIIa-CTP}_3\text{)} \times 1,185$$

Таблица 3. Удельная активность FVIIa-CTP₃ по сравнению с NovoSeven®

Образец	Сред- нее значе- ние A280	STDV (n=9)	% CV	Коеф- фици- ент экстин- кции	Концен- трация белка (мг/ мл)	ед. / мл	Удельная активность		Кратность умень- шения по сравнению с NovoSeven ®
							ед. / мг белка	ед. / мг FVIIa	
Novo Seven®	1,274	0,031	2,3 98	1,406	0,906	8,36 E+05	9,23E +05	9,23E +05	1,0
FVIIa-	4,396	0,092	2,0	1,186	3,706	7,23	1,95E	2,31E	4,0

СТР ₃			94			E+05	+05	+05	
------------------	--	--	----	--	--	------	-----	-----	--

[0457] **Исследование PK-PD FVIIa-СТР₃**

[0458] **Краткое изложение исследования**

[0459] FVIIa-СТР₃ и rhFVIIa (NovoSeven®, NS) вводили в виде однократной внутривенной инъекции мышам C57B с дефицитом FVIII в дозе 6,4Е6 ед./кг массы тела (160000 ед./животное). Образцы крови забирали из ретроорбитального синуса у 4 мышей по очереди через 0,166, 0,5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58 и 72 часа после введения дозы (таблица 4). Цитратную плазму крови (0,32%) получали сразу после отбора образцов и хранили при -20°C до проведения анализа. Оценивали уровень свертывающей активности FVIIa, и выполняли подробный анализ PK. Исследование выполняли в Omri Laboratories (Нес-Циона, Израиль).

Таблица 4. Краткое изложение исследования

Группы лечения	Исследуемый препарат	N животных/ группа/ момент времени	Путь введения дозы	Количество единиц/ животное	Инъецируемый объем (мкл)	Моменты времени (часы после введения дозы)
A	rhFVIIa	4	IV	1,6e5	200	0 (до введения дозы), 0,166, 0,5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58, 72
B	FVIIa-СТР ₃	4	IV	1,6e5	200	0 (до введения дозы), 0,166, 0,5, 2, 4, 8, 12, 24, 34, 48, 58, 72

[0460] **PK-профиль FVIIa-СТР₃ у мышей с дефицитом FVIII**

[0461] Активность FVIIa в образцах крови определяли количественно с помощью набора Staclot® VIIa-rTF (Stago, Парсиппани, Нью-Джерси). Фармакокинетический профиль рассчитывали для каждого белка, и в нем представлены средние значения для 4 животных в каждый момент времени. На **фигуре 5** представлен PK-профиль FVIIa на протяжении всего эксперимента.

Извлечение FVIIa представлено в таблице 6. Сводная информация о PK-параметрах представлена в таблице 7.

[0462] В таблице 5 обобщенно представлены значения свертывающей активности после введения NovoSeven® либо FVIIa-CTP₃. FVIIa-CTP₃ и NovoSeven® достигали максимальной активности через полчаса после введения дозы. Наиболее высокое значение активности NovoSeven® достигало только 43% от значения максимальной активности FVIIa-CTP₃. Свертывающая активность FVIIa-CTP₃ сохранялась в течение более длительного периода времени, что демонстрировало продолжительную активность. Свертывающая активность у мышей, получавших лечение с помощью NovoSeven®, была невыявляемой в моменты времени, более поздние, чем 12 часов, тогда как у мышей, получавших лечение с помощью FVII-CTP₃, продолжала сохраняться поддающаяся измерению активность через 48 часов после введения дозы (таблица 5 и фигура 5).

[0463] При добавлении трех копий CTP последовательно одна за другой к FVIIa степень извлечения повышалась на 100% (таблица 6) согласно измерению по наиболее высокой активности после введения дозы и по сравнению с предполагаемой активностью по результатам анализа *in vitro*, а период полувыведения и среднее время удержания (MRT) увеличивались в 5 раз. Время воздействия (AUC) увеличивалось в 3 раза (таблица 7).

Таблица 5. Свертывающая активность FVIIa после однократной IV инъекции

Время после введения (часы)	Средняя свертывающая активность FVIIa (ед./мл)	
	FVIIa-CTP ₃	NovoSeven®
0,16	6,8E+07	3,2E+07
0,5	9,7E+07	4,3E+07
2	2,1E+07	3,9E+06
4	7,7E+06	7,3E+05
8	2,7E+06	4,2E+04
12	3,7E+05	6,2E+03
24	2,4E+04	BLQ
34	4,6E+03	BLQ

48	1,5E+03	BLQ
----	---------	-----

Таблица 6. Извлечение FVIIa-CTP₃

Группы лечения	Исследуемый препарат	Количество единиц/животное	Практическая вводимая доза (ед./мл)	*Предполагаемая C _{max} (ед./мл крови)	C _{max} (ед./мл)	% степень извлечения
A	rFVIIa	1,60E+05	1,20E+06	1,40E+05	4,25E+04	30
B	FVIIa-CTP ₃	1,60E+05	1,29E+06	1,50E+05	9,74E+04	64,6

*предполагаемую C_{max} получают в результате деления вводимой дозы на объем крови

Таблица 7. PK-параметры FVIIa-CTP₃ в сравнении с NovoSeven®

PK-параметры	NovoSeven®	FVIIa-CTP ₃
Период полувыведения α -фаза (0,5-12 ч.)	0,94	1,57
Период полувыведения β -фаза (12-48 ч.)	NA	4,62
AUC (миллиед.*ч./мл)	5,80E+07	1,80E+08
Vd/кг (мл/кг)	1408	2375
CL/кг (мл/ч./кг)	1034	356
MRT (ч.)	1,3	6,7

[0464] Анализ образования тромбина (TGA)

[0465] Образование тромбина является ключевой частью каскада свертывания крови, и ввиду этого оценка того, как хорошо у конкретного индивидуума может образовываться тромбин, может коррелировать с риском развития кровотечения или тромбоза. Часто измеряемые при анализе образования тромбина переменные включают в себя лаг-период, время достижения пика образования тромбина, величину пика, эндогенный тромбиновый потенциал [ETP] (т. е. площадь под кривой и время инактивации), динамику показателей тромбограммы («TG»). После лаг-периода наблюдается всплеск образования тромбина. Однако, свертывание крови наблюдается в конце лаг-периода, когда более 95% всего тромбина еще не

образовалось. Анализ образования тромбина выполняли в Omri Laboratories с использованием реагентов от Thrombinoscope, дополненных плазмой крови человека с гемофилией. TGA отражает свертывающую способность в плазме крови мышей, обусловленную инъекцией NovoSeven® и FVIIa-CTP₃. На фигурах 6А–6С представлены значения параметров TGA в плазме крови мышей после введения FVIIa-CTP₃ либо NovoSeven®. После введения FVIIa-CTP₃ по всем трем параметрам (скорости образования тромбина, максимальному количеству образуемого тромбина и KIIa) демонстрируется преимущество лечения с помощью FVII-CTP₃ по сравнению с NovoSeven®. Это дополнительно подкрепляет представление о потенциальном превосходстве FVII-CTP₃ по сравнению с NovoSeven® с точки зрения пролонгированного действия.

[0466] **Исследование FVIIa-CTP₃ после рассечения хвостовой вены (TVT)**

[0467] **Краткое изложение исследования**

[0468] Данные, полученные в тесте PK/PD для FVIIa-CTP₃, обеспечили понимание функциональных возможностей FVIIa-CTP₃ и продемонстрировали, что FVIIa-CTP₃ обладает преимуществом по сравнению с NovoSeven® с точки зрения фармакокинетических параметров. Однако, способность белка индуцировать формирование сгустков крови *in vivo* после травматического события до сих пор не была продемонстрирована. С целью оценивания способности FVIIa-CTP₃ останавливать кровотечение ту же модель на мышах с дефицитом FVIII использовали для провокации кровотечением.

[0469] Мышам с дефицитом FVIII вводили однократную внутривенную инъекцию FVIIa-CTP₃ или NovoSeven®. Мышам вводили дозы лекарственных средств в количествах, обеспечивающих эквивалентную активность FVIIa (1,6E05 единиц, 200 мкл), рассчитанных в соответствии с удельной активностью каждого лекарственного средства, оцениваемой в анализе свертывающей активности FVIIa (таблица 8). Вводимые дозы составляли 9 мг/кг NovoSeven® и 40 мг/кг FVII-CTP₃ ввиду сниженной активности FVIIa-CTP₃. Контрольной группе инъецировали 200 мкл инертной среды.

[0470] Рассечение хвостовой вены проводили на расстоянии 2,7 см от кончика хвоста через 15 мин. (инъекция 1), 24 часа

(инъекция 2) или 48 часов (инъекция 3) после введения, и выживаемость мышей регистрировали в течение 24 часов.

Таблица 8. Оценивание инъецированных образцов

№ инъекции	NovoSeven®		FVIIa-СТР ₃				
	Концентрация белка (мг/мл)	Активность (ед./мл)	Удельная активность (ед./мг)	Концентрация белка (мг/мл)	Активность (ед./мл)	Удельная активность (ед./мг)	Удельная активность (нормализованная)
1	0,91	8,0E+05	8,8E+05	3,63	6,6E+05	1,8E+05	2,2E+05
2	0,92	8,3E+05	9,0E+05	3,81	7,8E+05	2,0E+05	2,4E+05
3	0,89	8,8E+05	9,9E+05	3,68	7,3E+05	2,0E+05	2,3E+05

[0471] Концентрацию белка определяли по A280.

[0472] **Результаты**

[0473] Данные из контрольных групп, которым инъецировали инертную среду, для трех инъекций (5 животных x 3 инъекции) были обобщены и представлены на **фигурах 7А–7D**. Через 24 часа после рассечения хвостовой вены наблюдалась 30% выживаемость.

[0474] У мышей, получавших лечение с помощью NovoSeven® и FVIIa-СТР₃, демонстрировалась надлежащая гемостатическая активность после рассечения хвостовой вены, выполняемого через 15 мин. после введения FVIIa. У животных, получавших лечение с помощью FVIIa-СТР₃ и NovoSeven® (**фигуры 7А–7D**), наблюдался 100% уровень выживаемости.

[0475] Снижение скорости очищения от FVII-СТР₃, которое демонстрировалось в исследовании PK/PD, является наиболее четко осознаваемым после рассечения хвостовой вены, выполняемого через 24 часа после введения. Наблюдалось падение уровня выживаемости при введении NovoSeven®. Как и в случае с контрольной группой, в рамках периода 10 часов наблюдалась 50% смертность. В то же время 90% мышей, получавших лечение с помощью FVIIa-СТР₃, выживали (**фигуры 7А–7D**). Данный результат подчеркивает долговременную эффективность лечения с помощью FVIIa-СТР₃.

[0476] Через 48 часов после введения в группах, получавших

лечение с помощью FVIIa-СТР₃ либо NovoSeven®, демонстрируется падение уровня выживаемости (**фигура 7С**). Наблюдалось небольшое улучшение у мышей, получавших FVIIa-СТР, но различие не достигало статистической значимости.

[0477] **Обсуждение**

[0478] В результате слияния СТР с рекомбинантными белками удлиняется период полувыведения белков из кровотока с сохранением ими при этом сравнимой активности. При том, что механизм, лежащий в основе снижения интенсивности очищения от белка, размер которого превышает пороговое значение 70 кДа, хорошо понятен в том, что касается почечного очищения, после слияния с СТР достигается дополнительная защита. Полагают, что в результате слияния с СТР вокруг белка формируется экранирование, которое защищает его от протеолитического расщепления, увеличивается его молекулярная масса в радиальном направлении ввиду его высокого отрицательного заряда и снижается его сродство к рецепторам, участвующим в печеночном очищении.

[0479] Настоящее исследование было направлено на обеспечение конкретного понимания влияния слияния СТР с FVII на период полувыведения белка и интенсивность очищения от него, а также изучение принципов, определяющих его удельную активность после данной модификации. Мышам с дефицитом FVIII вводили однократную IV инъекцию FVIIa-СТР₃ или рекомбинантного коммерческого FVIIa (NovoSeven®) в аналогичных дозах (по количеству единиц), и выполняли РК-анализ на основании активности. FVIIa-СТР₃ демонстрировал большую продолжительность существования, что отражалось соответственно в 5- и 3,5-кратном увеличении его периода полувыведения и AUC. Было показано, что удельная активность (ед./мг) FVIIa-СТР, рассчитанная с помощью набора для анализа активности Staclot®, деленная на концентрацию белка, измеренную при A280, была в 4-5 раз ниже, чем удельная активность NovoSeven®.

[0480] Для укрепления понимания того, как СТР влияет на гемостатические эффекты FVIIa *in vivo*, исследовали способность FVIIa-СТР₃ уменьшать кровотечение. В модели кровотечения после рассечения хвостовой вены в рамках модели на мышах с гемофилией

введение rFVIIa может обеспечивать улучшение уровня выживаемости животных, подвергнутых провокации, и избегание их смерти от потери крови. В исследовании, описываемом в данном документе, животным вводили FVIIa-CTP₃ или NovoSeven®. Обе молекулы были способны поддерживать гемостаз в случае выполнения рассечения через 0,25 часа после введения дозы. В группе, получавшей лечение с помощью FVIIa-CTP₃, демонстрировалась значительно увеличенная продолжительность активности в случае выполнения рассечения через 24 часа после введения дозы. Уровень выживаемости в группе, получавшей лечение инертной средой, был более высоким, чем предполагаемый, и более высоким, чем достигнутый в предыдущих исследованиях (50% в сравнении с 20% в предыдущих исследованиях, данные не показаны). Процентный уровень выживаемости животных, получавших лечение, дополнительно оценивали в более ранние моменты времени, в том числе через 36 ч. после введения дозы.

