

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202290764 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.06.07

(51) Int. Cl. A61K 38/37 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.09.01

(54) БЕЛОК ФАКТОРА VIII С УВЕЛИЧЕННЫМ ПЕРИОДОМ ПОЛУВЫВЕДЕНИЯ

(31) 19194964.3; 19202622.7

(32) 2019.09.02; 2019.10.11

(33) EP

(86) PCT/EP2020/074326

(87) WO 2021/043757 2021.03.11

(71) Заявитель:
БИОТЕСТ АГ (DE)

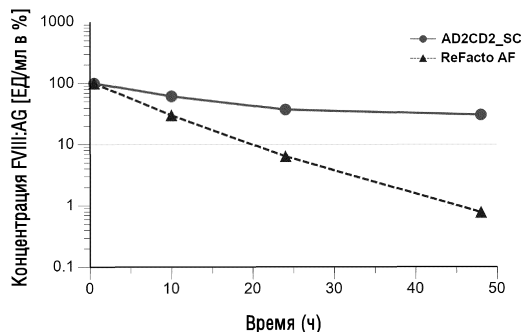
(72) Изобретатель:

Кистнер Штеффен, Шютттрумпф Йорг,
Дауфенбах Йенс, Хербенер Петер,
Унгерер Кристофер (DE), Де Гроот
Энни, Мартин Уильям (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к рекомбинантным факторам свертывания крови, в частности к белкам рекомбинантного фактора VIII (FVIII) с увеличенным периодом полувыведения. Они содержат часть тяжелой цепи и часть легкой цепи фактора VIII и по меньшей мере два альбумин-связывающих домена, где по меньшей мере один альбумин-связывающий домен расположен С-терминально по отношению к части тяжелой цепи, и по меньшей мере один альбумин-связывающий домен расположен С-терминально по отношению к части легкой цепи. Если белок является одноцепочечным белком, альбумина связывающий(ие) домен(ы), С-терминальный(ые) по отношению к части тяжелой цепи, является/являются N-терминальным(и) по отношению к части легкой цепи. Белок по изобретению также может представлять собой деиммунизированный белок фактора VIII, содержащий специфические точечные мутации в определенных положениях, которые служат для снижения иммуногенности, при этом белок по существу сохраняет свою коагулянтную активность. Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим белки по изобретению, способам их получения и фармацевтическим композициям, содержащим любое из них, при этом фармацевтическая композиция предпочтительно предназначена для лечения гемофилии А.



A1

202290764

202290764

A1

БЕЛОК ФАКТОРА VIII С УВЕЛИЧЕННЫМ ПЕРИОДОМ ПОЛУВЫВЕДЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к рекомбинантным факторам свертывания крови, в частности, к рекомбинантным белкам фактора VIII (FVIII), имеющим увеличенный период полувыведения. Они содержат часть тяжелой цепи и часть легкой цепи фактора VIII и по меньшей мере два альбумин-связывающих домена, где по меньшей мере один альбумин-связывающий домен является С-терминальным по отношению к части тяжелой цепи, и по меньшей мере один альбумин-связывающий домен является С-терминальным по отношению к части легкой цепи. Если белок является одноцепочечным белком, альбумин-связывающий(ие) домен(ы), С-терминальные по отношению к части тяжелой цепи, является/являются N-терминальным(и) по отношению к части легкой цепи. Белок по изобретению также может представлять собой деиммунизированный рекомбинантный белок фактора VIII, содержащий специфические точечные мутации в определенных положениях, обеспечивающие снижение иммуногенности указанного белка FVIII, при этом белок фактора VIII по существу сохраняет свою коагулянтную активность. Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим белки по изобретению, способам их получения и фармацевтическим композициям на основе любого из них, при этом фармацевтическая композиция предпочтительно предназначена для лечения гемофилии А.

FVIII является важным кофактором в каскаде коагуляции. Человеческий FVIII дикого типа синтезируется в виде единичной цепи, состоящей из 2351 аминокислоты, и содержит три домена А (A1-A3), один домен В и два домена С (C1 и C2), прерываемых короткими кислотными последовательностями (a1-a3). Первые 19 аминокислот представляют собой сигнальную последовательность, которая расщепляется внутриклеточными протеазами, давая в результате молекулу FVIII, состоящую из 2332 аминокислот. Полученная доменная структура имеет вид A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2. Во время посттрансляционной модификации FVIII подвергается гликозилированию, сульфатированию и протеолитическому процессу. Сульфатирование является важным для внеклеточного взаимодействия с различными белками, особенно с тромбином и фактором фон Виллебранда (vWF). Это происходит на шести тирозинах в кислых областях a1, a2 и a3. Внутриклеточное расщепление сериновой протеазой фурином делит FVIII на тяжелую цепь (A1-a1-A2-a2-B) и легкую цепь (a3-A3-C1-C2). Во время этого расщепления части домена В могут быть потеряны. Следовательно, легкая цепь имеет молекулярную массу 80 кДа, тогда как тяжелая цепь может быть слегка гетерогенной с молекулярной массой примерно 210 кДа. Связь между тяжелой и легкой цепями не является ковалентной, но опосредована ионом двухвалентного металла Cu^{2+} между доменами A1 и A3.

В кровотоке FVIII связывается с vWF через домены a3, C1 и C2, что защищает FVIII от ранней активации, а также от деградации.

При активации FVIII расщепляется тромбином в трех положениях, что приводит к

гетеротримеру и потере домена В (гетеротримерному FVIIIa). Гетеротример образует комплекс с активированным фактором свертывания крови IXa и фактором свертывания крови X, а легкая цепь связывается с фосфолипидным бислоем, например, с клеточной мембраной (активированных) тромбоцитов.

Гемофилия А в основном представляет собой генетическое нарушение свертываемости крови, связанное с X-хромосомой, встречающееся у 1 из 5000 новорожденных мальчиков. Однако гемофилия А также может возникать спонтанно из-за аутоиммунного ответа на FVIII. Больные гемофилией А страдают более длительными кровотечениями, спонтанными и внутренними кровотечениями, что сказывается на их повседневной жизни.

Пациентов с гемофилией А обычно лечат введением FVIII. В зависимости от тяжести заболевания (легкая, средняя или тяжелая) лечение оказывают по требованию, или оно является профилактическим. Терапевтические продукты FVIII либо очищают от человеческой плазмы (pFVIII), либо получают рекомбинантно в клеточной культуре (rFVIII).

При разработке рекомбинантных молекул FVIII для терапии создают молекулы FVIII с удаленным В-доменом, поскольку В-домен не важен для функциональности FVIII при свертывании крови. В основном это приводит к уменьшению размеров. Одним из наиболее распространенных продуктов FVIII с удаленным В-доменом является ReFacto® или ReFacto AF® производства Pfizer. У этого варианта FVIII отсутствуют 894 аминокислоты В-домена.

Одной из проблем, связанных с заместительной терапией FVIII, является относительно низкий период полувыведения *in vivo* полученных из плазмы или рекомбинантных белков фактора VIII. Существуют различные подходы к увеличению времени полувыведения FVIII, начиная от ПЭГилирования до включения альбумина, одноцепочечных молекул и слияния с Fc.

В WO 2014/070953 A1 раскрыт способ снижения или уменьшения частоты кровотечений у пациента с гемофилией путем введения полипептида фактора VIII длительного действия, где полипептид фактора VIII длительного действия может представлять собой слияние полипептида фактора VIII и гетерологичного фрагмента, который является партнером по связыванию FcRn и может содержать Fc-участок.

В WO 91/01743 A1 описан способ увеличения периода полувыведения биологически активного белка или пептида *in vivo* путем ковалентного связывания указанного белка или пептида с полипептидным фрагментом, способным связываться с сывороточным белком, в частности, с сывороточным альбумином. Предпочтительно фрагмент, связывающий альбумин, происходит из стрептококкового белка G или стафилококкового белка A. Полученный слитый белок связывается с сывороточным альбумином *in vivo* и имеет более длительный период полувыведения, тем самым обеспечивая увеличение общего периода полувыведения слитого белка или пептида, представляющего терапевтический интерес. В WO 2005/097202 A2 в общем виде

упоминаются слитые белки, в которых терапевтический белок и белок плазмы объединены в одну полипептидную цепь, причем такие слитые белки позволяют получить клинические преимущества, заключающиеся в менее частых инъекциях и более высоких уровнях терапевтического белка *in vivo*.

WO 2009/016043 A2 раскрывает альбумин-связывающий полипептид. WO 2010/054699 A1 раскрывает молекулу захвата для модулирования фармакокинетики и/или фармакодинамики мишени биологически эффективной в организме млекопитающего, где указанная молекула содержит по меньшей мере один альбумин-связывающий фрагмент.

WO 2011/101284 A1 описывает слитые белки фактора FVIII. В нем упоминаются альбумин-связывающие фрагменты. Предполагается, что партнеры по слиянию задерживают клиренс FVIII *in vivo* за счет взаимодействия с сывороточным альбумином. Полипептиды, связывающие альбумин, такие как полипептид ABD1, упоминаются в качестве примеров партнеров по слиянию. Предлагаемые слитые белки содержат четыре альбумин-связывающих фрагмента (альбумин-связывающих домена - ABD), содержащих ABD1, например 4 x ABD1 в домене В или 4 x ABD1 на С-конце легкой цепи FVIII.

WO 2012/004384 A2 раскрывает альбумин-связывающую последовательность. В этом документе описан слитый белок или конъюгат с альбумин-связывающим полипептидом, где второй фрагмент может представлять собой фактор FVIII.

В WO 2013/143890 A1 описано соединение для перорального введения, содержащее фрагмент с желаемой терапевтической активностью и фрагмент, который связывается с альбумином.

WO 2014/048977 A1 описывает класс сконструированных полипептидов, имеющих сродство связывания с альбумином. В WO 2014/064237 A1 представлены полипептиды, связывающие альбумин-связывающий домен, содержащие ABD-связывающий мотив. WO 2015/091957 A1 относится к классу сконструированных полипептидов, имеющих сродство связывания с альбумином, причем полипептиды обладают высокой устойчивостью к протеолитическому расщеплению.

В WO 2015/023894 A1 представлены рекомбинантные белки FVIII, в которых одна или более аминокислот по меньшей мере в одной пермиссивной петле или домене а3 заменены или удалены, или заменены гетерологичными фрагментами с сохранением прокоагулянтной активности FVIII. Предполагается, что созданные белки FVIII имеют, например, повышенную стабильность *in vivo*.

К тому же, ингибирующие анти-FVIII антитела к терапевтическому FVIII вырабатываются у до 30% пациентов с тяжелой формой гемофилии А. Это связано с тем, что иммунная система этих пациентов распознает введенный терапевтический FVIII как чужеродный, поскольку в организме пациентов продуцируется измененный эндогенный вариант FVIII, который может быть мутированным или укороченным, или вообще непродуцируемым FVIII. Известно, что ингибирующие анти-FVIII антитела претерпевают процесс переключения класса и созревания аффинности. Это указывает на зависимость от Т-клеток активацию В-клеток, которые секретируют антитела. Эта зависимость от Т-клеток

активация В-клеток требует активированных Т-хелперных клеток, которые происходят из наивных Т-хелперных клеток в результате взаимодействия с антигенпрезентирующими клетками (APC), которые презентуют антиген FVIII, и дополнительными коstimуляторами.

Полностью человеческая последовательность FVIII, которую вводят в качестве терапевтического средства, может распознаваться в качестве чужеродного белка в организме по меньшей мере некоторых больных гемофилией, поскольку у них не развилась центральная толерантность к этому белку. Лечение FVIII может индуцировать иммунный ответ на FVIII в зависимости от HLA субъекта, частоты дозирования, локализации и характера мутаций, присутствующих в FVIII каждого субъекта. Те анти-FVIII антитела, которые препятствуют функции FVIII, называются ингибирующими антителами или ингибиторами. Появление ингибиторов FVIII в организме субъектов, ранее получавших терапию FVIII, коррелировало с более тяжелыми мутациями или отсутствием экспрессии FVIII. Ожидается, что чем более «чужеродной» является заместительная терапия, тем более сильным будет результирующий иммунный ответ. Действительно, у больных гемофилией антитерапевтический иммунный ответ может быть нормальным и ожидаемым результатом взаимодействия между терапевтическим FVIII и здоровой функционирующей иммунной системой.

В случае образования ингибиторов больные как правило получают терапию индукции иммунной толерантности (ИТИ). Во время этой терапии, которая может длиться в течение нескольких недель, месяцев или лет, пациентам вводят очень высокие дозы FVIII, чтобы истощить иммунную систему и, соответственно, вызвать толерантность. Эта терапия является очень дорогостоящей, а также изнурительной для пациентов и их опекунов. Во время ИТИ применение FVIII происходит ежедневно, в некоторых случаях даже дважды в сутки. В дополнение к интенсивной терапии количество кровотечений увеличивается при наличии ингибиторов. Стремление защитить пациента от инвалидности в результате суставных кровотечений ухудшает социальную жизнь пациента, а также всей семьи. Кроме того, у значительной части пациентов ИТИ оказывается безуспешным.

Рекомбинантный FVIII свиньи был одобрен FDA для лечения пациентов с гемофилией А, у которых развился аутоиммунный ответ на человеческий FVIII. В WO 99/46274 A1 описан гибрид FVIII с последовательностью человеческого и животного FVIII или последовательностью человеческого FVIII и последовательностью не-FVIII, включая модифицированный фактор VIII, в котором аминокислотная последовательность модифицирована заменой в одном или более конкретных локусах, где модифицированный фактор VIII не ингибируется ингибирующими антителами к эпитопам домена A2 или C2.

В WO 2016/123200 A1 также описаны рекомбинантные или химерные белки FVIII, в которых один или более белковых доменов содержат аминокислотные последовательности, полученные из аминокислотных последовательностей, реконструированных на основе предковых последовательностей, при этом полученный

FVIII демонстрирует сниженное связывание ингибиторов, т.е. где эпитопы В-клеток были удалены.

Поскольку считается, что Т-клетки участвуют в выработке высокоаффинных антител к FVIII, было предложено разработать рекомбинантные молекулы FVIII, которые не содержат общих Т-клеточных эпитопов и, следовательно, не индуцируют иммунный ответ у пациентов (Scott, 2014, Haemophilia 20 (01):80-86, Tangri et al., 2005, J Immunol. 174:3187-3196). Moise et al. (2012, Clin Immunol 142(3):329-331) описали деиммунизированные пептиды FVIII, в которых Т-клеточные эпитопы домена C2 были идентифицированы с помощью подходов *in silico* и модифицированы. Модифицированные пептиды оценивали с помощью анализа связывания HLA и для иммунизации использовали мышей. Schubert et al. (2018, PLoS Comput Biol 14(3):e1005983) опубликовали аналогичный подход к разработке деиммунизированных белковых биотерапевтических препаратов, специфических для популяции, описывая вычислительный подход для выявления мутаций в домене C2 FVIII, которые приводят к снижению иммуногенности при сохранении фармацевтической активности и функции белков. Например, показаны результаты деиммунизации для последовательностей, содержащих до трех одновременных точечных мутаций (например, V2333E, L2321F, Q2335H или V2313M/V2313T). В качестве экспериментальной проверки расчетов *in silico* было измерено сродство 15-мерных пептидов к определенным аллелям HLA.

В WO 2011/060371 A2 описан модифицированный полипептид FVIII, содержащий по меньшей мере одну аминокислотную модификацию в конкретной области C2-домена FVIII, которая, как считается, образует В-клеточный эпитоп для ингибитора, и/или по меньшей мере одну аминокислотную модификацию в конкретной области домена A2 FVIII, которая, как считается, образует соответствующий Т-клеточный эпитоп, для предотвращения или снижения начального иммунного ответа на фактор VIII у пациентов, страдающих гемофилией А, или для снижения интенсивности иммунного ответа у пациентов с предварительно сформированными ингибирующими антителами к фактору VIII.

В свете уровня техники авторы настоящего изобретения решали проблему предоставления рекомбинантных белков FVIII с увеличенным периодом полувыведения, которые предпочтительно позволяют обеспечить более удобную для пациента заместительную терапию с увеличением интервала введения до более трех дней или даже более одной недели и более.

Эта проблема решается настоящим изобретением, например, заявленным объектом изобретения.

Описание изобретения

Авторы изобретения сконструировали новые варианты FVIII, имеющие более длительный период полувыведения *in vivo* и превосходную удельную активность, о чем свидетельствуют разные анализы биологической активности. Кроме того, эти белки имеют высокий уровень экспрессии и низкий профиль фрагментов и побочных продуктов.

Дополнительные преимущества и предпочтительные варианты осуществления освещены в другом месте настоящего описания. Авторы изобретения обнаружили, что конкретное расположение альбумин-связывающих доменов способствует увеличению периода полувыведения *in vivo*.

Таким образом, изобретение относится к рекомбинантному белку фактора VIII, содержащему часть тяжелой цепи и часть легкой цепи фактора VIII и по меньшей мере два альбумин-связывающих домена, где по меньшей мере один альбумин-связывающий домен является С-терминальным по отношению к части тяжелой цепи, и по меньшей мере один альбумин-связывающий домен является С-терминальным по отношению к части легкой цепи. Если белок является одноцепочечным белком, альбумин-связывающий(ие) домен(ы), С-терминальный(ые) по отношению к части тяжелой цепи, является/являются N-терминальным(и) по отношению к части легкой цепи.

Фактор VIII в комплексе с фактором фон Виллебранда (vWF) имеет период полувыведения *in vivo* примерно 12 часов. FVIII, не ассоциированный с vWF, обычно разлагается намного быстрее.

Альбумин имеет период полувыведения *in vivo* примерно 19 дней. Введение по меньшей мере двух альбумин-связывающих доменов в последовательность FVIII позволило добиться значительного увеличения периода полувыведения. Были протестированы разные положения и разные количества альбумин-связывающих фрагментов для определения оптимальных положений и количества интегрированных альбумин-связывающих фрагментов.

Не ограничиваясь какой-либо теорией, считается, что связывание альбумина с белком FVIII по изобретению через альбумин-связывающие домены в конкретных положениях, раскрытых в настоящем описании, особенно эффективно для ингибирования распада белка FVIII по изобретению. По-видимому, это увеличивает период полувыведения *in vivo* в большей степени, чем ассоциация с vWF, связанным с нативным FVIII в крови.