[0481] В заключение, было продемонстрировано, что FVIIa-CTP₃ характеризуется увеличенной продолжительностью активности у мышей с гемофилией, что приводит к большей продолжительности гемостатического эффекта по сравнению с NovoSeven®. Собранные данные позволяют предположить, что слияние CTP с FVII является технологией, обладающей потенциалом значительного улучшения профилактического лечения у пациентов с гемофилией.

ПРИМЕР 2

Биохимические свойства MOD-5014 по сравнению с коммерческим рекомбинантным hFVIIa – эффект карбоксиконцевого пептида (CTP) в отношении активности фактора свертывания крови VIIa

Обоснование и краткое описание проекта

[0482] Данные исследования были разработаны для оценки биохимических свойств MOD-5014 по сравнению с коммерческим рекомбинантным hFVIIa, называемым в данном документе MOD-5000.

[0483] В исследованиях изучали:

- Расщепление синтетического субстрата под действием MOD-5014
- Связывание MOD-5014 с тканевым фактором (TF), измеряемое по расщеплению синтетического субстрата

- Связывание MOD-5014 с TF, измеряемое по активации фактора свертывания крови X (FX)

- Кинетические параметры активации FX под действием MOD-5014, связанного с TF

- Связывание MOD-5014 с липидами, измеряемое по активации FX

- Кинетические параметры активации фактора свертывания крови под действием MOD-5014, связанного с липидами

- Инактивация MOD-5014 под действием антитромбина (АТ)

- Инактивация MOD-5014 под действием TFPI

[0484] В целом данные позволяют предположить, что по сравнению с MOD-5000 MOD-5014 обладает аналогичным механизмом действия при немного сниженной каталитической активности. Эти результаты демонстрировали немного сниженную активность MOD-5014, связанного с TF, и в некоторой степени более сниженную активность в несвязанном с TF состоянии.

[0485] Эти эффекты отражались главным образом в скорости реакций, а не в степени протекания реакций, и реакции, для которых можно измерить полную динамику, протекают до завершения.

[0486] Немного сниженная скорость ингибирования под действием АТ позволяет предположить удлинение периода полувыведения MOD-5014 in vivo при надлежащей чувствительности к ингибированию.

[0487] **Экспериментальные материалы**

- MOD-5014, GMP-1: 2,5 мг/мл (по A280)

- NovoSeven, № партии CU60430: 0,943 мг/мл (по A280), называемый MOD-5000.

[0488] **Расщепление синтетического субстрата под действием MOD-5014**

[0489] Обоснование. Расщепление синтетического субстрата должно зависеть исключительно от доступности функционального активного центра.

[0490] Способы. MOD-5000 и MOD-5014 разбавляли до равных молярных концентраций. В этих же концентрациях их затем добавляли к субстрату Pefachrome FVIIa (п-нитроанилиду метилсульфонил-D-циклогексилаланил-2-аминобутирилarginина) в

фиксированной концентрации, и расщепление субстрата отслеживали по появлению желтого окрашивания.

[0491] Результаты

[0492] Концентрации: FVIIa – 360 нМ; субстрат – 500 мкМ.

[0493] Анализ. Поглощение при 405 нм переводили в концентрацию п-нитроанилина с использованием известного коэффициента экстинкции. Концентрацию п-нитроанилина откладывали на графике в зависимости от времени для определения скорости расщепления

[0494] субстрата. Данные аппроксимировали уравнением:

$$\text{скорость} = k_1[\text{VIIa}];$$

[0495] $k_1 = 27,5$ моль п-NA/мин./моль VIIa.

[0496] Заключение. MOD-5000 и MOD-5014 характеризуются одинаковой скоростью расщепления субстрата в молярном выражении (фигура 8). Для последующих исследований измеренный показатель расщепления субстрата используют в качестве контроля для разбавления и отмеривания пипеткой.

Связывание MOD-5014 с TF, измеряемое по расщеплению синтетического субстрата

[0497] Обоснование. При связывании фактора свертывания крови VIIa с TF происходит конформационное изменение фактора свертывания крови VIIa, которое приводит к увеличению скорости расщепления субстрата. Это означает, что увеличенное расщепление субстрата можно использовать для отслеживания связывания фактора свертывания крови VIIa TF.

[0498] Способы. MOD-5000 и MOD-5014 в различных концентрациях добавляли к TF в фиксированной концентрации

[0499] и инкубировали в течение 5 минут. Добавляли субстрат (Pefachrome FVIIa). Расщепление субстрата отслеживали при 405 нм по появлению желтого окрашивания.

Результаты

[0500] Концентрации: FVIIa – 0–25 нМ; TF – 8,7 нМ; субстрат – 500 мкМ

[0501] Анализ. Поскольку концентрация TF значительно превышает ожидаемую K_d , то при низких концентрациях весь FVIIa должен связываться с TF. Скорость расщепления субстрата будет

соответствовать скорости для комплекса VIIa/TF. После того, как концентрация FVIIa превысит концентрацию TF, скорость расщепления субстрата должна упасть до скорости для свободного FVIIa. Поскольку FVIIa и TF образуют комплекс в молярном соотношении 1:1, то концентрация FVIIa, при которой происходит изменение скорости расщепления субстрата, является проверочной для оценочной концентрации FVIIa.

[0502] Данные аппроксимировали уравнением:

[0503] $\text{скорость} = k_1[\text{VIIa}] + k_x[\text{VIIa}/\text{TF}]$;

	MOD-5000	MOD-5014	
k_1	27,5	27,5	моль п-NA/мин./моль VIIa
k_2	365	357	моль п-NA/мин./моль VIIa/TF

[0504]

[0505] Заключение. MOD-5000 (NovoSeven) и MOD-5014 демонстрируют одну и ту же точку перегиба кривой при ожидаемой концентрации TF (8,7 нМ) (**фигура 9**). Это подтверждает точность молярных концентраций MOD-5000 и MOD-5014, предсказанных по расщеплению субстрата. Будучи связанным с TF, MOD-5014 характеризовался весьма немного более низкой скоростью расщепления субстрата (98%) по сравнению с MOD-5000 (**фигура 9**).

Связывание MOD-5014 с TF, измеряемое по активации фактора свертывания крови X

[0506] Обоснование. Расщепление FX под действием FVIIa является медленным по сравнению с расщеплением под действием комплекса FVIIa/TF. Поэтому связывание FVIIa с TF можно оценивать путем измерения скорости активации FX.

[0507] Способы. MOD-5000 и MOD-5014 в различных концентрациях добавляли к TF в фиксированной концентрации, и измеряли скорость активации FX. Активацию фактора свертывания крови X оценивали по расщеплению синтетического субстрата Refachrome FXa (паранитроанилида метоксикарбонил-D-циклогексилаланилглициларгинина). Интенсивность расщепления синтетического субстрата переводили в концентрацию FXa с помощью калибровочной кривой. Ни FVIIa, ни FVIIa/TF не расщепляют субстрат для FX с поддающейся оценке скоростью.

[0508] *Результаты*

[0509] Концентрации: FVIIa – 0–2 нМ; TF – 10 пМ; FX – 135 нМ; субстрат – 500 мкМ

[0510] Концентрация фактора свертывания крови X в плазме крови составляет 8 мкг/мл (~ 135 нМ).

[0511] Анализ. Скорость активации FX должна увеличиваться по мере связывания FVIIa с TF. После того, как весь TF будет насыщен FVIIa, скорость активации FX достигнет максимального значения (**фигура 10**).

[0512] Данные аппроксимировали уравнением:

$$v = V_{\max} \frac{[VIIa]^n + [TF] + K_d^n - \sqrt{([VIIa]^n + [TF] + K_d^n)^2 - 4[VIIa]^n[TF]}}{2[TF]}$$

	MOD-5000	MOD-5014	
$V_{\max}$	1.40	1.30	нМ FXa/мин.
K_d	3.3	3.0	пМ
Значение коэффициента Хилла	0.93	0.91	

[0513] Заключение. Наблюдается весьма небольшая отрицательная кооперативность (значение коэффициента Хилла < 1) связывания FVIIa с TF. Она является одинаковой для MOD-5000 и MOD-5014. Будучи связанным с TF, MOD-5014 характеризуется немного сниженной скоростью активации FX (93%) по сравнению с MOD-5000. Сродство MOD-5014 к TF эквивалентно сродству MOD-5000 (**фигура 10**).

Скорость активации FX в зависимости от концентрации FX

[0514] Обоснование. Небольшое снижение скорости активации для MOD-5014, связанного с TF, может быть следствием снижения сродства к FXa или снижения оборота FX после того, как он связывается с комплексом. При измерении скорости активации FX в зависимости от концентрации FX устанавливают кинетические параметры комплекса.

[0515] Способы. FX в различных концентрациях инкубировали с комплексом FVIIa/TF в фиксированной концентрации.

[0516] Активацию фактора свертывания крови X оценивали по расщеплению синтетического субстрата (Pefachrome FXa). Интенсивность расщепления синтетического субстрата переводили в

концентрацию FXa с помощью калибровочной кривой.

Результаты

[0517] Концентрации: FVIIa – 1 нМ; TF – 5 пМ; FX – 0–1500 нМ; субстрат – 500 мкМ

[0518] Анализ. Чем больше добавлялось FX, тем больше комплексов FVIIa/TF должны были связываться с FX вплоть до точки, в которой все комплексы FVIIa/TF были связаны с FX. В этой точке реакция ограничивалась скоростью, при которой активировался FX. Таким образом, скорость активации FX должна была увеличиваться с увеличением концентрации FX, асимптотически достигая максимального значения в соответствии с формой кривой (фигура 123).

[0519] Данные аппроксимировали уравнением:

$$v = V_{max} \left(\frac{[S]}{K_m + [S]} \right)$$

[0520]

		MOD-5000	MOD-5014	
	V_{max}	1.78	1.64	нМ FXa/мин.
[0521]	K_m	140	120	нМ

[0522] Заключение. Будучи связанным с TF, MOD-5014 характеризовался немного сниженным оборотом FX (92%) по сравнению с MOD-5000. Связывание FX с комплексом MOD-5014/TF было таким же, как и его связывание с комплексом MOD-5000/TF (фигура 11).

Связывание MOD-5014 с липидами, измеряемое по активации FX

[0523] Обоснование. Полагают, что активация фактора свертывания крови X на тромбоцитах вносит вклад в гемостатический эффект FVIIa. Полагают, что эта активность тромбоцитов имеет место в среде с низким содержанием TF или в отсутствие TF. Активацию фактора свертывания крови X без TF можно исследовать на липидных везикулах.

[0524] Способы. Активация фактора свертывания крови X под действием FVIIa на липидах зависит от связывания как фермента (FVIIa), так и белкового субстрата (FX). Соотношение липидов составляло PC:PE:PS 41:44:14 и было предназначено для имитации состава высокоактивированных тромбоцитов. Липиды получали в виде

больших однослойных везикул (200 нм). Везикулы в увеличивающихся концентрациях добавляли к FVIIa и FX. Активацию фактора свертывания крови X оценивали по расщеплению синтетического субстрата (Pefachrome FXa). Интенсивность расщепления синтетического субстрата переводили в концентрацию FXa с помощью калибровочной кривой.

Результаты

[0525] Концентрации: FVIIa – 20 нМ; FX – 500 нМ; липиды – 0–1000 мкМ; субстрат – 500 мкМ.

[0526] Анализ. Скорость образования FXa откладывали на графике в зависимости от концентрации липидных везикул (**фигура 12А**). Как и ожидалось, интенсивность образования FXa увеличивалась с увеличением концентрации липидов, поскольку для реакции становилась доступной большая площадь поверхности. При достаточно высокой концентрации липидов скорость реакции уменьшалась по мере разделения FVIIa и FX по различным липидным везикулам. Эта стереотипная реакция является ожидаемой для данной системы. Данные не аппроксимировали уравнением, и линии показаны только в качестве визуального ориентира. Различия в скорости образования FXa между MOD-5000 и MOD-5014 не были обусловлены различиями в сродстве к липидам. Это показано на **фигуре 12В**, где для каждого из них скорость образования FXa по отношению к максимальной отложена на графике в зависимости от концентрации липидов.

[0527] Заключение. Скорость активации FX в отсутствие TF является более низкой для MOD-5014 (~ 60%) по сравнению с MOD-5000. Сродство MOD-5014 к липидам является таким же, как и у MOD-5000.

Кинетические параметры активации FX под действием MOD-5014, связанного с липидами

[0528] Обоснование. Снижение скорости активации FX в отсутствие TF для MOD-5014 по сравнению с MOD-5000 может быть следствием снижения сродства к FXa или снижения оборота FX после того, как он связывается с ферментом на поверхности липидов.

[0529] Способы. FX в различных концентрациях инкубировали с FVIIa в фиксированной концентрации и липидными везикулами.

Активацию фактора свертывания крови X оценивали по расщеплению синтетического субстрата (Pefachrome FXa). Интенсивность расщепления синтетического субстрата переводили в концентрацию FXa с помощью калибровочной кривой.

Результаты

[0530] Концентрации: FVIIa – 20 нМ; FX – 0–2500 нМ; липиды – 100 мкМ; субстрат – 500 мкМ.

[0531] Анализ. Чем больше добавляется FX, тем больше FVIIa на поверхности липидов должно связываться с FX вплоть до точки, в которой весь FVIIa связан с FX. В этой точке реакция ограничивается скоростью, при которой активируется FX. Таким образом, скорость активации FX должна увеличиваться с увеличением концентрации FX, асимптотически достигая максимального значения в соответствии с формой кривой. Как и ожидалось, сродство FVIIa к FX снижается (более высокая K_m) в отсутствие TF, и скорость образования FXa снижается в отсутствие TF (фигура 13).

[0532] Данные аппроксимировали уравнением:

$$v = V_{max} \left(\frac{[S]}{K_m + [S]} \right)$$

	MOD-5000	MOD-5014	
V_{max}	0.253	0.115	нМ FXa/мин.
K_m	878	848	нМ FXa/мин.

[0533] Заключение. Скорость активации FX на поверхности липидов в отсутствие TF является более низкой для MOD-5014 (45%) по сравнению с MOD-5000. Связывание FX с MOD-5014 на поверхности липидов было таким же, как и его связывание с MOD-5000 (фигура 13).

Инактивация MOD-5014 под действием АТ

[0534] Обоснование. Полагают, что значительная часть очищения от FVIIa in vivo происходит посредством образования комплекса FVIIa и АТ. Скорость этой реакции поддается измерению in vitro только в том случае, если FVIIa связан с TF. Для того, чтобы реакция протекала in vitro с поддающейся измерению скоростью, также требуются высокие концентрации гепарина,

который, как полагает, имитирует эффекты встречающихся в природе гликозаминогликанов.

[0535] Способы. Фактор свертывания крови VIIa инкубировали с TF для обеспечения возможности образования комплекса. Комплекс инкубировали с АТ и гепарином. Реакцию останавливали через рассчитанные по времени интервалы путем добавления полибрена (бромид гексадиметрина) для нейтрализации гепарина. Остаточную активность FVIIa/TF измеряли по расщеплению синтетического субстрата (Pefachrome FVIIa). В концентрациях, используемых в анализе, полибрен не изменял расщепление субстрата.

Результаты

[0536] Концентрации: FVIIa – 10 нМ; TF – 11 нМ; АТ – 1 мкМ; гепарин – 5 ед./мл; FVIIa/TF – 8,2 нМ; полибрен – 100 мкг/мл; субстрат – 500 мкМ.

[0537] Анализ. Концентрацию FVIIa/TF, измеренную по скорости расщепления субстрата, откладывали на графике в зависимости от времени в минутах (фигура 14). Как и ожидалось, комплекс АТ/гепарин ингибировал FVIIa, приводя к потере активности FVIIa/TF.

[0538] Данные аппроксимировали уравнением:

[0539]

$$V_{t=0}e^{-k * \text{время}}$$

	MOD-5000	MOD-5014	
V_0	11.89	11.93	
k	0.354	0.217	мин ⁻¹

[0540] Заключение. Сходные значения активности в момент времени T=0 указывают на то, что в реакционной смеси присутствовали равные количества MOD-5000 и MOD-5014. Ингибирование MOD-5014 происходило немного более медленно (62%), чем MOD-5000 (фигура 14). Обе реакции протекали до полного ингибирования.

Инактивация MOD-5014 под действием TFPI

[0541] Обоснование. TFPI является физиологическим ингибитором комплекса FVIIa/TF. Домен K2 TFPI изначально

образует комплекс с FXa. Этот комплекс связывает FVIIa/TFPI, где домен K1 TFPI взаимодействует с FVIIa. Таким образом, активация FX под действием FVIIa/TF должна приводить к ингибированию комплексов и к прекращению функционирования FVIIa-TFPI.

[0542] Способы. Факторы свертывания крови VIIa и TF инкубировали вместе с образованием комплекса. Комплекс добавляли к субстрату для TFPI/FX/FXa. Активацию фактора свертывания крови X оценивали по расщеплению синтетического субстрата (Pefachrome FXa). Интенсивность расщепления синтетического субстрата переводили в концентрацию FXa с помощью калибровочной кривой.

Результаты

[0543] Концентрации для ингибирования: FVIIa – 1 нМ; TF – 20 пМ; FX – 135 нМ; TFPI – 0–5 нМ; субстрат – 500 мкМ.

[0544] Анализ. Как и ожидалось, изначально образование FXa происходило при одной и той же скорости во всех реакциях (**фигуры 15A–C**). В присутствии TFPI скорость образования FXa уменьшалась по мере ингибирования комплекса FVIIa/TFPI под действием TFPI/FXa (нижние две панели). Прекращение функционирования комплексов TFPI происходило быстрее при более высоких концентрациях TFPI (нижние две панели). Количество FXa, образующегося до прекращения функционирования FVIIa/TFPI, является мерой взаимодействия TFPI с FVIIa/TF. Поскольку MOD-5014 характеризуется немного сниженной скоростью образования FXa, вследствие чего образование комплексов FXa/TFPI будет замедляться, для достижения плато реакции требуется больше времени в случае с MOD-5014, чем в случае с MOD-5000.

[0545] Заключение. Как показано на верхней панели, концентрационная зависимость ингибирования под действием TFPI, оказываемого в отношении образования FXa под действием MOD-5014/TF, является весьма сходной с таковой для MOD-5000. MOD-5014 может быть немного более чувствительным к ингибированию под действием TFPI (124%); в качестве альтернативы, это может быть артефактом, обусловленным небольшим уменьшением скорости образования FXa.

ПРИМЕР 3

ПОЛУЧЕНИЕ СТР-МОДИФИЦИРОВАННОГО АКТИВИРОВАННОГО ФАКТОРА

СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ VII

[0546] *Цель*

[0547] Целью способа получения была разработка процесса накопления биомассы путем культивирования с периодической подпиткой с помощью технологии рекомбинантных ДНК с использованием клеток CHO в среде с химически определенным составом и последующего устойчивого и масштабируемого процесса выделения и очистки продукта, в ходе которого очищается высокогликозилированный и характеризующийся высоким уровнем гамма-карбоксилирования MOD-5014. Другими словами, это получение и очистка MOD-5014 с наиболее высоким уровнем гамма-карбоксилирования и эффективное удаление технологических и производственных примесей. Было важно провести анализ в отношении О-гликанов, N-гликанов, процентного содержания сиаловой кислоты, окисленных родственных форм, удельной активности (тестируемой с помощью анализа STA-CLOT), процентного содержания доменов Gla (или, в качестве альтернативы, процентного содержания некарбоксилированных остатков глутаминовой кислоты) и процентного содержания неактивированного FVII.

[0548] *Процедура получения*

[0549] *Трансфекция и отбор стабильных клонов*

[0550] кДНК, кодирующую MOD-5014, вводили путем трансфекции в клетки CHO (DHFR-отрицательные клетки CD DG44, приспособленные для роста в безбелковой среде и суспензионного роста), и получали стабильные клоны посредством стадий предельного разведения. Клоны с наиболее высокой продуктивностью размножали, и конечный клон отбирали для дальнейшей разработки.

[0551] На протяжении всего процесса получения главного и рабочего банков клеток (MCB; WCB) использовали среды, не содержащие компонентов животного происхождения. Стабильные клоны выделяли посредством стадий предельного разведения в ходе культивирования клеток. Клоны с наиболее высокой продуктивностью размножали с помощью селективного средства в увеличивающихся концентрациях. На основании уровня удвоения клональной популяции (PDL), продуктивности образования СТР-модифицированного фактора

свертывания крови VII (пикограммов на клетку в день, PCD) и максимальной достигаемой плотности клеток в выбранной среде выделяли клоны с наиболее высокой продуктивностью, и их использовали для получения банков клеток для R&D с последующим получением сертифицированного главного банка клеток (MCB) и рабочего банка клеток (WCB).

[0552] *Процесс накопления биомассы*

[0553] Стабильный клон клеток CHO, экспрессирующих MOD-5014, высевали из одного флакона из главного банка клеток (MCB) (стадия 1 на фигуре 16) и постадийно размножали до уровня, характерного для биореакторов объемом 1000 л или 2000 л, в бессывороточной среде с химически определенным составом, дополненной витамином K, с использованием подхода периодического культивирования с подпиткой (стадии 2-4 на фигуре 16).

[0554] Надосадочную жидкость производственной культуры клеток тестировали в отношении бионагрузки, наличия бактериальных эндотоксинов, продуктивности и наличия занесенных вирусов. Процесс выполняли с использованием биореакторов объемом 50 л и 200 л для засева биореакторов (стадия 3 на фигуре 16) и биореакторов объемом 1000 или 2000 литров для увеличения масштаба (стадия 4 на фигуре 16). Все поверхности, контактирующие с продуктом, были одноразовыми, тогда как многоразовое оборудование, контактирующее с продуктом, было предназначено специально для продукта. Эти части оборудования очищали и подвергали санитарной обработке между процедурами получения партий. Культуру размножали до уровней, характерных для биореакторов объемом 50 л и 200 л, перед высеванием в биореактор объемом 1000 л или 2000 л. Конечное увеличение масштаба и производство в биореакторе путем периодического культивирования с подпиткой выполняли в одноразовых биореакторах объемом 2000 л. Извлечение клеток осуществляли с помощью одноразовой фильтрационной системы (глубинного фильтра Millipore).

[0555] Размножение клеток осуществляли в производственном биореакторе объемом 1000 или 2000 литров (стадия 4, фигура 16).

[0556] Культуру инкубировали в биореакторе в течение

приблизительно 11 дней (в зависимости от жизнеспособности клеток) при 37°C, 50% содержании растворенного кислорода (DO) и pH 7,1. В ходе прогона pH сдвигали до 6,9 до сбора материала, добавляли подпитку (Cell Boost 6) и добавляли витамин K₃. Кроме того, в биореактор добавляли DMSO. К культуре добавляли подпитку в виде раствора глюкозы с целью поддержания желаемой концентрации, и добавляли болюсную дозу 1 М бикарбоната натрия с целью поддержания желаемой концентрации культуры. Сбор материала выполняли с использованием предварительно определенных критериев. В течение первых четырех дней ежедневно отбирали образцы культуры клеток для определения числа и жизнеспособности клеток и анализа метаболических процессов. Начиная с дня 5, образцы культуры отбирали дважды в день для определения числа и жизнеспособности клеток и анализа метаболических процессов, а начиная с дня 9 – для определения удельной продуктивности с помощью способа ELISA или аффинной HPLC.

[0557] В примере, представленном в данном документе, используется режим периодического культивирования с подпиткой, однако специалист в данной области может разработать перфузионный режим при использовании в целом аналогичных схем выращивания и очистки. В качестве альтернативы, специалист в данной области может разработать перфузионный способ, в котором продолжительность инкубирования может составлять вплоть до 7-120 дней.

[0558] Сбор и хранение клеток (стадия 5 на фигуре 16)

[0559] Сбор материала выполняли с использованием одноразовой технологической линии фильтрации. Для осветления собранного материала выполняли глубинную фильтрацию и фильтрацию через фильтр с размером пор 0,2 мкм. После осветления следовала фильтрация через фильтр с размером пор 0,45/0,2 мкм. Глубинные фильтры промывали струей жидкости, и остаточную жидкость выдували воздухом из системы. Процесс фильтрации выполняли при скорости работы насоса ≤ 15 л/мин. и максимальном определяемом давлении. После этого фильтры промывали буфером трис-HCl и продували сжатым воздухом для увеличения степени извлечения продукта.

[0560] Осветленный собранный материал тестировали в отношении бионагрузки, наличия бактериальных эндотоксинов, содержания специфического белка с помощью способа ELISA или аффинной HPLC, SDS-PAGE, вестерн-блоттинга, анализа методом ELISA HCP, наличия остаточной ДНК, наличия вирусов с помощью анализа *in vitro*, наличия вирусоподобных частиц, S+L- бляшек и микоплазм.

[0561] *Процесс очистки и активации*

[0562] Схема очистки описана на фигуре 17. Процесс очистки был основан на использовании четырех хроматографических колонок. Белок очищали с помощью аффинной хроматографии, хроматографии на наполнителях смешанного типа, хроматографии гидрофобных взаимодействий и анионообменной хроматографии. Белок активировали на стадии анионообменной хроматографии. Процесс очистки также включал стадии инактивации вирусов и нанофильтрации.

[0563] Ультрафильтрация и диафильтрация 1 – UF/DF-1 (стадия 6)

[0564] Осветленный собранный материал концентрировали и подвергали диафильтрации посредством стадий ультрафильтрации и диафильтрации (UF/DF) на основе метода тангенциальной поточной фильтрации (TFF). Величина порога номинального отсечения по молекулярной массе для картриджа составляла 30 кДа. Концентрированный и подвергнутый диафильтрации собранный материал тестировали в отношении содержания специфического белка с помощью способов ELISA, аффинной HPLC, а наличие эндотоксинов и бионагрузку оценивали с помощью SDS-PAGE, вестерн-блоттинга и/или ELISA HCP.

[0565] Инактивация вирусов путем инкубирования (стадия 7)

[0566] Материал фильтровали через фильтр с размером пор 0,22 мкм в стерильный мешок для смешивания. Затем добавляли раствор для инактивации вирусного содержимого, например, к конечному объему фильтрата добавляли раствор трис/10% Triton с доведением концентрации Triton до 1% (вес/вес). После инкубирования перед загрузкой в колонку для аффинной хроматографии раствор продукта вновь фильтровали с помощью

фильтровального элемента с размером пор 0,2 мкм. Отфильтрованный продукт после инактивации вирусов тестировали в отношении наличия эндотоксинов и бионагрузки с помощью анализов методом SDS-PAGE и вестерн-блоттинга.

[0567] Аффинная хроматография (стадия 8)

[0568] На этой стадии использовали колонку для аффинной хроматографии. Колонку упаковывали до предварительно определенной высоты слоя. Эту стадию выполняли за 2-4 цикла в зависимости от количества продукта. Специфический белок в загружаемом материале определяли перед добавлением Triton ввиду искажения показателей, вызываемого Triton в анализе. Колонку для аффинной хроматографии уравнивали, и в нее загружали объединенный материал после инактивации вирусов, а затем ее промывали. Проводили второе промывание, и материал элюировали и затем хранили при 2-8°C для обработки на следующий день. Все стадии хроматографии проводили в режиме нисходящего потока.