FVIII

Специалисту в данной области техники известен термин FVIII (или фактор VIII) и известна структура и биологические функции FVIII дикого типа и его типичных вариантов. Помимо характеристик, указанных в настоящем описании, белок FVIII по изобретению может быть сконструирован в том виде, в каком специалист в данной области сочтет его целесообразным и выгодным.

В частности, белок фактора VIII по изобретению обычно будет включать все необходимые части и домены, которые, как известно, важны для биологической функции. Например, белок FVIII предпочтительно дополнительно содержит домены, соответствующие, по существу соответствующие и/или функционально соответствующие доменам А и С FVIII дикого типа, особенно доменам А1, А2, А3, С1 и С2. Кроме того, он может содержать дополнительные части и домены. Например, белок FVIII предпочтительно дополнительно содержит домен а1 между доменами А1 и А2 и домен а2,

С-терминальный по отношению к домену A2. На отдельной цепи, в случае двухцепочечного белка или, в случае одноцепочечного белка, С-терминально к указанному домену и, необязательно, С- терминально к В-домену или укороченному В-домену и по меньшей мере одному альбумин-связывающему домену белок FVIII содержит по меньшей мере укороченный домен а3. До процессинга белок фактора VIII по изобретению также может содержать сигнальную последовательность. Таким образом, часть тяжелой цепи предпочтительно содержит домены A1 и A2 и обычно содержит домены A1-a1-A2-a2 или A1-a1-A2-a2-B. Предпочтительно, В-домен белка фактора VIII является удаленной по меньшей мере частично. Часть легкой цепи предпочтительно содержит домены A3 и C1 и C2 и обычно содержит домены а3-A3-C1-C2. Любой или все указанные домены могут быть доменами FVIII дикого типа (wt), или они могут отличаться от доменов дикого типа, например известных в данной области техники, или быть подходящими доменам с точки зрения специалиста в данной области техники.

Домены предпочтительно содержатся в белке в указанном порядке, т.е. от N-конца к С-концу белка.

Хотя части белка FVIII по изобретению могут быть сконструированы по желанию специалиста в данной области техники, FVIII предпочтительно сохраняет высокую биологическую активность FVIII. Как показано в примерах, изобретение позволяет получить белок FVIII с высокой биологической активностью, измеренной, например, по хромогенной активности (активности, определенной хромогенным методом). Таким образом, хромогенная активность белка FVIII по изобретению предпочтительно по меньшей мере сравнима с активностью белка FVIII дикого типа, т.е. составляет по меньшей мере 50% удельной хромогенной активности белка дикого типа (SEQ ID NO: 1). Предпочтительно белок FVIII по изобретению имеет по меньшей мере 80%, по меньшей мере 100% или более 100% удельной хромогенной активности белка дикого типа. Предпочтительно хромогенная активность также составляет по меньшей мере 50%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100% или более 100% хромогенной активности ReFacto AF® (международное непатентованное название: Moroctocog Alfa), коммерчески доступного FVIII с удаленным В-доменом (Pfizer).

Белок FVIII по настоящему изобретению должен иметь по меньшей мере одну биологическую активность или функцию белка FVIII дикого типа, в частности, в отношении функции свертывания крови. Белок FVIII должен расщепляться тромбином, приводя к активации. Предпочтительно белок FVIII по изобретению содержит по меньшей мере один сайт узнавания тромбином и/или расщепления тромбином, где указанные сайты узнавания тромбином и/или расщепления тромбином могут соответствовать или по существу соответствуют сайтам FVIII дикого типа. Затем он способен образовывать комплекс с активированным фактором свертывания крови IXa и фактором свертывания крови X, а легкая цепь способна связываться с фосфолипидным бислоем, например, с клеточной мембраной (активированных) тромбоцитов.

Биологическую активность FVIII можно определить путем анализа хромогенной,

свертывающей или коагулянтной активности белка, как раскрыто в настоящем описании. Обычно хромогенную активность принимают в качестве меры биологической активности.

Периода полувыведения *in vivo* может быть увеличен для белков фактора VIII по изобретению, которые представляют собой двухцепочечные белки. Двухцепочечные белки, которые могут формировать основу для белков FVIII по изобретению, известны в данной области, например, FVIII дикого типа или его версии с удаленным или укороченным В-доменом, например, ReFacto AF®.

Кроме того, авторы изобретения обнаружили превосходное увеличение периода полувыведения *in vivo* для белков фактора VIII по изобретению, которые представляют собой одноцепочечные белки. Одноцепочечные белки фактора VIII, которые могут служить основой для белков FVIII по изобретению, известны в данной области. Как правило, одноцепочечные белки FVIII не содержат функциональный сайт расщепления фурином и, таким образом, до активации остаются в кровотоке в виде одной цепи. Такие белки также описаны в заявке на европейский патент № 19173440 или раскрыты в настоящем описании.

В качестве одноцепочечного остова белка по изобретению была разработана одноцепочечная молекула FVIII с удаленными несколькими аминокислотами, включая сайт расщепления фурином (положения R1664-R1667, где также учитывается сигнальный пептид). В-домен удален в значительной степени, при этом внутренний фрагмент (по меньшей мере, NPP) В-домена сохранен, а интактный сайт расщепления тромбином находится перед внутренним фрагментом. Было показано, что этот одноцепочечный белок фактора VIII (FVIII-sc) более стабилен, чем фактор VIII дикого типа. Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по изобретению содержит в одной цепи часть тяжелой цепи, содержащую домены A1 и A2, и часть легкой цепи, содержащую домены A3, C1 и C2 фактора VIII, причем:

a) в указанном рекомбинантном белке фактора VIII удалены 894 аминокислоты, соответствующие аминокислотам, последовательно расположенным от F761 до P1659 фактора VIII дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1, что приводит к первой делеции;

b) указанный рекомбинантный белок фактора VIII содержит перекрывающую участок первой делеции последовательность процессинга, содержащую SEQ ID NO: 2, или последовательность, содержащую не более одной аминокислотной замены в SEQ ID NO: 2, где указанная последовательность процессинга содержит первый сайт расщепления тромбином;

c) в указанном рекомбинантном белке фактора VIII удалены по меньшей мере аминокислоты, соответствующие аминокислотам с R1664 по R1667 фактора VIII дикого типа, что приводит ко второй делеции; и

d) указанный рекомбинантный белок фактора VIII содержит второй сайт расщепления тромбином, С-терминальный по отношению ко второй делеции и N-терминальный по отношению к домену A3.

Как определено в а), в белке факторе VIII удалено 894 аминокислоты, соответствующие аминокислотам, последовательно расположенным между F761 и P1659 фактора VIII дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1, что приводит к первой делеции. В некоторых вариантах осуществления, в частности, в которых нумерация аминокислот в FVIII начинается без делеций или вставок, термин «соответствующий» следует понимать как означающий «идентичный».

Для конкретных аминокислот, которые могут быть мутированы относительно дикого типа, аминокислоту, соответствующую aa дикого типа, определяют путем выравнивания, например, с помощью программы Needle пакета EMBOSS (на основе алгоритма Нидлмана-Вунша (Needleman-Wunsch); настройки: MATRIX: «BLOSUM62», штраф за открытие гэпа: «20», штраф за удлинение гэпа: «0,5», штраф за закрытие гэпа: «false», штраф за введение концевого гэпа: «10», штраф за удлинение концевого гэпа: «0,5»).

Для оценки идентичности последовательностей двух полипептидов, такое выравнивание может быть выполнено в два этапа: I. Глобальное выравнивание белков выполняют с помощью программы Needle пакета EMBOSS (настройки: MATRIX: «BLOSUM62», штраф за открытие гэпа: «20», штраф за удлинение гэпа: «0,5», штраф за закрытие гэпа: «false», штраф за введение концевого гэпа: «10», штраф за удлинение концевого гэпа: «0,5») для определения конкретной области, имеющей наибольшее сходство. II. Точное совпадение последовательностей определяют вторым выравниванием с помощью программы Needle пакета EMBOSS (настройки: MATRIX: «BLOSUM62», штраф за открытие гэпа: «20», штраф за удлинение гэпа: «0,5», штраф за закрытие гэпа: «false», штраф за введение концевого гэпа: «10», штраф за удлинение концевого гэпа: «0,5»), сравнивая полностью перекрывающиеся полипептидные последовательности, идентифицированные в (I), исключая неспаренные аминокислоты.

«Между» исключает указанные аминокислоты, например, означает, что указанные аминокислоты сохранены. «Делеция» или «удаленный» не требует, чтобы белок был фактически получен путем удаления аминокислот, ранее присутствовавших в молекуле-предшественнике, а просто определяет, что аминокислоты отсутствуют, независимо от способа получения молекулы. Например, белок может быть получен на основе нуклеиновых кислот, полученных в результате синтеза *de novo* или методами генной инженерии.