[0569] Элут тестировали в отношении содержания специфического белкового продукта, наличия эндотоксинов, остаточной ДНК, содержания сиаловой кислоты, процентного уровня гамма-карбоксилирования, содержания заряженных N-гликанов, наличия остаточного выщелоченного аффинного лиганда и бионагрузки с помощью методик, хорошо известных из уровня техники, в том числе посредством определения поглощения при 280 нм, RP-HPLC, ATEX HPLC, SEC-HPLC, ELISA HCP, SDS-PAGE и вестерн-блоттинга.

[0570] Хроматография на мультимодальных матрицах или наполнителях смешанного типа (стадия 9)

[0571] На этой стадии использовали колонку, упакованную смолой для хроматографии на мультимодальных матрицах или наполнителях смешанного типа. Колонку упаковывали до предварительно определенной высоты слоя. Стадию выполняли за 1-4 цикла в зависимости от количества продукта. Колонку уравнивали, и в нее загружали разбавленный элюат после аффинной хроматографии, ее промывали, и элюат собирали и хранили при 2-8°C до дальнейшей обработки. Элут тестировали в отношении содержания специфического белкового продукта, наличия

эндотоксинов, остаточной ДНК, содержания сиаловой кислоты, процентного уровня гамма-карбоксилирования, содержания заряженных N-гликанов, наличия остаточного выщелоченного аффинного лиганда и бионагрузки с помощью методик, которые включали определение поглощения при 280 нм, RP-HPLC, ATEX HPLC, SEC-HPLC, ELISA HCP, SDS-PAGE и вестерн-блоттинг.

[0572] Хроматография гидрофобных взаимодействий (HIC) (стадия 10)

[0573] На этой стадии использовали смолу для HIC. Колонку упаковывали до предварительно определенной высоты слоя. Хроматографию методом HIC выполняли за 1-4 цикла в зависимости от количества продукта. Загружаемый материал для HIC получали путем внесения в элюат белка из колонки для хроматографии на мультимодальных матрицах или наполнителях смешанного типа сульфата аммония в качестве добавки. Колонку уравнивали, и в нее загружали содержащий добавку и профильтрованный через фильтр с размером пор 0,2 мкм элюат из колонки для хроматографии на мультимодальных матрицах или наполнителях смешанного типа, а затем ее промывали. Продукт элюировали, а затем хранили при 2-8°C до дальнейшей обработки. Элюат тестировали в отношении концентрации специфического белка посредством определения поглощения при 280 нм и SEC-HPLC. Элюат также тестировали в отношении наличия эндотоксинов и бионагрузки.

[0574] Ультрафильтрация и диафильтрация элюата после HIC (стадия 11)

[0575] Элюат после HIC концентрировали и подвергали диафильтрации для уменьшения объема и получения материала для стадии прохождения через колонку для анионообменной хроматографии. После того, как было определено, что pH и электропроводность находятся в надлежащем диапазоне, систему осушали, и материал фильтровали в стерильный мешок посредством стадий фильтрации через фильтр с размером пор 0,5/0,2 мкм. Конечный объем концентрированного и подвергнутого диафильтрации элюата после HIC хранили при 2-8°C до дальнейшей обработки. Элюат тестировали в отношении содержания специфического белкового продукта, наличия эндотоксинов, остаточной ДНК,

содержания сиаловой кислоты, процентного уровня гамма-карбоксилирования, содержания заряженных N-гликанов, наличия остаточного выщелоченного аффинного лиганда и бионагрузки с помощью методик, которые включали определение поглощения при 280 нм, RP-HPLC, AIEH HPLC, SEC-HPLC, ELISA HCP, SDS-PAGE и вестерн-блоттинг.

[0576] Анионообменная хроматография (стадия 12)

[0577] На этой стадии использовали колонку, упакованную смолой для анионообменной хроматографии. Колонку упаковывали до предварительно определенной высоты слоя. Загружаемый материал представлял собой концентрированную подвергнутую диафильтрации фракцию элюата после НИС. Активация FVII с образованием FVIIa происходила в колонке для анионообменной хроматографии. После стадии активации и промывания продукт элюировали и собирали для дальнейшей обработки. При необходимости регулировали pH элюата. Элюат затем фильтровали через фильтр с размером пор 0,45/0,2 мкм. Материал хранили при 2–8°C до дальнейшей обработки. Все стадии хроматографии выполняли в режиме нисходящего потока. Элюат тестировали в отношении концентрации специфического белка, наличия остаточной ДНК и бионагрузки посредством определения поглощения при 280 нм, RP-HPLC, AIEH HPLC, SEC-HPLC, ELISA HCP, SDS-PAGE и вестерн-блоттинга.

[0578] Удаление вирусов путем нанофильтрации (стадия 13)

[0579] Удаление вирусов выполняли с помощью фильтра для удаления вирусов Asahi Planova 20N. Фильтр с мембраной с размером пор 0,45/0,2 мкм или 0,1 мкм использовали в качестве фильтра предварительной очистки перед нанофильтром (фильтром Planova 20N). Фильтр Asahi Planova 20N предварительно уравнивали и подвергали первичной обработке элюирующим буфером для анионообменной хроматографии или конечным составом, полученным с буфером для состава. Элюат после анионообменной хроматографии пропускали через линию фильтрации при постоянном давлении и собирали в стерильный биотехнологический мешок. Линию фильтрации (фильтр Planova) промывали струей элюирующего буфера для анионообменной хроматографии или буфера для состава для максимального увеличения извлечения продукта. Фильтр тестировали

в отношении целостности до и после использования в соответствии с процедурами, рекомендованными производителем. Тест после использования включает тест на удержание частиц коллоидного золота, также в соответствии с процедурой, предусмотренной производителем. Материал после фильтрации вирусов тестировали в отношении содержания специфического белка путем определения поглощения при 280 нм, RP-HPLC, AIEH HPLC, SEC-HPLC, SDS-PAGE. Материал после фильтрации вирусов также тестировали в отношении наличия эндотоксинов и бионагрузки.

[0580] UF/DF-3 и фильтрация и хранение лекарственной субстанции (DS) (стадия 14)

[0581] Материал после фильтрации вирусов концентрировали до достижения целевой концентрации DS (которая может варьироваться в диапазоне 2–100 мг/мл) в препарате для фильтрации в потоке и розлива. Последняя стадия включала фильтрацию посредством стерильной фильтрации через фильтр с размером пор 0,2 мкм. На этой стадии использовали кассету одноразового или многоразового применения с порогом отсечения 3–30 кДа. Продукт концентрировали на первой стадии до достижения концентрации 5–25 мг/мл белка и подвергали диафильтрации (DF) с добавлением 20 мМ цитрата, 150 мМ NaCl, 13,3 мМ глицина, pH 6,4 или 20 мМ цитрата, 100 мМ аргинина, 2% трегалозы, pH 6,2 (≥ 7 DF-объемов). Объединенный материал после UF/DF-3 тестировали в отношении содержания специфического белка посредством определения поглощения при 280 нм. Объединенный материал после UF/DF-3 также тестировали в отношении наличия эндотоксинов и бионагрузки.

[0582] Конечную концентрацию продукта корректировали, и добавляли полисорбат-80 (PS-80) до достижения конечной концентрации 0,04%. В качестве альтернативы, добавление не производили. Содержащий добавку продукт, подвергнутый UF/DF-3, фильтровали с помощью фильтра Millipak 100 или Millipak 200. Отфильтрованные растворы продукта разделяли на аликвоты и замораживали при температуре $70 \pm 5^\circ\text{C}$. Составленный объединенный материал тестировали в отношении концентрации продукта путем определения A280. Буфер для состава представлял собой 20 мМ цитрата, 100 мМ аргинина, 2% трегалозу, 0,04% PS80 при pH 6,2.

[0583] *Результаты*

[0584] В процессе очистки применялись захват и очистка MOD-5014, характеризующегося высоким уровнем гамма-карбоксилирования, в ходе стадии хроматографии на мультимодальных матрицах (фигура 21) с получением продукта в виде высокогликозилированного MOD-5014. Кроме того, изначальное процентное содержание высокогликозилированного MOD-5014 определяется процессом накопления биомассы культуры клеток и остается постоянным на протяжении всего процесса очистки (фигура 19). Процесс демонстрировал высокую эффективность удаления технологических примесей, таких как окисленные формы и другие родственные формы, в ходе стадий очистки с помощью хроматографии на мультимодальных матрицах и НИС (фигура 20) и приводил к получению высококачественного продукта.

[0585] Анализ очищенного продукта MOD-5014 методом SDS-PAGE в восстанавливающих условиях показан на фигуре 18. Были идентифицированы следующие выделенные продукты (см. нумерацию справа): 75 кДа – неактивированная форма MOD-5014 (1); 55 кДа – тяжелая цепь MOD-5014-СТР-СТР-СТР (2); 25 кДа – легкая цепь MOD-5014 (4); низкомолекулярные (LMW) формы (3, 5 и 6).

[0586] В таблице 9 показаны результаты производственных процессов для проектного прогона (ER) и различных прогонов в соответствии с GMP (процесс, соответствующий надлежащей производственной практике) в двух разных контрактных производственных организациях (СМО). Подробные данные включают удельную активность, процентное содержание (%) неактивированного MOD-5014, процентное содержание (%) окисленной формы; процентную долю (%) некарбоксилированных остатков глутаминовой кислоты (долю без доменов Gla), содержание сиаловой кислоты (моль/моль) и содержание О-гликанов (моль/моль).

Таблица 9. Характеристики качества очищенного MOD-5014

Способ	СМО-1		СМО-2	
	ER	GMP1	GMP1	GMP2
Удельная активность (ед./мг)	15,563	16,720	22,478	23,608
Неактивированный FVII	2,7	2,4	2,6	3,0
Окисленные формы (%)	4,0	4,9	2,9	3,9
Доля без доменов Gla (%)	5,4	5,5	0,6	0,6
Сиаловая кислота (моль/моль)	17,1	17,1	18,4	17,2
О-гликаны (моль/моль)	12,3	13,2	13,2	12,5

[0587] Кроме того, результаты, полученные в СМО-1, показали, что процентная доля заряженных N-гликанов составляла 85,3 (ER) и 84,2 (GMP1).

[0588] *Заключение*

[0589] В заключение следует отметить, что был разработан крупномасштабный производственный процесс периодического культивирования с подпиткой, подходящий для обеспечения клинической разработки и коммерческого производства MOD-5014. Результаты подтверждают, что этот процесс является воспроизводимым производственным процессом периодического культивирования с подпиткой для получения высокогликозилированного FVIIa-СТР пролонгированного действия (MOD-5014). Очищенный продукт MOD-5014 характеризовался высокими уровнями содержания О-гликанов и сиаловой кислоты. Очищенный продукт характеризовался минимальными уровнями неактивированного FVII и долей без доменов Gla (некарбоксилированных остатков Glu).

ПРИМЕР 4

Получение лекарственного препарата (DP)

[0590] Процесс составления лекарственного препарата (DP) начинается с размораживания лекарственной субстанции (DS). Лекарственный препарат получают путем разбавления лекарственной субстанции (DS) до необходимой концентрации с помощью буфера для

состава или розлива без разбавления, асептической фильтрации и розлива в стандартные флаконы 2R или другую первичную упаковку, такую как картриджи или предварительно заполненные шприцы. Специалисту в данной области будет понятно, что термин «лекарственная субстанция» (DS) может охватывать активный фармацевтический ингредиент (API) или быть эквивалентным ему. В одном варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII, изложенный в данном документе, представляет собой лекарственную субстанцию (DS), содержащую нерасфасованное очищенное лекарственное средство. Специалисту в данной области также будет понятно, что термин «лекарственный препарат» (DP) может охватывать конечное составленное лекарственное средство после дозирования в конечный контейнер, например, флакон, в асептических условиях. В одном варианте осуществления СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII, изложенный в данном документе, представляет собой лекарственный препарат (DP), содержащий конечный составленный СТР-модифицированный фактор свертывания крови VII.

[0591] Определение характеристик СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII

[0592] Содержание СТР-модифицированного полипептида в собранном материале и процентное содержание высокогликозилированных форм определяют с помощью специфического способа RP-HPLC. Общий белок в собранном материале определяют с помощью анализа по методу Бредфорда. Процентная доля специфического белка в собранном материале, выработанном выбранным клоном, превышает 70% по отношению к количеству общего белка в собранном материале. Кроме того, производственный процесс накопления биомассы разработан для обеспечения высокой процентной доли высокогликозилированного СТР-модифицированного белка по сравнению с низкогликозилированной формой. Высокогликозилированная форма является целевой формой, поскольку она дает в результате большее удлинение периода полувыведения СТР-модифицированного полипептида.

[0593] Содержание О-гликанов

[0594] Исследование углеводного состава выполняют путем

высвобождения гликанов с последующим мечением гликанов 2-аминобензамидом (2AB), очисткой и анализом с помощью NP-HPLC. Вкратце, анализ содержания О-гликанов проводят для расчета количества молей О-гликанов на моль СТР-модифицированного фактора свертывания крови VII. Концевые галактозные звенья О-гликанов подвергаются ферментативному отщеплению от белка под действием β -галактозидазы. Эти свободные галактозные звенья отделяют на колонке CarboPac PA20 и выявляют с помощью импульсной амперометрии. Галактозу (Gal) оценивают количественно с помощью внешней калибровки по эталонному стандарту галактозы. Содержание галактозы может быть прямо пропорционально содержанию О-гликановой структуры Gal-GalNAc. Анализ партий лекарственной субстанции и лекарственного препарата демонстрирует устойчивую однородность характеристик продукции от партии к партии. Этот неожиданно устойчивый уровень гликозилирования является значительным и демонстрирует, что количество О-гликанов в расчете на один СТР является улучшенным по сравнению с известным из уровня техники.

[0595] Интактные образцы для анализа молекулярной массы

[0596] Анализ молекулярной массы в различных партиях DS выполняют с целью получения информации о количестве сайтов О-связанного гликозилирования. Интактные образцы, а также образцы, десилилированные с помощью нейраминидазы, и образцы, де-О-гликозилированные с помощью О-гликозидазы, анализировали с помощью LC/ES-MS в режиме реального времени. Результат, демонстрирующий высокую % степень занятости сериновых остатков, является неожиданным при сравнении с уровнями, известными из уровня техники (только 4 гликозилированных сериновых остатка по сравнению с количеством до 6 в СТР-модифицированном факторе свертывания крови VII, получаемом в данном документе).

[0597] Занятость сайтов О-связанного гликозилирования в образцах СТР-модифицированных белков

[0598] Определение степени занятости сайтов О-связанного гликозилирования в 4 различных партиях DS выполняют в M-Scan с целью получения информации о количестве сайтов О-связанного гликозилирования в расчете на одну молекулу. Образцы

десиалилируют с помощью нейраминидазы с последующим расщеплением трипсином восстановленных/карбоксиметилированных образцов. В заключение осуществляют LC/ES-MS в режиме реального времени в отношении обработанных образцов и проводят интерпретацию данных MS с помощью специализированного программного обеспечения. Оценивание данных, полученных в анализе смесей после расщепления трипсином, дает сигналы, обеспечивающие возможность картирования 100% последовательности белка. О-гликозилирование может иметь место в области как N-концевого, так и C-концевого СТР. Занимаемые сайты определяются как сериновые остатки после пролина, а также два из четырех сериновых остатков в областях сериновых повторов. В общей сложности до 18 сериновых остатков могут служить в качестве сайтов присоединения О-гликанов. Между партиями не было выявлено значительных различий.

[0599] Чистота

[0600] В ходе RP-HPLC молекулы разделяются в соответствии с их полярностью. Для элюирования молекул с сильной полярностью раньше, чем менее полярных молекул, используется градиент подвижной фазы от более полярного растворителя к менее полярному. Родственные формы отделяют от нативного белка с помощью UV-детектирования при 220 нм. Относительные значения площадей пиков (% площади) для родственных форм и главного пика можно рассчитать путем интегрирования соответствующих площадей пиков. Главный пик лекарственной субстанции и лекарственного препарата составляют более 97% площади пиков, что указывает на высокую степень очистки продукта и эффективный процесс очистки.

[0601] Эксклюзионная HPLC представляет собой хроматографическую методику, в ходе выполнения которой молекулы разделяются в соответствии с размером. В рамках выбранного диапазона фракционирования более крупные молекулы элюируются раньше, чем молекулы меньшего размера. Механизм разделения является неадсорбционным, и молекулы элюируются в изократических условиях. SEC обеспечивает отделение мономеров от форм целевой молекулы с более высокой молекулярной массой (таких как димеры и полимеры). Способ SEC разработан для анализа содержания димеров и полимеров в лекарственной субстанции и лекарственном

препарате.

[0602] Способ определения содержания с помощью RP-HPLC

[0603] Данный способ применяют для определения содержания промежуточных образцов и определения % содержания негликозилированного СТР-модифицированного полипептида в промежуточных образцах с помощью обращенно-фазовой хроматографии. В ходе обращенно-фазовой HPLC молекулы разделяются вследствие своей полярности. Относительно неполярные молекулы связываются с материалом колонки, тогда как заряженные и полярные молекулы элюируются без осуществления взаимодействия с колонкой.

[0604] Связанные молекулы элюируются при использовании градиента от полярного раствора к менее полярному. Вначале элюируются молекулы с наиболее сильной полярностью, а затем менее полярные молекулы. Выявление осуществляют посредством определения поглощения при 214 нм.

[0605] Очищение от вирусов

[0606] Объектом предварительного оценивания была способность производственного процесса обеспечивать разрешение вопросов, связанных с заражением конечного лекарственного препарата эндогенными и занесенными вирусами, и уменьшение его степени. Исследование, соответствующее требованиям GLP, проводили в соответствии с применимым руководством для исследуемых препаратов с использованием трех модельных вирусов, добавляемых в известном количестве в сегменты производственного процесса в уменьшенном масштабе для количественной оценки способности этих стадий обеспечивать инактивацию добавленной в известном количестве популяции вирусов или очищение от нее. С учетом того, что количество вируса выражается в виде $\log_{10}$ -скорректированного титра, то $\log_{10}$ -фактор очищения определяется попросту путем вычитания выходного значения из входного значения. Факторы очищения в виде показателей $\log_{10}$ складывают с получением общего фактора очищения для всех оцениваемых стадий. A-MuLV считается модельным вирусом, представляющим возможное присутствие ретровирусов в клетках CHO, и в результате мер, предпринимаемых для инактивации и удаления вируса A-MuLV,

достигался фактор очищения, составляющий по меньшей мере antilog_{10} , например, логарифмический фактор снижения вирусной нагрузки (LRF), составляющий примерно 22, что демонстрирует, что процесс в целом характеризуется исключительной эффективностью удаления вирусов. Для PPV, который представляет собой небольшой резистентный безоболочечный вирус, достигается устойчивое удаление посредством стадии нанофльтрации.

[0607] Хотя в данном документе были проиллюстрированы и описаны определенные признаки настоящего изобретения, средним специалистам в данной области придут на ум многие модификации, замены, изменения и эквиваленты. Поэтому следует понимать, что прилагаемая формула изобретения предполагает охват всех таких модификаций и изменений, находящихся в пределах сущности настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая полипептид, являющийся активным фактором свертывания крови VII (FVIIa) человека, модифицированным карбоксиконцевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина человека и фармацевтически приемлемый носитель, для поддержания гомеостаза после кровотечения от легкого до умеренного у субъекта, где указанный полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVIIa, содержит три молекулы СТР, присоединенные последовательно одна за другой к С-концу FVIIa, где указанный полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVIIa, находится в по существу чистой и активной форме, при этом указанный полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVIIa, содержит:

а. высокое содержание сиаловой кислоты, составляющее по меньшей мере 15 моль/моль;

б. высокогликозилированную форму, включающую содержание О-гликанов, составляющее по меньшей мере 10 моль/моль; и

с. низкое содержание окисленной формы указанного СТР-модифицированного FVIIa, составляющее менее 5% окисленной формы;

где указанный СТР-модифицированный FVIIa состоит из аминокислотной последовательности, приведенной под SEQ ID NO: 7.

2. Композиция по п. 1, где кровотечение от легкого до умеренного происходит во время и/или после хирургического вмешательства или травмы.

3. Композиция для профилактического лечения гемофилии у субъекта, нуждающегося в этом, содержащая полипептид, являющийся активным фактором свертывания крови VII (FVIIa) человека, модифицированным карбоксиконцевым пептидом (СТР) хорионического гонадотропина человека и фармацевтически приемлемый носитель, для поддержания гомеостаза после кровотечения от легкого до умеренного у субъекта, где указанный полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVIIa, содержит три молекулы СТР, присоединенные последовательно одна за другой к С-концу FVIIa, где указанный полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVIIa, находится в по существу чистой и активной форме, при этом указанный полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVIIa, содержит:

а. высокое содержание сиаловой кислоты, составляющее по меньшей мере 15 моль/моль;

б. высокогликозилированную форму, включающую содержание О-гликанов, составляющее по меньшей мере 10 моль/моль; и

с. низкое содержание окисленной формы указанного СТР-модифицированного FVIIa, составляющее менее 5% окисленной формы;

где указанный СТР-модифицированный FVIIa состоит из аминокислотной последовательности, приведенной под SEQ ID NO: 7.

4. Композиция по п. 3, где указанное профилактическое лечение снижает риск развития кровотечения и ассоциированных осложнений у субъекта или снижает риск развития спонтанного кровотечения у субъекта.

5. Композиция по любому из пп. 1-4, где указанный полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVIIa, содержит высокое процентное содержание карбоксилированных остатков глутаминовой кислоты (Gla).

6. Композиция по п. 5, где высокое процентное содержание карбоксилированных остатков глутаминовой кислоты (Gla) составляет по меньшей мере 90% остатков Gla.

7. Композиция по любому из пп. 1-6, где по меньшей мере 60% по существу чистой и активной формы СТР-модифицированного FVIIa содержит высокое процентное содержание карбоксилированных остатков глутаминовой кислоты (Gla).

8. Композиция по любому из пп. 1-7, где указанный полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVIIa, содержит по меньшей мере 60% заряженных N-гликанов.

9. Композиция по п. 8, где указанное процентное содержание заряженных N-гликанов составляет приблизительно 85.3% или 84.2%.

10. Композиция по любому из пп. 1-9, где указанный полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVIIa, содержит удельную активность, составляющей по меньшей мере 10500 ед./мг.

11. Композиция по п. 10, где указанный полипептид, являющийся СТР-модифицированным FVIIa, содержит удельная активность приблизительно 15563 ед./мг, 16720 ед./мг, 22478 ед./мг или 23608 ед./мг.

12. Композиция по любому из пп. 1-11, где степень чистоты по существу чистого и активного полипептида, являющегося СТР-модифицированным FVIIa, составляет по меньшей мере 90% или выбрана из 97,3%, 97,6%, 97,4% и 97,0%.

13. Композиция по любому из пп. 1-12, где указанный субъект страдает нарушением коагуляции или свертывания крови.

14. Композиция по п. 13, где указанное нарушение коагуляции или свертывания крови представляет собой гемофилию, гемофилию А или гемофилию В.

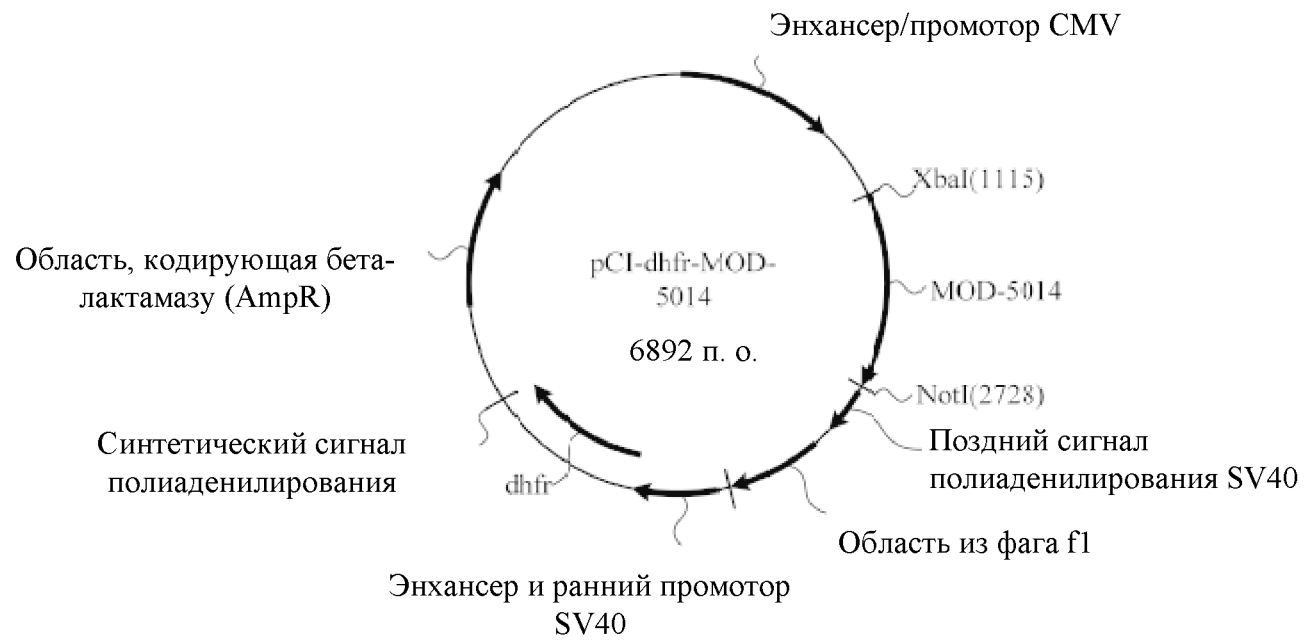
15. Композиция по любому из пп. 1-14, где указанный субъект имеет ингибирующие антитела.

16. Композиция по любому из пп. 1-14, где указанная композиция снижает риск выработки ингибирующих антител к экзогенно вводимым факторам свертывания крови.

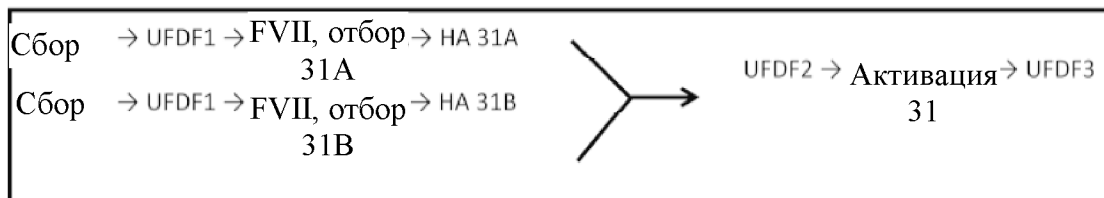
17. Композиция по любому из пп. 1-16, где аминокислотная последовательность указанного СТР-модифицированного представлена в структурном отношении в виде двухцепочечного гетеродимера, содержащего дисульфидный (S-S) мостик между цистеиновым остатком 135 и цистеиновым остатком 262 в SEQ ID NO: 7.

18. Композиция по п. 17, где указанные две цепи включают в себя легкую цепь, содержащую аминокислоты 1-152, и тяжелую цепь, содержащую аминокислоты 153-490 из SEQ ID NO: 7.