Как определено в b), рекомбинантный белок фактора VIII содержит перекрывающую участок первой делеции последовательность процессинга, содержащую SEQ ID NO: 2 (PRFSQNP), или последовательность, содержащую не более одной аминокислотной замены в SEQ ID NO: 2, причем указанная последовательность процессинга содержит первый сайт расщепления тромбином. Соответственно, по меньшей мере одна аминокислота последовательности процессинга соответствует аминокислоте, С-терминальной по отношению к делеции, и по меньшей мере одна аминокислота последовательности процессинга соответствует аминокислоте, N-терминальной по

отношению к делеции. Последовательность процессинга содержит SEQ ID NO: 2 или последовательность, имеющую не более одной аминокислотной замены в SEQ ID NO: 2, т.е. последовательность процессинга может быть длиннее. В частности, последовательность процессинга выбирают из группы, содержащей SEQ ID NO: 2, 4, 5, 6, 7 или 8. Авторы изобретения обнаружили, что последовательность процессинга по изобретению обеспечивает особенно хорошее расщепление тромбином.

В предпочтительных вариантах осуществления последовательность процессинга не длиннее SEQ ID NO: 4. Последовательность процессинга может быть непосредственно С-терминальной по отношению к последовательностям домена a2, например последовательностям домена a2 дикого типа. Первые две N-терминальные аминокислоты последовательности процессинга могут даже принадлежать домену a2. Предпочтительно аминокислота, непосредственно N-терминальная по отношению к последовательности процессинга, представляет собой Е.

Одна аминокислота в SEQ ID NO: 2 может быть заменена, например, для снижения иммуногенности. Необязательно F, S, С-терминальные по отношению к F, Q или N, являются замещенными.

Предпочтительно F заменена, например, на А или S, что приводит к замене F761A или F761S.

Последовательность процессинга может представлять собой SEQ ID NO: 4 (PRSFNQPPVL) или последовательность, имеющую не более одной аминокислотной замены в указанной последовательности, где, необязательно, F, S, С-терминальные по отношению к F, Q или N, являются замещенными.

Кроме того, авторы настоящего изобретения показали, что L на С-конце последовательности процессинга, приведенной в SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7 или 8, дает FVIII с особенно хорошей активностью. Один из особенно предпочтительных примеров одноцепочечного белка FVIII, который может формировать остов для белка по изобретению, более подробно показан в примерах, в которых он обозначен как V0 (SEQ ID NO: 16). Последовательность процессинга белка FVIII V0, которая оказалась особенно предпочтительной, состоит из SEQ ID NO: 4, которая является специфическим вариантом осуществления SEQ ID NO: 5-8.

Альтернативные последовательности процессинга SEQ ID NO: 5 (PRSXNQPPVL), SEQ ID NO: 6 (PRSFNQPPVL), SEQ ID NO: 7 (PRSFQPPVL) и SEQ ID NO: 8 (PRSFQPPVL) представляют собой варианты, в которых X может быть любой встречающейся в природе аминокислотой. Необязательно X представляет собой консервативную замену относительно соответствующей аминокислоты в SEQ ID NO: 4, т.е. гидрофобная аминокислота заменена гидрофобной аминокислотой, гидрофильная аминокислота заменена гидрофильной аминокислотой, ароматическая аминокислота заменена ароматической аминокислотой, кислая аминокислота заменена кислой аминокислотой и основная аминокислота заменена основной аминокислотой.

Например, *in silico* было предсказано, что альтернативные последовательности

процессинга SEQ ID NO: 5, где X представляет собой A или S, приводят к менее иммуногенному продукту (таблица 11). Это относится, например, к проанализированным в настоящем описании вариантам F01_AD2CD2_SC, F02_AD2CD2_SC. Еще одним деиммунизированным вариантом последовательности процессинга является SEQ ID NO: 132 (PRSFQNPVLE). Альтернативно, S непосредственно на С-конце последовательности процессинга (т.е. первая аминокислота линкера, например расщепляемого тромбином линкера) может быть заменена на D, как в SEQ ID NO: 131.

Как определено в с), в белке FVIII по изобретению удалены в результате делеции аминокислоты, соответствующие аминокислотам с R1664 по R1667 фактора VIII дикого типа, что приводит ко второй делеции. Эти аминокислоты соответствуют сайту узнавания расщепления фурином FVIII дикого типа. Соответственно белок практически не расщепляется фурином. В композиции по меньшей мере 80%, необязательно по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% белка FVIII по изобретению присутствуют в форме одноцепочечной молекулы.

Как определено в d), рекомбинантный белок фактора VIII по изобретению содержит второй сайт расщепления тромбином, С-терминальный по отношению ко второй делеции и N-терминальный по отношению к домену A3. Соответственно, при активации часть белка FVIII между сайтом расщепления тромбином в последовательности процессинга и вторым сайтом расщепления тромбином вырезается из активированного белка FVIII.

Кроме того, изобретение относится к рекомбинантному белку фактора VIII, содержащему в одной цепи часть тяжелой цепи, содержащую домены A1 и A2, и часть легкой цепи, содержащую домены A3, C1 и C2 фактора VIII, где

а) указанный рекомбинантный белок фактора VIII содержит последовательность процессинга, содержащую SEQ ID NO: 2, или последовательность, содержащую не более одной аминокислотной замены в SEQ ID NO: 2, где указанная последовательность процессинга содержит первый сайт расщепления тромбином;

б) непосредственно С-терминально по отношению к указанной последовательности процессинга указанный белок фактора VIII содержит гетерологичную последовательность, содержащую по меньшей мере один, предпочтительно два альбумин-связывающих домена;

с) непосредственно С-терминально по отношению к указанной гетерологичной последовательности указанный белок фактора VIII содержит связывающую последовательность, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности с SEQ ID NO: 9 (например, SEQ ID NO: 9); и

д) указанный рекомбинантный белок фактора VIII содержит на С-конце SEQ ID NO: 9 второй сайт расщепления тромбином; и

е) С-терминально по отношению к части легкой цепи указанный рекомбинантный белок фактора VIII содержит по меньшей мере один, предпочтительно два альбумин-связывающих домена.

Указанный рекомбинантный белок FVIII может быть описанным выше белком FVIII. Белок FVIII обычно содержит по меньшей мере один дополнительный сайт расщепления тромбином.

В одном из вариантов осуществления белок FVIII по изобретению, который необязательно является одноцепочечным белком, содержит часть тяжелой цепи с последовательностью, на по меньшей мере 90% идентичной aa20-aa1667 SEQ ID NO: 1, и часть легкой цепи с последовательностью, на по меньшей мере 90% идентичной aa1668-aa2351 SEQ ID NO: 1. Необязательно, идентичность соответствующей последовательности aa20-aa1667 SEQ ID NO: 1 и идентичность последовательности aa1668-aa2351 SEQ ID NO: 1 составляет по меньшей мере 95%. Соответствующая идентичность последовательности aa20-aa1667 SEQ ID NO: 1 и идентичность последовательности aa1668-aa2351 SEQ ID NO: 1 может составлять по меньшей мере 98%. Необязательно соответствующая идентичность указанным последовательностям составляет по меньшей мере 99%. Изобретение также относится к белку FVIII по изобретению, содержащему часть тяжелой цепи, содержащую aa20-aa1667 SEQ ID NO: 1, и часть легкой цепи, содержащую aa1668-aa2351 SEQ ID NO: 1.

Несколько экспериментов, выполненных авторами изобретения, были выполнены с одноцепочечным FVIII по изобретению на основе одноцепочечной конструкции V0 (SEQ ID NO: 16) с по меньшей мере одним альбумин-связывающим доменом, введенным С-терминально по отношению к части тяжелой цепи и С-терминально по отношению к части легкой цепи, как раскрыто в настоящем описании. Такие белки продемонстрировали выгодные характеристики в отношении экспрессии, стабильности, периода полувыведения *in vivo* и очистки. Соответственно, предпочтительный белок FVIII по изобретению, который может быть одноцепочечным белком, содержит часть тяжелой цепи с последовательностью, на по меньшей мере 90% идентичной aa20-aa768 SEQ ID NO: 16, и часть легкой цепи с последовательностью, на по меньшей мере 90% идентичной последовательности aa769-aa1445 SEQ ID NO: 16. Необязательно, идентичность соответствующей последовательности aa20-aa768 SEQ ID NO: 16 и идентичность последовательности aa769-aa1445 SEQ ID NO: 16 составляет по меньшей мере 95%. Соответствующая идентичность последовательности aa20-aa768 SEQ ID NO: 16 и идентичность последовательности aa769-aa1445 SEQ ID NO: 16 может составлять по меньшей мере 98%. Необязательно соответствующая идентичность указанным последовательностям составляет по меньшей мере 99%. Изобретение также относится к белку FVIII по изобретению, содержащему часть тяжелой цепи, имеющую aa20-aa768 SEQ ID NO: 16, и часть легкой цепи, содержащую aa769-aa1445 SEQ ID NO: 16.