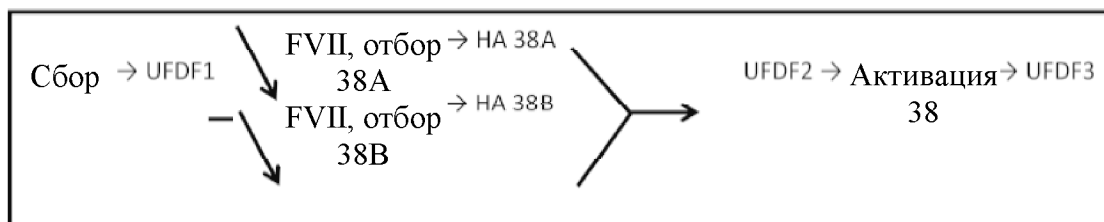
По доверенности



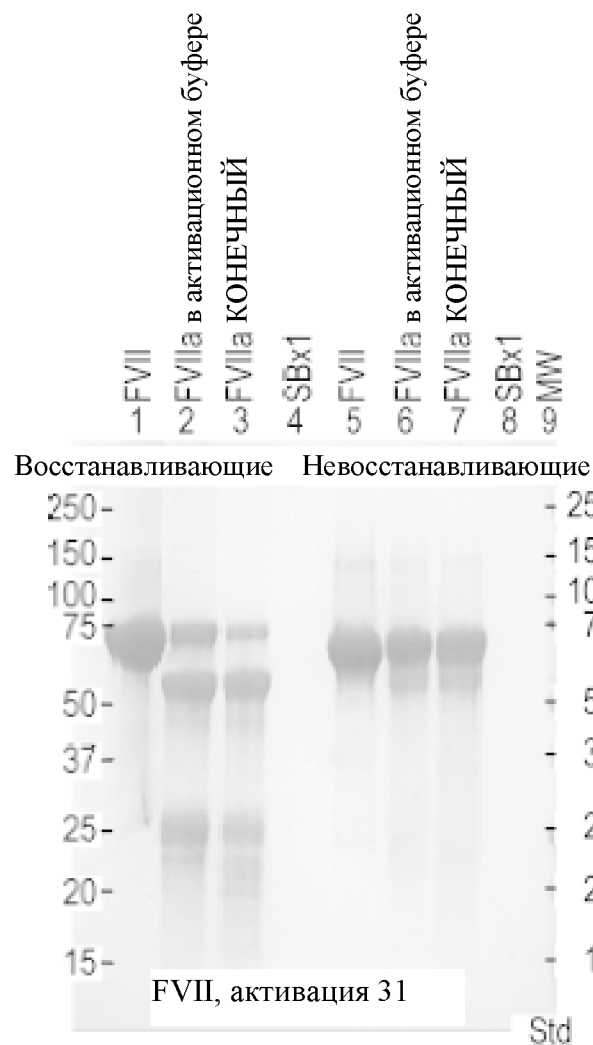
ФИГУРА 1



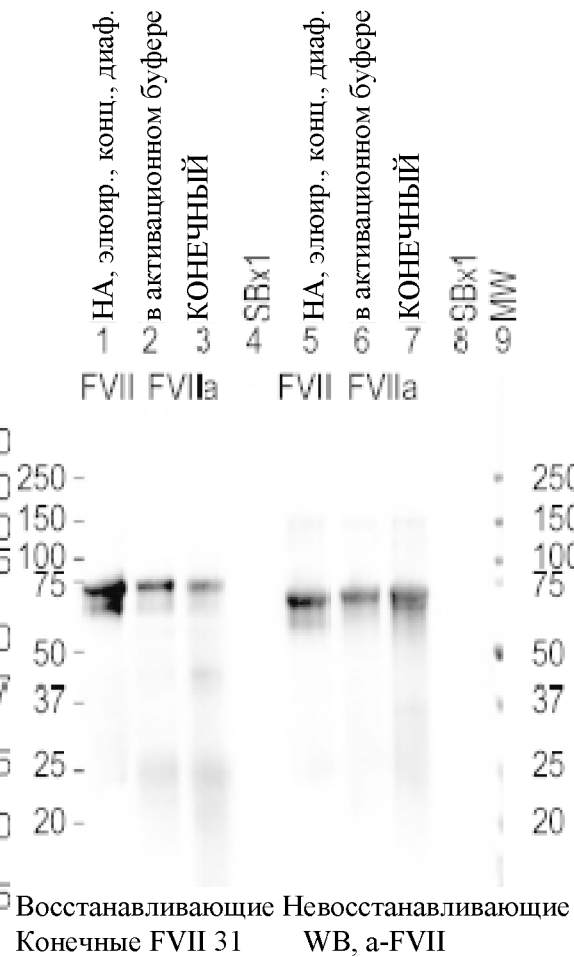
ФИГУРА 2А



ФИГУРА 2В



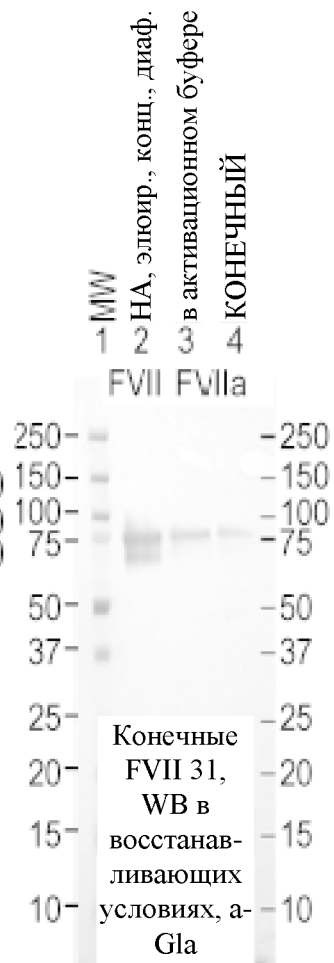
ФИГУРА 3А



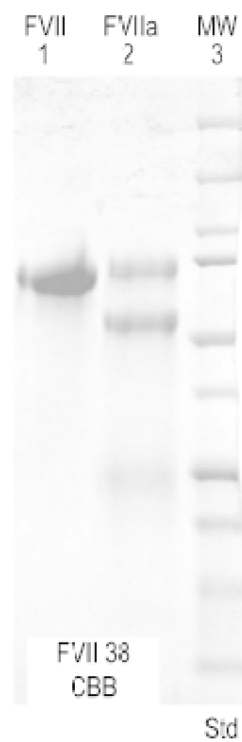
ФИГУРА 3В



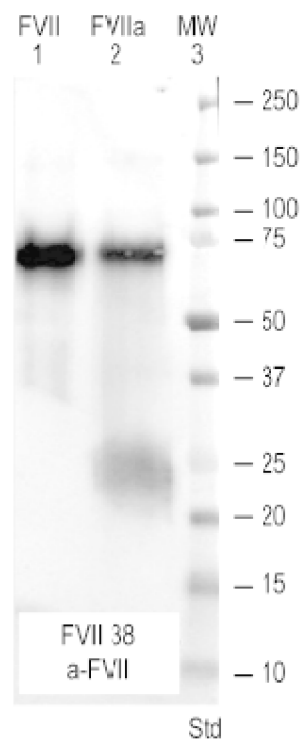
ФИГУРА 3С



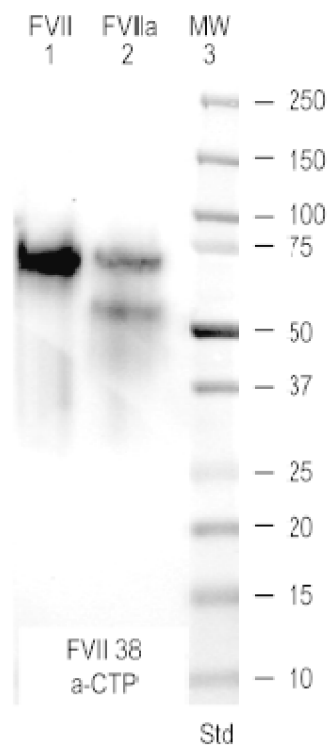
ФИГУРА 3D



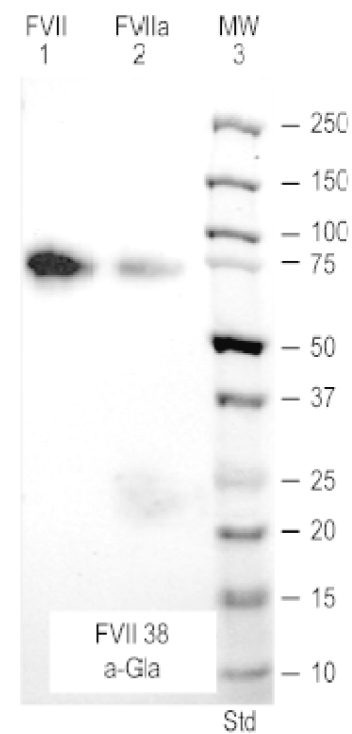
ФИГУРА 3Е



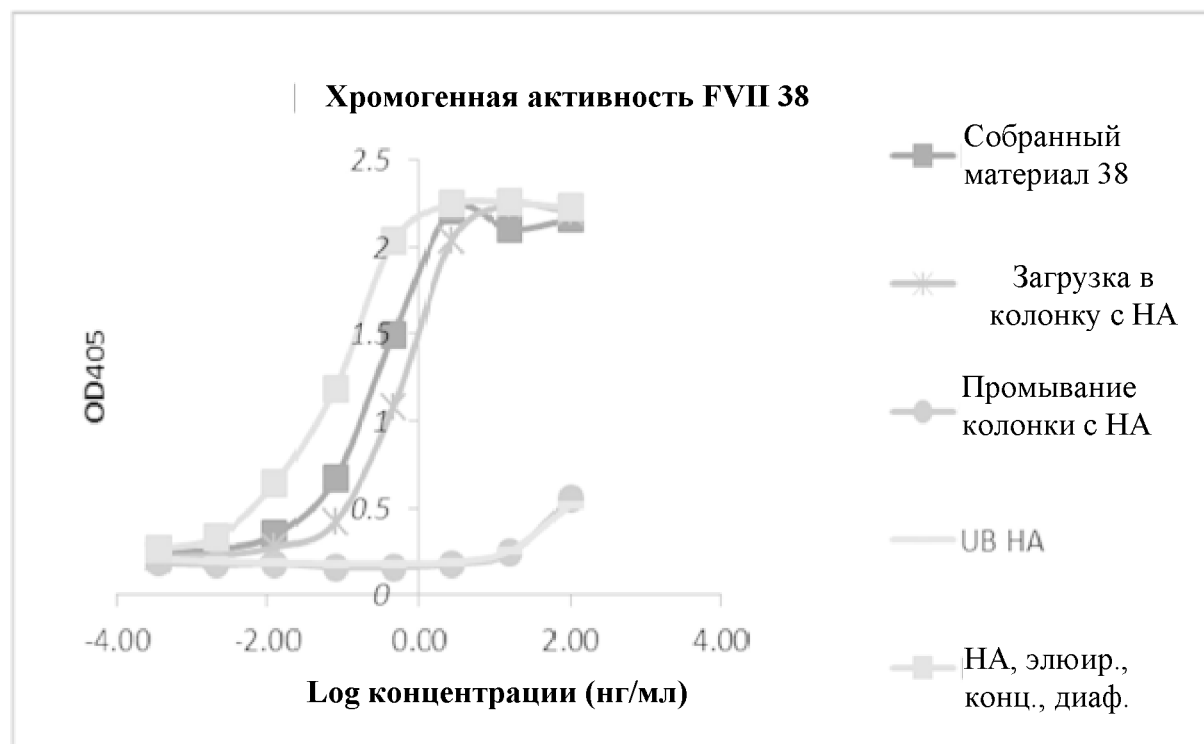
ФИГУРА 3F



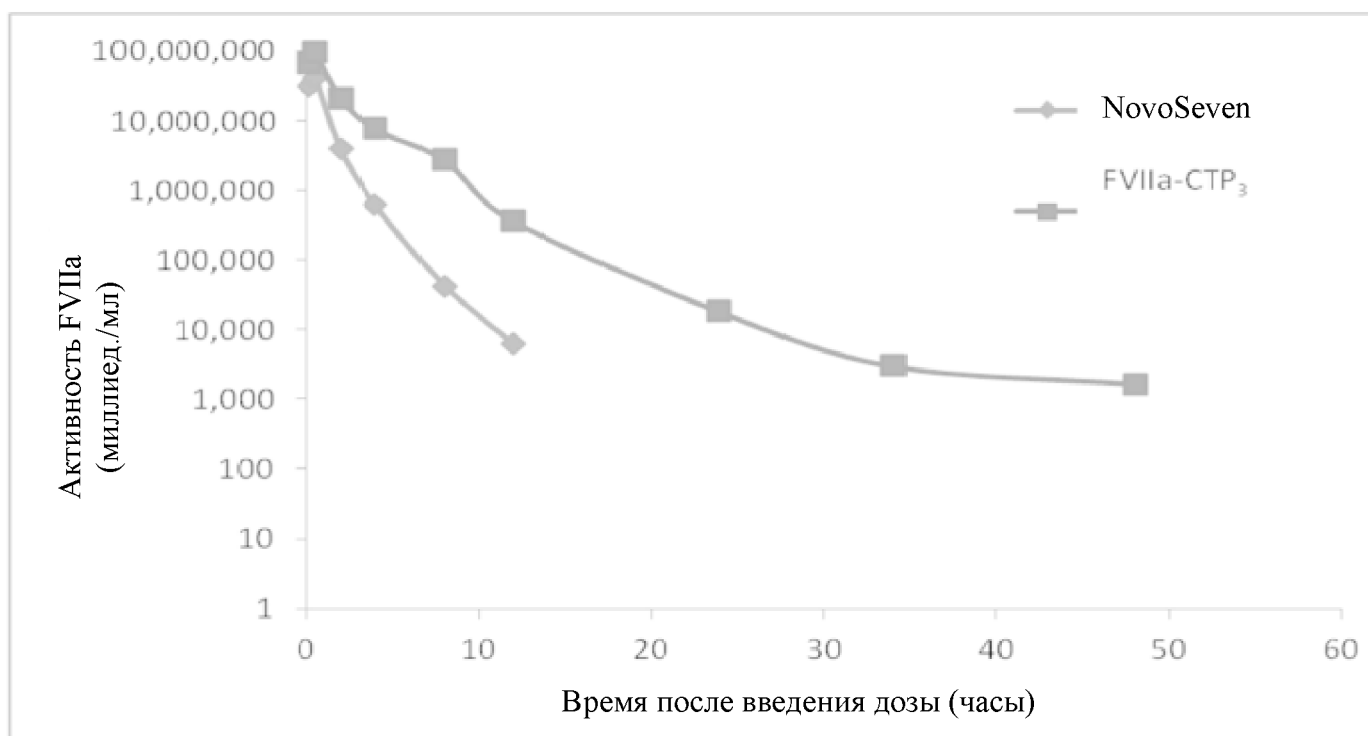
ФИГУРА 3G



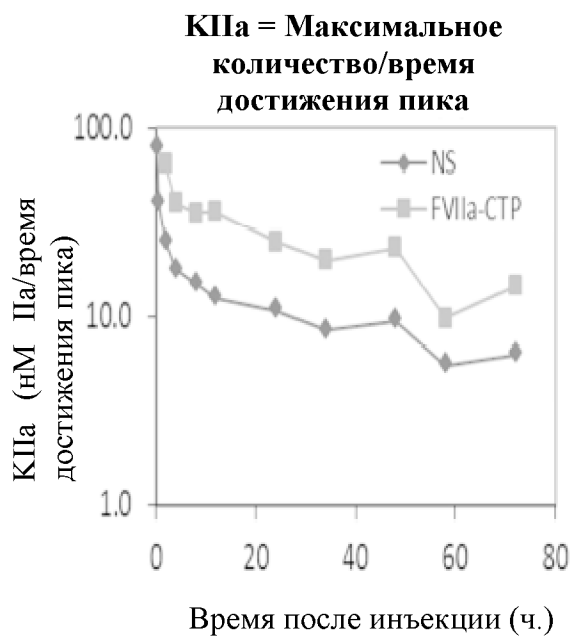
ФИГУРА 3H



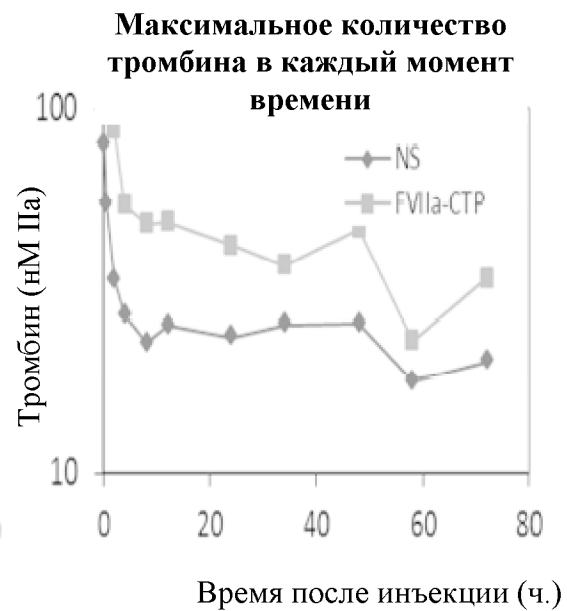
ФИГУРА 4



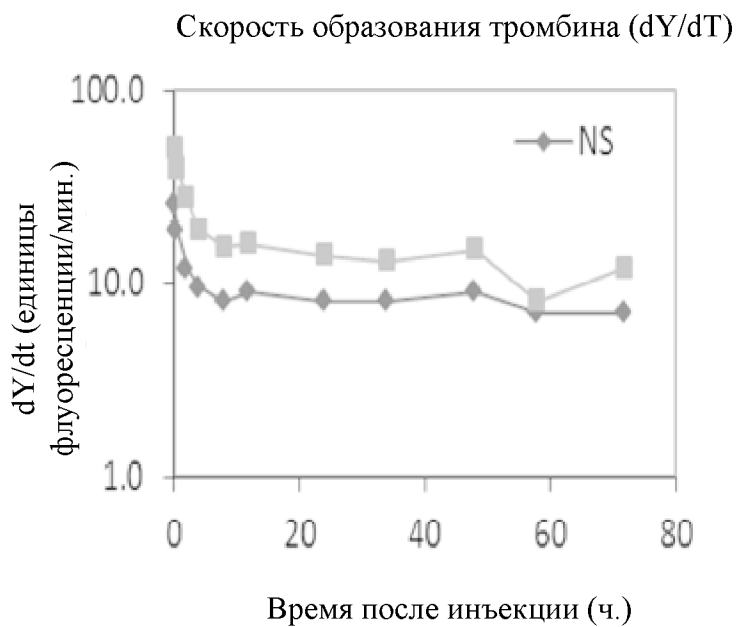
ФИГУРА 5



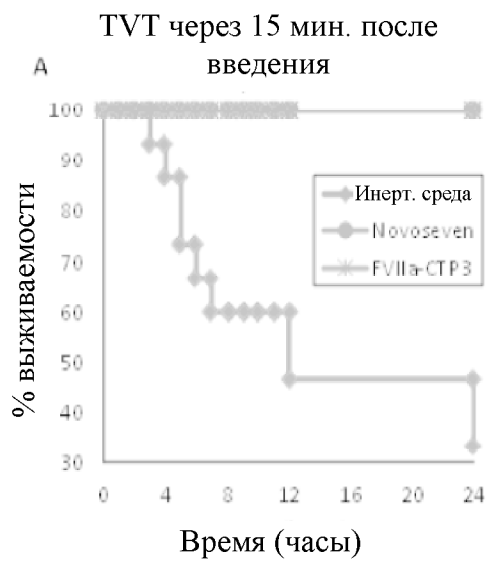
ФИГУРА 6А



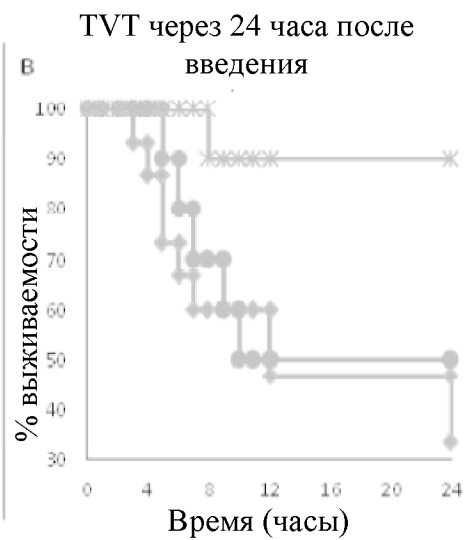
ФИГУРА 6В



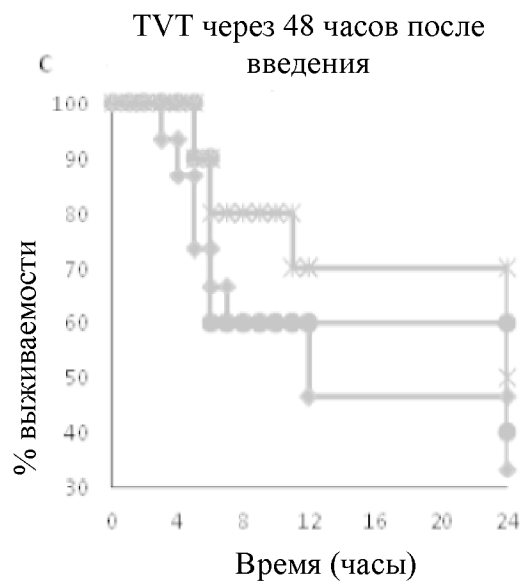
ФИГУРА 6С



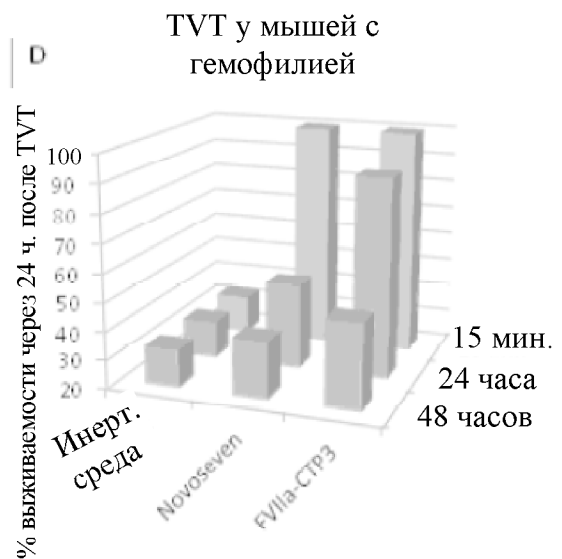