Обычно wt FVIII связывается с vWF. vWF защищает FVIII от протеолитической деградации и клиренса, опосредованного рецептором, т.е. через белок, родственные рецептору липопротеинов низкой плотности (LDL) (LRP1), LDL-рецептор (LDLR) и гепарансульфатные протеоглики (HSPG) в печени (Lenting et al., 2007. *J Thromb Haematol* 5:1353-60). Однако было показано, что период полувыведения vWF составляет

примерно 15 часов, таким образом путь выведения, связанный с vWF, служит в качестве ограничивающего фактора периода полувыведения комплекса FVIII:vWF. Авторы изобретения обнаружили, что способность белка FVIII по изобретению связываться с vWF может быть снижена по сравнению с FVIII дикого типа или ReFacto AF®, что можно объяснить стерическими затруднениями, возникающими при связывании альбумина. Например, белки FVIII по изобретению могут иметь 0-90%, 10-80%, 20-70%, 30-60% или 40-50% от связывающей способности ReFacto AF® с vWF, что может быть определено с помощью описанного ниже анализа. Предпочтительно в присутствии человеческого сывороточного альбумина в физиологических концентрациях указанная связывающая способность составляет менее 50% от связывающей способности ReFacto AF® с vWF.

Связывание vWF опосредуется, в частности, положениями аминокислот Y1683 и Y1699. Чтобы избежать связывания vWF, например, аминокислоты, соответствующие Y1683 и/или Y1699 FVIII дикого типа SEQ ID NO: 1, могут быть мутированы. Например, аминокислота, соответствующая Y1683 и/или Y1699 FVIII дикого типа SEQ ID NO: 1, может быть заменена на С или F, например, Y1699C или Y1699F. В частности, было подтверждено, что мутация аминокислоты, соответствующей Y1699, на F и мутация аминокислоты, соответствующей Y1683, на F, обе мутации вместе также обозначены как «b-мутация», дополнительно снижают связывание vWF с белками FVIII по изобретению. Помимо «b-мутации» авторы изобретения дополнительно протестировали «a-мутацию», содержащую аминокислотные замены Y737F, Y738F и Y742F, FVIII дикого типа SEQ ID NO: 1, и «с-мутацию», содержащую аминокислотные замены I2117S и R2169H, FVIII дикого типа SEQ ID NO: 1. Кроме того, авторы изобретения протестировали комбинации «a-мутации» и «b-мутации» и дополнительные комбинации «a-мутации» и «b-мутации» и «с-мутации». Было отмечено, что «с-мутация» отрицательно влияла на экспрессию и функциональность белка. «b-Мутация» либо сама по себе, либо в комбинации с «a-мутацией» не влияла на экспрессию и функциональность белка, но сильно снижала связывание с vWF. Для сравнения, «a-мутация» не уменьшала связывание с vWF.

Таким образом, для дальнейшего уменьшения связывания vWF рекомбинантный белок фактора VIII по изобретению может иметь подходящую мутацию, раскрытую в настоящем описании, например, «b-мутацию», т.е. мутацию аминокислоты, соответствующей Y1699, на F в положении 1699 и мутацию аминокислоты, соответствующей Y1683, на F в положении 1683 в белке факторе VIII дикого типа SEQ ID NO: 1. Например, белок FVIII по изобретению может содержать часть тяжелой цепи и часть легкой цепи фактора VIII, и по меньшей мере два альбумин-связывающих домена, где по меньшей мере два альбумин-связывающих домена (например, два) являются С-терминальными по отношению к части тяжелой цепи, и по меньшей мере два альбумин-связывающих домена (например, два) являются С-терминальными по отношению к части легкой цепи, при этом белок FVIII дополнительно содержит b-мутацию. Такой белок FVIII может дополнительно содержать линкеры, например, расщепляемый тромбином линкер, необязательно окруженный глицин-сериновым линкером, между альбумин-

связывающими доменами и другими частями белка, а также между альбумин-связывающими доменами. В альтернативном варианте, такой белок FVIII не содержит линкеров. В контексте изобретения термин «фланкированный» означает, что соответствующие части находятся в непосредственной близости, предпочтительно, на расстоянии не более 10, 5 или 2 положений аминокислот. Необязательно, соответствующие части являются непосредственно смежными.

Альбумин-связывающие домены

Рекомбинантный белок фактора VIII по изобретению содержит часть тяжелой цепи и часть легкой цепи фактора VIII и по меньшей мере два альбумин-связывающих домена, где по меньшей мере один альбумин-связывающий домен является С-терминальным по отношению к части тяжелой цепи, и по меньшей мере один альбумин-связывающий домен является С-терминальным по отношению к части легкой цепи.

В контексте изобретения могут использоваться разные альбумин-связывающие домены (ABD). Исторически сложилось так, что ABD обычно представляет собой небольшой трехспиральный белковый домен, полученный из одного из различных поверхностных белков, экспрессируемых грамположительными бактериями. Например, домены, полученные из стрептококкового белка G и белка PAB *Finnegoldia magna*, которые имеют общее происхождение и, следовательно, представляют собой интересную эволюционную систему, были тщательно изучены структурно и функционально. Их альбумин-связывающие сайты были картированы, и эти домены составляют основу для широкого спектра подходов к белковой инженерии. Они были сконструированы путем замены-мутагенеза для получения более широкой специфичности, повышенной стабильности или улучшенного сродства связывания, соответственно.

Например, можно использовать альбумин-связывающие домены, раскрытые Nilvebrant et al. (2013, Comput Struct Biotechnol J. 6: e201303009), Johansson et al. (2001, JBC 277:8114-8120), Jacobs et al. (2015, Protein Engineering, Design and Selection 28(10); 385-393), WO 91/01743 A1, WO 2009/016043 A2, WO 2010/054699 A1, WO 2012/004384 A2, WO 2014/048977 A1 или WO 2015/091957 A1.

Предпочтительно альбумин-связывающий домен содержит последовательность согласно SEQ ID NO: 44:

LAX₃AKX₆X₇ANX₁₀ELDX₁₄YGVSDFYKRLIX₂₆KAKTVEGVEALKX₃₉X₄₀ILX₄₃X₄₄L

P, где независимо друг от друга

X₃ выбирают из E, S, Q и C, предпочтительно E;

X₆ выбирают из E, S, C и V, предпочтительно E;

X₇ выбирают из A, S и L, предпочтительно A;

X₁₀ выбирают из A, S и R, предпочтительно A;

X₁₄ выбирают из A, S, C и K, предпочтительно, S;

X₂₆ выбирают из D, E и N, предпочтительно D;

X₃₉ выбирают из D, E и L, предпочтительно D;

X₄₀ выбирают из A, E и H, предпочтительно A;

X₄₃ выбирают из А и К, предпочтительно А;

X₄₄ выбирают из А, S и Е, предпочтительно А;

L в положении 45 присутствует или отсутствует, предпочтительно присутствует; и

P в положении 46 присутствует или отсутствует, предпочтительно присутствует.

Альтернативно, альбумин-связывающий домен может содержать аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 44.

Авторы изобретения достигли хороших результатов, используя альбумин-связывающий домен, обозначенный как ABD₁ (SEQ ID NO: 45). Предпочтительно использовать последовательность ABD₂ (SEQ ID NO: 46), которая деиммунизирована в отношении иммунной системы человека, т.е. адаптирована для предотвращения иммунных ответов у людей. Если не указано иное, раскрытых в настоящем описании в экспериментах используют указанный альбумин-связывающий домен. ABD₂ может кодироваться нуклеиновой кислотой SEQ ID NO: 57, кодоны которой оптимизированы для экспрессии в клетках человека.

Хотя в разных местах белка FVIII можно использовать разные альбумин-связывающие домены, как правило, все альбумин-связывающие домены в белке FVIII будут иметь одинаковую последовательность, предпочтительно ABD₂. В качестве альтернативы для получения поливалентного связывания альбумина в разных местах в белке FVIII можно использовать разные альбумин-связывающие домены.

Например, в белке FVIII по изобретению один альбумин-связывающий домен может быть С-терминальным по отношению к части тяжелой цепи, и один альбумин-связывающий домен может быть С-терминальным по отношению к части легкой цепи. Альтернативно, в одном из двух выбранных положений может находиться один альбумин-связывающий домен, а в другом - два, три, четыре или более альбумин-связывающих доменов. Например, один альбумин-связывающий домен может быть С-терминальным по отношению к части тяжелой цепи, и два альбумин-связывающих домена могут быть С-терминальными по отношению к части легкой цепи, или один альбумин-связывающий домен может быть С-терминальным по отношению к части тяжелой цепи, и три альбумин-связывающих домена могут быть С-терминальными по отношению к части легкой цепи, или один альбумин-связывающий домен может быть С-терминальным по отношению к части тяжелой цепи, и четыре альбумин-связывающих домена могут быть С-терминальными по отношению к части легкой цепи.

В белке FVIII по изобретению два альбумин-связывающих домена могут быть С-терминальными по отношению к части тяжелой цепи и один альбумин-связывающий домен может быть С-терминальным по отношению к части легкой цепи, или три альбумин-связывающих домена могут быть С-терминальными по отношению к части тяжелой цепи, и один альбумин-связывающий домен может быть С-терминальным по отношению к части легкой цепи, или четыре альбумин-связывающих домена могут быть С-терминальными по отношению к части тяжелой цепи, и один альбумин-связывающий

домен может быть С-терминальным по отношению к части легкой цепи.

Предпочтительно количество альбумин-связывающих доменов в каждом из двух положений одинаково. Также было показано, что предпочтительно, если белок FVIII по изобретению содержит по меньшей мере четыре альбумин-связывающих домена. Авторами изобретения было обнаружено, что периода полувыведения еще более сильно увеличен у белка фактора VIII по изобретению, содержащего по меньшей мере два альбумин-связывающих домена, С-терминальных по отношению к части тяжелой цепи, и по меньшей мере два альбумин-связывающих домена, С-терминальных по отношению к части легкой цепи, предпочтительно два альбумин-связывающих домена, С-терминальных по отношению к части тяжелой цепи, и два альбумин-связывающих домена, С-терминальных по отношению к части легкой цепи.

Изобретение также относится к белкам, фактору VIII, по изобретению с двумя альбумин-связывающими доменами, С-терминальными по отношению к части тяжелой цепи, и тремя альбумин-связывающими доменами, С-терминальными по отношению к части легкой цепи, или с двумя альбумин-связывающими доменами, С-терминальными по отношению к части тяжелой цепи, и четырьмя альбумин-связывающими доменами, С-терминальными по отношению к части легкой цепи, или с тремя альбумин-связывающими доменами, С-терминальными по отношению к части тяжелой цепи, и двумя альбумин-связывающими доменами, С-терминальными по отношению к части легкой цепи, или с четырьмя альбумин-связывающими доменами, С-терминальными по отношению к части тяжелой цепи, и двумя альбумин-связывающими доменами, С-терминальными по отношению к части легкой цепи. Необязательно количество альбумин-связывающих доменов, С-терминальных как по отношению к тяжелой цепи, так и по отношению к легкой цепи, является четным.

Линкер

Хотя авторы изобретения показали, что для активности и стабильности белков FVIII по изобретению линкеры по существу не требуются, для увеличения доступности всех доменов FVIII по изобретению, в частности, доступа к альбумину в крови, в некоторые белки FVIII по изобретению введены линкеры. Авторы изобретения показали, что линкеры, в частности включение по меньшей мере глицин-сериновых линкерных участков, дополнительно улучшают экспрессию и функцию. В частности, в дополнение к доступу к альбумину, по-видимому, также улучшается доступ к тромбину. Соответственно, альбумин-связывающие домены предпочтительно могут быть отделены от части тяжелой цепи и/или части легкой цепи и/или других альбумин-связывающих доменов с помощью линкера, при этом, необязательно, альбумин-связывающие домены отделены от части тяжелой цепи и части легкой цепи и (если они непосредственно примыкают друг к другу) других альбумин-связывающих доменов с помощью линкера. Также возможно отделение альбумин-связывающих доменов от части тяжелой цепи и части легкой цепи и (если, в противном случае, они непосредственно примыкают) других альбумин-связывающих доменов с помощью линкера, за исключением того, что линкер

отсутствует на N-конце легкой цепи, поскольку домен a3 содержит сайт расщепления тромбином.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по изобретению линкер содержит расщепляемый тромбином линкерный участок. Необязательно расщепляемый тромбином линкер имеет последовательность SEQ ID NO: 39 (аббр. L). В данной области известны другие сайты расщепления тромбином, например, раскрыты в Gallwitz et al. (2012, PLoS ONE 7(2):e31756). Таким образом, расщепляемые тромбином линкеры также могут содержать любой из этих расщепляемых сайтов. Преимущество расщепляемых тромбином линкеров состоит в том, что при образовании активного белка, т.е. после активации тромбином, линкеры могут быть расщеплены и, следовательно, альбумин-связывающие домены могут быть удалены из активного белка.

Альтернативно, в рекомбинантном белке фактора VIII по изобретению можно использовать нерасщепляемые глицин-сериновые линкерные участки для введения гибкого пространственного разделителя между мотивами во избежание структурных влияний. Таким образом, линкер необязательно содержит глицин-сериновый линкерный участок, который необязательно имеет последовательность SEQ ID NO: 40 (предпочтительная аббр. G1) или SEQ ID NO: 41 (аббр. G2). Линкер G1 может, например, кодироваться SEQ ID NO: 58. Линкер G2 может, например, кодироваться SEQ ID NO: 59.

В предпочтительных вариантах осуществления различные участки линкера комбинируют. Например, нерасщепляемые линкерные участки использовали для фланкирования центрального линкерного участка, расщепляемого тромбином, для сохранения доступа тромбина к расщепляемому тромбином линкерному участку. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления линкер содержит расщепляемый тромбином линкерный участок, фланкированный с каждой стороны глицин-сериновым линкерным участком, где указанный комбинированный линкер необязательно имеет последовательность SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 43, предпочтительно, SEQ ID NO: 42.

Полинуклеотидная последовательность всех линкеров предпочтительно является кодон-оптимизированной для применения к человеку. Типичные кодон-оптимизированные последовательности представлены в настоящем описании в контексте белков FVIII по изобретению.

Конкретные белки FVIII по изобретению

Все белки FVIII по изобретению продемонстрировали хорошую функциональность *in vitro*, при этом белки FVIII показали пониженное связывание с vWF, которое коррелировало с увеличением количества альбумин-связывающих доменов. vWF оказывает большое влияние на период полувыведения FVIII. Было обнаружено, что экранирование FVIII от vWF альбумином оказывает положительное влияние на время полувыведения белка FVIII. Было показано, что широко расположенные альбумин-связывающие домены с одним положением между тяжелой и легкой цепью и одним положением на C-конце белка усиливает экранирование FVIII от vWF.

Предпочтительно рекомбинантный белок фактора VIII по изобретению содержит один альбумин-связывающий домен между частью тяжелой цепи и частью легкой цепи и один альбумин-связывающий домен, расположенный С-терминально по отношению к части легкой цепи, причем последовательность является на по меньшей мере 70%, необязательно, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или 100% идентичной последовательности с SEQ ID NO: 47. Предпочтительно указанный белок представляет собой одноцепочечный белок. Одноцепочечный белок с SEQ ID NO: 47 обозначен как ADLCLD_SC. Было показано, что его период полувыведения *in vivo* увеличился примерно в 1,5 раза по сравнению с ReFacto AF®.

В особенно предпочтительном варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по изобретению содержит по меньшей мере два альбумин-связывающих домена между частью тяжелой цепи и частью легкой цепи и по меньшей мере два альбумин-связывающих домена, С-терминальных по отношению к части легкой цепи, при этом последовательность белка является на по меньшей мере 80% идентичной, необязательно на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичной любой из SEQ ID NO: 48, 49, 51. Предпочтительно рекомбинантный белок фактора VIII имеет последовательность, на по меньшей мере 80% идентичную, необязательно на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичную SEQ ID NO: 48. Предпочтительно указанный белок представляет собой одноцепочечный белок.

Рекомбинантный белок фактора VIII также может иметь последовательность, на по меньшей мере 80% идентичную, необязательно на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 49. Предпочтительно указанный белок представляет собой одноцепочечный белок.

Рекомбинантный белок фактора VIII также может иметь последовательность, на по меньшей мере 80% идентичную, необязательно на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% идентичную последовательности SEQ ID NO: 51. Предпочтительно указанный белок представляет собой одноцепочечный белок.

Например, изобретение относится к рекомбинантному белку FVIII, имеющему SEQ ID NO: 48 (AD2CD2_SC), SEQ ID NO: 49 (AD2CD2woL_SC) или SEQ ID NO: 51 (AbD2CD2_SC). Было показано, что такие белки FVIII имеют особенно длительный период полувыведения *in vivo*, например, в 2,5 раза увеличенный период полувыведения AD2CD2_SC *in vivo* был обнаружен у мышей с гемофилией А, а увеличенный в 2,5 раза период полувыведения фактора 4 был обнаружен у трансгенных новорожденных мышей с Fc-рецептором с дефицитом альбумина (см. примеры). Для AbD2CD2_SC было обнаружено увеличение периода полувыведения *in vivo* в 2,2 раза. Увеличение периода полувыведения можно анализировать по уровню антигена FVIII или по уровню активности, например, хромогенной активности, или по тому и другому. Предпочтительно его анализируют по уровню хромогенной активности.

Таким образом, изобретение относится к белкам FVIII по изобретению, в которых период полувыведения рекомбинантного белка фактора VIII *in vivo* удлинен (т.е. увеличен) по меньшей мере в 1,2 раза, предпочтительно по меньшей мере в 1,5 раза, необязательно, по меньшей мере в 2 или по меньшей мере 2,5 раза по сравнению с рекомбинантным белком фактора VIII SEQ ID NO: 28 (ReFacto AF®). Хотя увеличение периода полувыведения *in vivo* можно анализировать на модельных системах, например на мышах, крысах или собаках, например на мышах с гемофилией А или мышах Tg32 с дефицитом альбумина, нокаутных по мышинному альбумину и экспрессирующих человеческую α-цепь FcRn вместо мышинной (B6.Cg-Alb^{em12}Mvw Fcgrt^{tm1Dcr} Tg(FCGRT)32Dcr/MvwJ), наблюдаемое увеличение периода полувыведения *in vivo* может быть недооценено, поскольку человеческий альбумин имеет более длительный период полувыведения, чем, например, мышинный альбумин, и ожидается, что увеличение, наблюдаемое в мышинной модели, будет еще более выраженным у людей.