ФИГУРА 7А



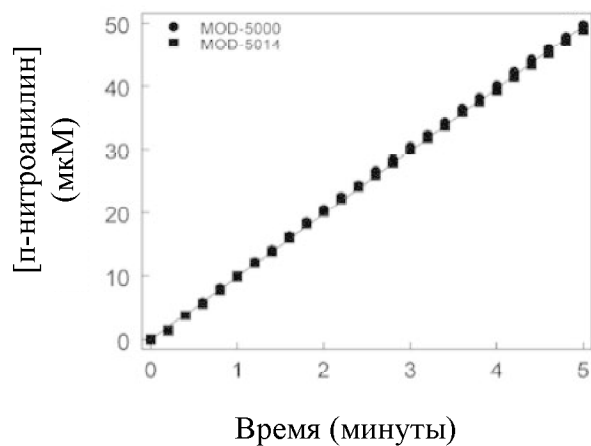
ФИГУРА 7В



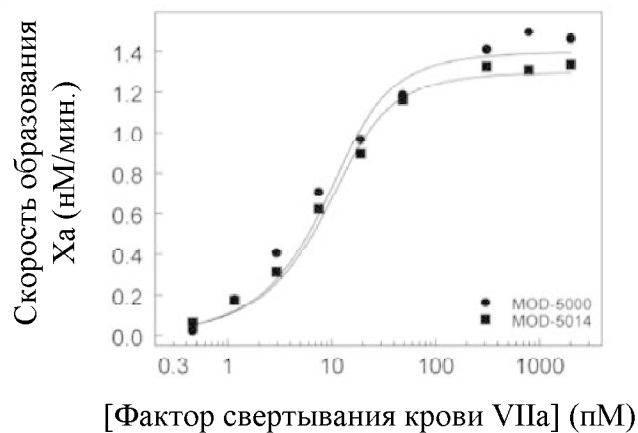
ФИГУРА 7С



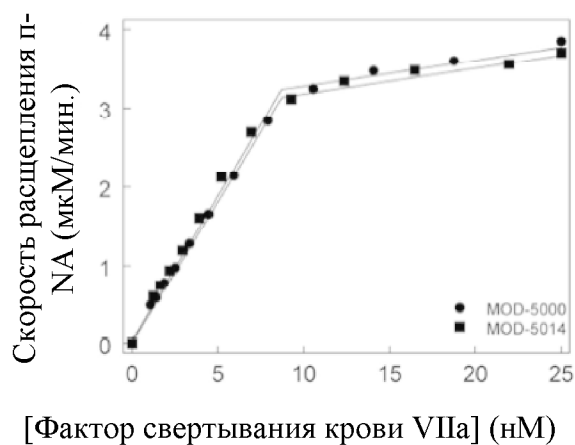
ФИГУРА 7D



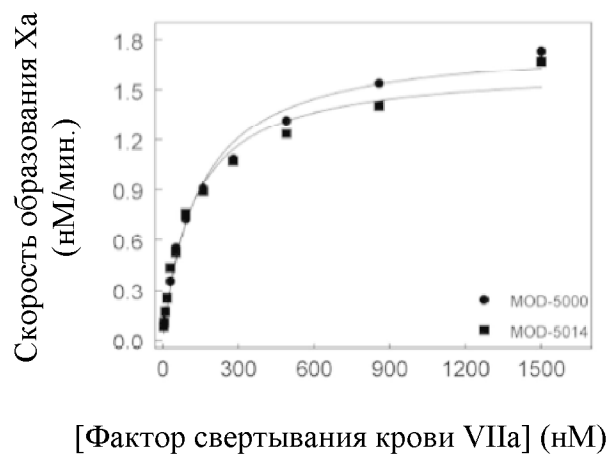
ФИГУРА 8



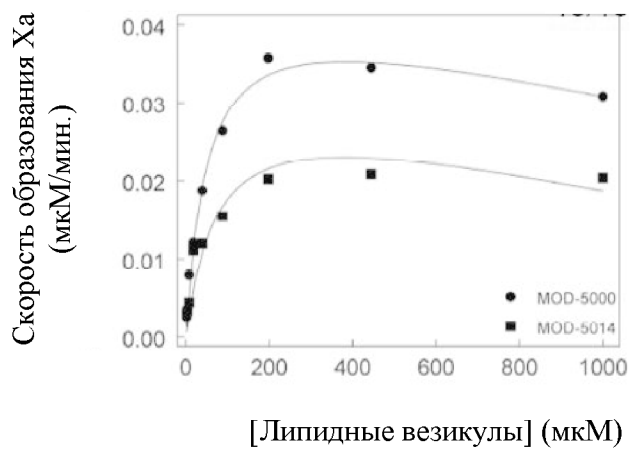
ФИГУРА 10



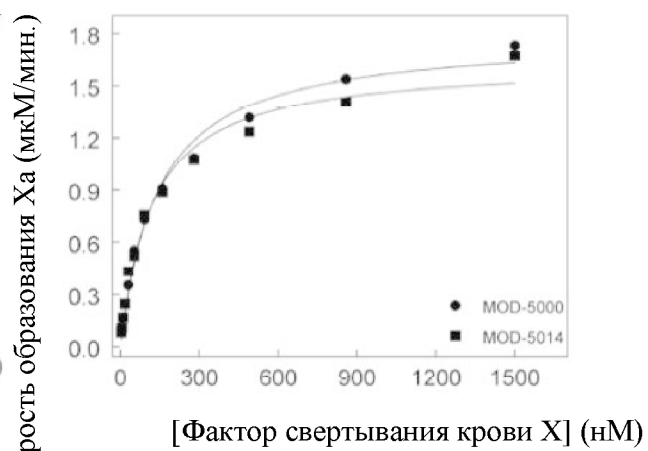
ФИГУРА 9



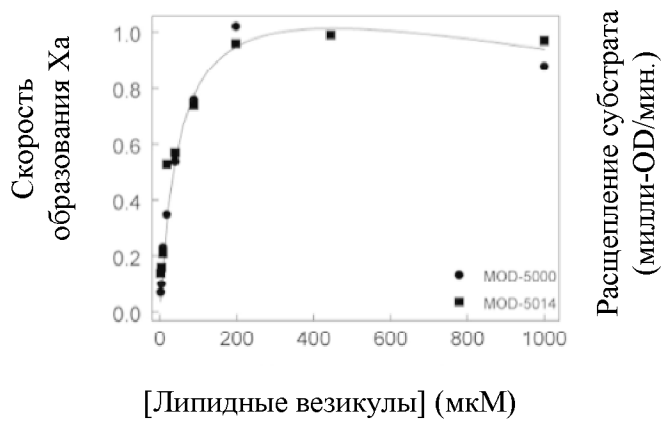
ФИГУРА 11



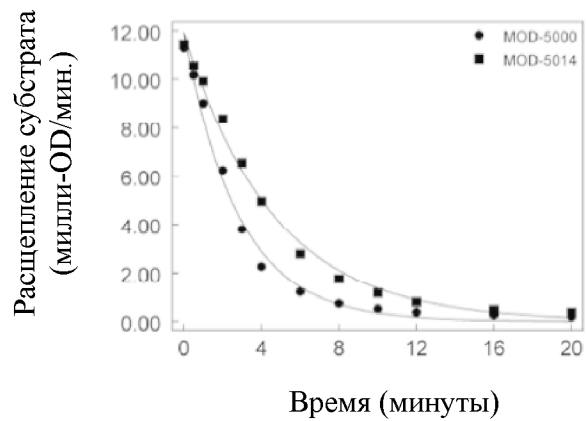
ФИГУРА 12А



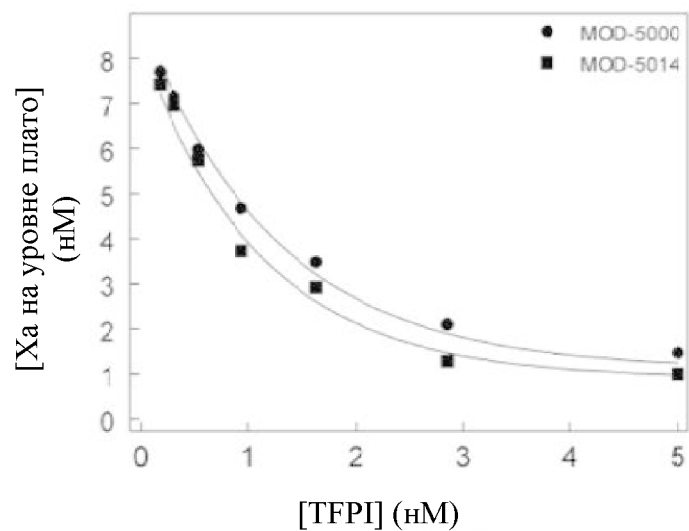
ФИГУРА 13



ФИГУРА 12В

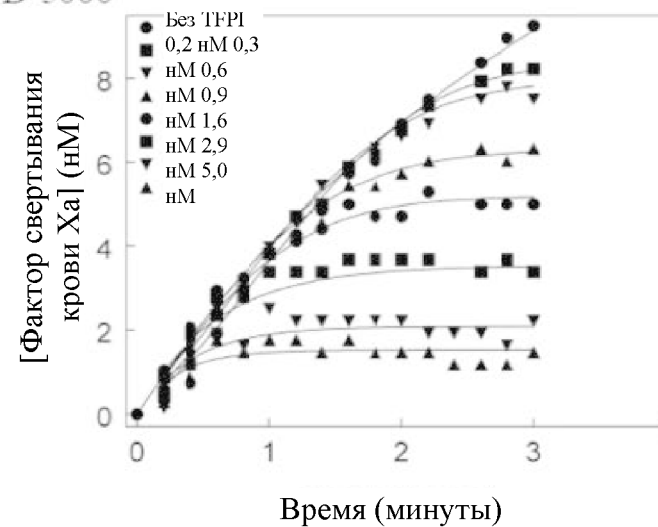


ФИГУРА 14



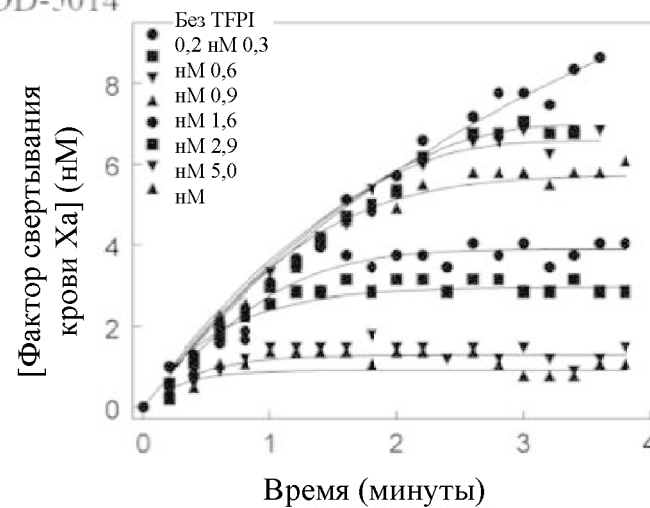
ФИГУРА 15А

MOD-5000

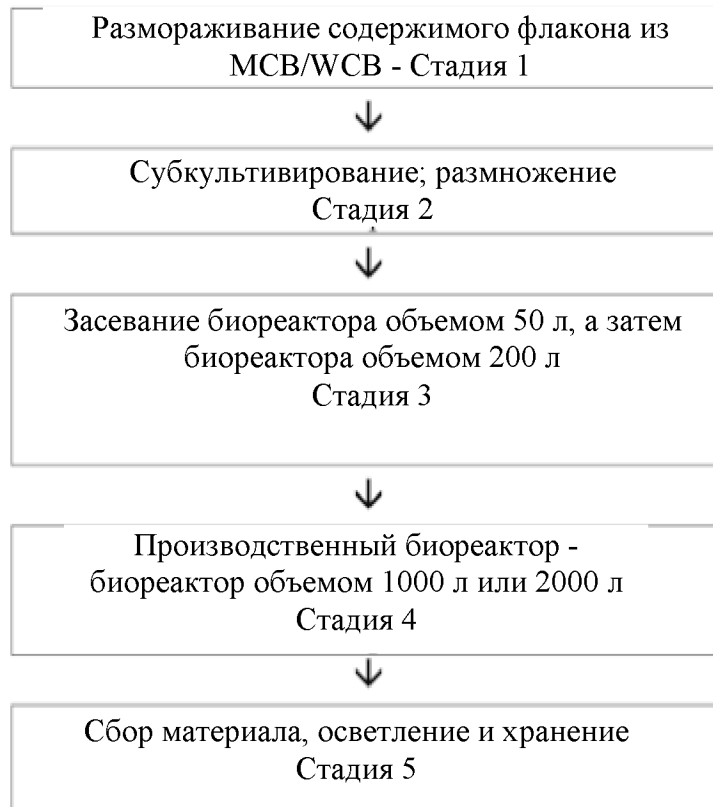


ФИГУРА 15В

MOD-5014

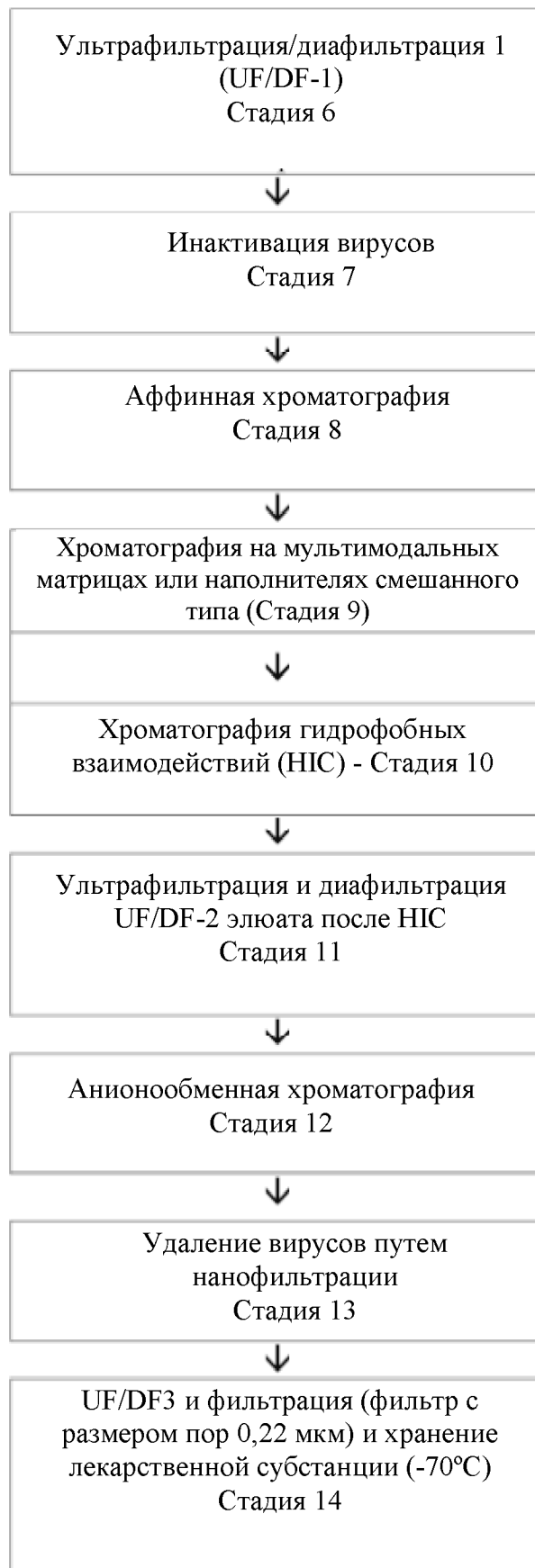


ФИГУРА 15С

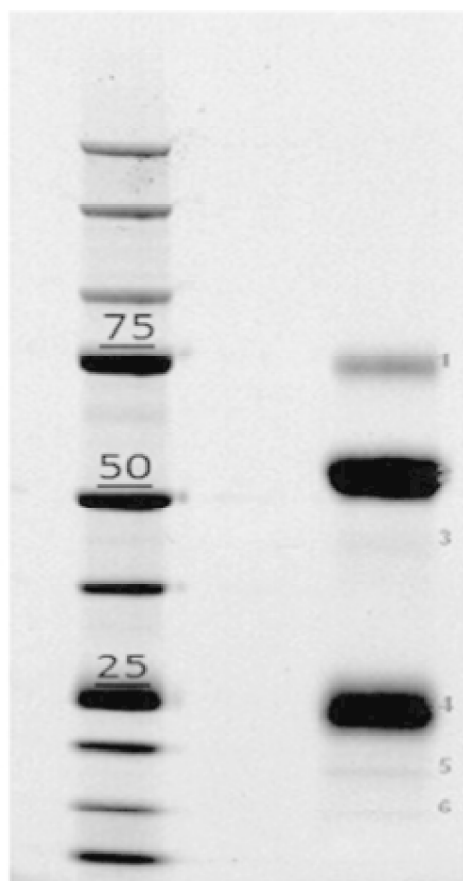


ФИГУРА 16

13/18



ФИГУРА 17



ФИГУРА 18

Стадия очистки	Заряженные N-гликаны (%)
Сбор материала	NA
Инактивация вирусов + Аффинная хроматография VII	80,01
Хроматография на мультимодальных матрицах или наполнителях смешанного типа	79,4
UF/DF2	78,5
UF/DF3	79,5

ФИГУРА 19

Стадия очистки	RP-HPLC(%)		
	Главный пик	Окисленные формы	Другие родственные формы
Сбор материала	NA	NA	NA
Инактивация вирусов + Аффинная хроматография VII	89,10	4,66	6,23
Хроматография на мультимодальных матрицах или наполнителях смешанного типа	91,31	4,38	4,31
Хроматография гидрофобных взаимодействий (HIC)	94,03	2,68	3,29
Анионообменная хроматография	94,69	2,48	2,83

ФИГУРА 20

Стадия очистки	Гамма-карбоксилированные (%)
Сбор материала	NA
Инактивация вирусов + Аффинная хроматография VII	95,4
Хроматография на мульти模альных матрицах или наполнителях смешанного типа	100

ФИГУРА 21

Стадия очистки	Сиаловая кислота (моль/моль продукта)
Сбор материала	NA
Инактивация вирусов + Аффинная хроматография VII	15,25
СНТ	16,6
UF/DF2	16,6
UF/DF3	16,4

ФИГУРА 22