Для увеличения периода полувыведения белка FVIII по изобретению в плазме *in vivo* может быть использован партнер по слиянию. В одном из вариантов осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по изобретению представляет собой слитый белок по меньшей мере с одним дополнительным гетерологичным партнером по слиянию в дополнение к альбумин-связывающему фрагменту, предпочтительно с дополнительным партнером по слиянию, увеличивающим время полувыведения белка FVIII из плазмы *in vivo*. Партнер по слиянию может быть, например, выбран из группы, содержащей Fc-участок, альбумин, полипептиды PAS, полипептиды HAP, C-терминальный пептид бета-субъединицы хорионического гонадотропина и их комбинации. Альтернативно или дополнительно, белок FVIII может быть связан ковалентно с небелковыми партнерами по слиянию, такими как малые альбумин-связывающие молекулы (например, дабигатран), ПЭГ (полиэтиленгликоль) и/или ГЭК (гидроксиэтилкрахмал). Полипептиды PAS или последовательности PAS представляют собой полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, включающую в основном остатки аланина и серина или включающие в основном остатки аланина, пролина и серина, при этом в физиологических условиях последовательности PAS образуют конформацию случайного клубка, как определено в WO 2015/023894. Полипептиды или последовательности HAP представляют собой полимеры гомоаминокислот (HAP), содержащие, например, повторяющиеся последовательности глицина или глицина и серина, как определено в WO 2015/023894. Возможные слияния, партнеры по слиянию и их комбинации более подробно описаны, например, в WO 2015/023894.

Необязательно, для некоторых терапевтических применений рекомбинантный белок FVIII может быть слит с Fc-участком. Слияние с Fc-участком можно использовать для увеличения периода полувыведения и снижения иммуногенности.

Необязательно, указанный гетерологичный партнер по слиянию может быть вставлен непосредственно N-терминально или непосредственно C-терминально по отношению к одному из альбумин-связывающих доменов, например C-терминально по

отношению к тяжелой цепи и/или С-терминально по отношению к С2-домену, или С-терминально по отношению к альбумин-связывающему(им) домену(ам), С-терминально по отношению к тяжелой цепи или С-терминально по отношению к альбумин-связывающему(им) домену(ам), С-терминально по отношению к тяжелой цепи. Авторы изобретения обнаружили, что такое расположение является выгодным для слияния при сохранении хорошей биологической активности белка FVIII. Необязательно, слитый белок дополнительно содержит по меньшей мере один линкер.

Белок может быть дополнительно гликозилирован и/или сульфатирован. Предпочтительно посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование и/или сульфатирование белка, происходят в человеческой клетке. Особенно подходящий профиль посттрансляционных модификаций может быть достигнут с использованием человеческих клеточных линий для получения, например, клетки CAP, в частности клетки CAP-T или клетки CAP-Go (WO 2001/36615; WO 2007/056994; WO 2010/094280; WO 2016/110302). Клетки CAP, доступные от Cevec Pharmaceuticals GmbH (Cologne, Germany), происходят из человеческих амниоцитов, поскольку они были выделены трансабдоминально во время рутинного амниоцентеза. Полученные амниоциты трансформировали аденовирусными функциональными элементами (E1A, E1B и pIX) и впоследствии адаптировали к росту в суспензии в бессывороточной среде.

Во время посттрансляционной модификации белок FVIII по изобретению может быть сульфатирован, например, по одному, двум, трем, четырем, пяти или шести тирозинам в кислых областях $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$.

Деиммунизированные белки фактора VIII

Необязательно, рекомбинантный белок фактора VIII по изобретению представляет собой деиммунизированный белок, т.е. белок с пониженной иммуногенностью по сравнению с FVIII дикого типа у пациентов с гемофилией. Например, чтобы избежать присутствия эпитопов, которые могут быть презентированы на молекулах человеческого HLA, предпочтительно, на обычных молекулах человеческого HLA, вводили определенные мутации, предпочтительно замены.

Настоящее изобретение относится к рекомбинантному белку фактора VIII по изобретению, содержащему по меньшей мере три аминокислотные замены в положениях, выбранных из группы, состоящей из Y748, L171, S507, N79, I80, I105, S112, L160, V184, N233, L235, V257, I265, N299, Y426, Y430, L505, F555, I610, N616, I632, L706, N754, K1837, R1936, S2030, S2037, N2038, S2077, M2123, S2125, F2215, K2226, K2258, V2313, S2315, V2333 и Q2335;

где замены N независимо выбирают из группы, состоящей из D, H, S и E; где замены I независимо выбирают из группы, состоящей из T и V; где замены S независимо выбирают из группы, состоящей из A, N, G, T и E; где замены L независимо выбирают из группы, состоящей из N, Q, F и S; где замены V независимо выбирают из группы, состоящей из A и T; где замены Y независимо выбирают из группы, состоящей из N, H и S; где замены F независимо выбирают из группы, состоящей из H и S; где замены K

независимо выбирают из группы, состоящей из N, D, E, Q, S и T; где замены R независимо выбирают из группы, состоящей из Q, H и S; где замены M выбирают из группы, состоящей из R, Q, K и T; и/или где замены Q выбирают из группы, состоящей из R, D, E, H и K;

причем положения указаны относительно полноразмерной молекулы человеческого фактора VIII SEQ ID NO: 1, включая нумерацию сигнальной последовательности;

и причем рекомбинантный белок фактора VIII сохраняет по меньшей мере 50% коагулянтной активности, определенной с помощью хромогенного анализа, по сравнению с белком фактора VIII, состоящим из SEQ ID NO: 60 (FVIII-6rs). Изобретение также относится к слитому белку указанного рекомбинантного белка фактора VIII.

В одном из аспектов изобретение также относится к рекомбинантному белку фактора VIII по настоящему изобретению, причем рекомбинантный белок фактора VIII содержит по меньшей мере три аминокислотные замены в положениях, выбранных из группы, состоящей из Y748, L171, S507, N79, I80, I105, S112, L160, V184, N233, L235, V257, I265, N299, Y426, Y430, L505, F555, I610, N616, L706, N754, K1837, R1936, S2030, S2037, N2038, S2077, M2123, F2215, K2226, K2258, V2313, S2315, V2333 и Q2335;

где замены N независимо выбраны из группы, состоящей из D, H, S и E; где замены I независимо выбирают из группы, состоящей из T и V; где замены S независимо выбирают из группы, состоящей из A, N, G, T и E; где замены L независимо выбирают из группы, состоящей из N, Q, F и S; где замены V независимо выбирают из группы, состоящей из A и T; где замены Y независимо выбирают из группы, состоящей из N, H и S; где замены F независимо выбирают из группы, состоящей из H и S; где замены K независимо выбирают из группы, состоящей из N, D, E, Q, S и T; где замены R независимо выбирают из группы, состоящей из Q, H и S; где замены M выбирают из группы, состоящей из R, Q, K и T; и/или где замены Q выбирают из группы, состоящей из R, D, E, H и K;

причем положения указаны относительно полноразмерной молекулы человеческого фактора VIII SEQ ID NO: 1;

и причем рекомбинантный белок фактора VIII сохраняет по меньшей мере 50% коагулянтной активности, определенной с помощью хромогенного анализа, по сравнению с белком фактора VIII, состоящим из SEQ ID NO: 60. Изобретение также относится к слитому белку указанного рекомбинантного белка фактора VIII по изобретению.

Настоящее изобретение дополнительно относится к рекомбинантному белку фактора VIII по изобретению, содержащему по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из Y748, L171, S507, N79, I80, I105, S112, L160, V184, N233, L235, V257, I265, N299, Y426, Y430, L505, F555, I610, N616, I632, L706, N754, K1837, R1936, S2030, S2037, N2038, S2077, M2123, S2125, F2215, K2226, K2258, V2313, S2315, V2333 и Q2335 (или, предпочтительно, Y748, L171, S507, N79, I80, I105, S112, L160, V184, N233, L235, V257, I265, N299, Y426, Y430, L505, F555, I610, N616,

L706, N754, K1837, R1936, S2030, S2037, N2038, S2077, M2123, F2215, K2226, K2258, V2313, S2315, V2333 и Q2335);

где замены N независимо выбирают из группы, состоящей из D, H, S и E; где замены I независимо выбирают из группы, состоящей из T и V; где замены S независимо выбирают из группы, состоящей из A, N, G, T и E; где замены L независимо выбирают из группы, состоящей из N, Q, F и S; где замены V независимо выбирают из группы, состоящей из A и T; где замены Y независимо выбирают из группы, состоящей из N, H и S; где замены F независимо выбирают из группы, состоящей из H и S; где замены K независимо выбирают из группы, состоящей из N, D, E, Q, S и T; где замены R независимо выбирают из группы, состоящей из Q, H и S; где замены M выбирают из группы, состоящей из R, Q, K и T; и/или где замены Q выбирают из группы, состоящей из R, D, E, H и K;

причем, если замена находится в положении S507, она представляет собой S507E, и если замена находится в положении N616, она представляет собой N616E, и если замена находится в положении F2215, она представляет собой F2215H;

причем положения указаны относительно полноразмерной молекулы человеческого фактора VIII SEQ ID NO: 1, включая нумерацию сигнальной последовательности,

и причем рекомбинантный белок фактора VIII сохраняет по меньшей мере 50% коагулянтной активности, определенной с помощью хромогенного анализа, по сравнению с белком фактора VIII, состоящим из SEQ ID NO: 60 (FVIII-6rs),

или слитый белок указанного рекомбинантного белка фактора VIII. Указанный белок предпочтительно также представляет собой белок, содержащий по меньшей мере три замены, определенные выше.

Предпочтительно, если замена находится в положении K2226, она представляет собой K2226Q, и, если замена находится в положении Q2335, она представляет собой Q2335H. В одном из вариантов осуществления замена Q2335 отсутствует.

Авторы изобретения обнаружили, что рекомбинантный белок фактора VIII по изобретению, имеющий замены, определенные в настоящем описании, имеет значительно сниженную иммуногенность, практически сохраняя коагулянтную активность. Соответственно, это полезно для лечения гемофилии А, в частности, для предотвращения образования и/или дальнейшего образования анти-FVIII антител, включая FVIII-ингибирующие антитела.

Белки FVIII по изобретению деиммунизированы на уровне Т-клеточных эпитопов. Как правило, антигены презентированы Т-клеткам в виде пептидов, связанных с МНС класса II на поверхности APC. Поскольку Т-клеточные эпитопы, релевантные для большей части человеческой популяции, идентифицированы и удалены из белка по изобретению, Т-клеткам будет презентировано меньшее количество иммуногенных пептидов антигенпрезентирующими клетками (APC), например, дендритными клетками (ДК) или В-клетками. Это, в свою очередь, позволит предотвратить или снизить

активацию наивных Т-клеток. Без активированных Т-хелперов наивные В-клетки не активируются и не могут дифференцироваться в В-клетки, секретирующие анти-FVIII антитела в плазму, и В-клетки памяти.

Таким образом, подход по настоящему изобретению позволяет снизить или, более оптимально, предотвратить образование антител в самом начале процесса, в частности, путем уменьшения стимуляции наивных Т-хелперных клеток в ответ на антигены FVIII. В дополнение к снижению созревания наивных Т-хелперов рестимуляция Т-хелперов памяти в ответ на уже потенциально присутствующий FVIII также может быть предотвращена или уменьшена благодаря сниженной презентации антигена в соответствии с подходом по изобретению.

Известны положения в связывающей бороздке МНС класса II, необходимые для связывания пептидов, а также аминокислот пептида, важные для связывания. В качестве первого шага были использованы методы анализа *in silico*, чтобы предсказать, какие пептиды FVIII вероятнее всего связаны в общие комплексы МНС класса II, а какие из них встречаются только в FVIII, а не в других человеческих белках. Эти пептиды считаются иммуногенными. Используя дополнительные инструменты *in silico* и методы сравнения как с FVIII других видов, так и с неродственными человеческими белками, были сделаны рекомендации по аминокислотным мутациям для предотвращения связывания пептида FVIII с комплексом МНС класса II. Как описано в заявке РСТ/EP2019/059233, поданной 11 апреля 2019 г., на основе этих прогнозов и экспериментальных тестов были созданы мутированные варианты FVIII, которые все еще остаются функциональными при коагуляции, но считается, что они больше не вызывают образования ингибирующих антител у страдающих гемофилией А пациентов в той же степени. Для целей настоящего изобретения создавали и тестировали деиммунизированные белки FVIII, содержащие часть тяжелой цепи и часть легкой цепи фактора VIII и по меньшей мере два альбумин-связывающих домена, где по меньшей мере один альбумин-связывающий домен является С-терминальным по отношению к части тяжелой цепи, и по меньшей мере один альбумин-связывающий домен является С-терминальным по отношению к части легкой цепи, при этом, если белок является одноцепочечным белком, альбумин-связывающий(ие) домен(ы), С-терминальный(ые) по отношению к части тяжелой цепи, является/являются N-концевым(и) по отношению к части легкой цепи.

Деиммунизированные белки FVIII по изобретению обладают по меньшей мере 50% коагулянтной активностью, определенной с помощью хромогенного анализа, по сравнению с белком фактора VIII, состоящим из SEQ ID NO: 60 (FVIII-6rs). FVIII-6rs представляет собой белок FVIII с удаленным В-доменом, не содержащий дополнительных мутаций, который обладает по существу такой же коагулянтной активностью, как человеческий FVIII дикого типа. Предпочтительно белки FVIII по изобретению обладают коагулянтной активностью, составляющей по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 100% по сравнению с белком фактора VIII, состоящим из SEQ ID NO: 60. Коагулянтная активность также может быть выше,

например, составлять по меньшей мере 110%, по меньшей мере 120%, по меньшей мере 130%, по меньшей мере 140%, по меньшей мере 150%, по меньшей мере 190%, по меньшей мере 200% или по меньшей мере 400% коагулянтной активности белка фактора VIII, состоящего из SEQ ID NO: 60.

Во всем изобретении, если не указано иное, коагулянтную активность определяют с помощью хромогенного анализа. Хромогенный анализ выполняют в соответствии со стандартными процедурами, например, подробно описанными в приведенных ниже примерах. Этот анализ предпочтительно выполняют с супернатантом человеческих клеток, например клеток HEK293-F, трансфицированных вектором экспрессии, например, описанным в примерах, и экспрессирующих представляющий интерес вариант FVIII, по сравнению с супернатантом тех же клеток, трансфицированных в тех же условиях таким же основным вектором экспрессии, экспрессирующим FVIII-6rs. Соответственно, может быть проанализирована относительная коагулянтная активность, при этом хромогенную коагулянтную активность мутантов стандартизируют по хромогенной коагулянтной активности молекулы без мутаций, а именно FVIII-6rs. Этот анализ позволяет оценить как способность мутантного белка быть синтезированным и секретированным клетками, так и коагулянтную активность секретируемого белка.

Кроме того, FVIII по изобретению предпочтительно дополнительно обладает высокой удельной коагулянтной активностью. Удельная коагулянтная активность описывает отношение хромогенной коагулянтной активности FVIII, как определено выше, к концентрации антигена FVIII, определенной с помощью FVIII-специфического ELISA (например, как раскрыто в настоящем описании). Удельная коагулянтная активность белка FVIII по изобретению может составлять, например, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 110%, по меньшей мере 120%, по меньшей мере 130%, по меньшей мере 150%, по меньшей мере 170% или по меньшей мере 190%.

Можно предположить, что в случае белков с низкой относительной коагулянтной активностью в супернатанте, но высокой удельной коагулянтной активностью возникнут проблемы, связанные с их синтезом, укладкой и/или секрецией. Это потенциально можно улучшить путем экспрессии в определенных клеточных линиях, например, при сверхэкспрессии шаперонов.

Белки фактора VIII по настоящему изобретению могут иметь как коагулянтную активность, так и удельную коагулянтную активность (обе определяют хромогенным методом), составляющую по меньшей мере 50% по сравнению с FVIII-6rs, предпочтительно по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100%, по меньшей мере 110%, по меньшей мере 120% или по меньшей мере 130%, соответственно.

Коагулянтную активность можно альтернативно или дополнительно оценить одностадийным клоттинговым (свертывания крови) методом, как раскрыто в экспериментальной части настоящего описания. В особенно предпочтительном варианте

осуществления коагулянтная активность, определенная как хромогенным методом, так и клоттинговым методом, составляет по меньшей мере 50% по сравнению с коагулянтной активностью FVIII-6rs, предпочтительно по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 100% или даже по меньшей мере 150%.

Авторы изобретения обнаружили, что специфические протестированные замены оказались особенно предпочтительными как в отношении сниженной иммуногенности, так и в отношении сохранения функциональной активности при коагуляции. Соответственно, во всем изобретении аминокислотные замены в рекомбинантном белке фактора VIII по изобретению предпочтительно выбирают из группы, состоящей из Y748S, L171Q, S507E, N79S, I80T, I105V, S112T, L160S, V184A, N233D, L235F, V257A, I265T, N299D, Y426H, Y430H, L505N, F555H, I610T, N616E, I632T, L706N, N754D, K1837E, R1936Q, S2030A, S2037G, N2038D, S2077G, M2123K, S2125G, F2215H, K2226Q, K2258Q, V2313A, S2315T, V2333A и Q2335H.

Белок фактора VIII по изобретению может, например, содержать 3-38, 3-25, 4-25, 5-24, 6-23, 7-22, 8-21, 9-20, 10-19, 11-18, 12-17, 13-16 или 14-15 указанных замен. Предпочтительно рекомбинантный белок фактора VIII по изобретению содержит от 3 до 25 указанных замен, причем замены расположены в разных иммуногенных кластерах. Иммуногенный кластер представляет собой пептид, идентифицированный в белке, который связывается с множеством супертипов HLA-DR с высоким сродством. Другими словами, иммуногенные кластеры представляют собой кластеры Т-клеточных эпитопов для различных супертипов HLA, идентифицированных в белке, например, как более подробно описано в примерах ниже. Иммуногенные кластеры FVIII определены в SEQ ID NO: 74-108 и 112 (таблица 6). Необязательно на один иммуногенный кластер приходится только одна из перечисленных замен. Наиболее предпочтительно рекомбинантный белок фактора VIII по изобретению содержит 15-19 указанных замен.

Рекомбинантный белок фактора VIII по изобретению, содержащий по меньшей мере три замены, расположенные в разных иммуногенных кластерах, предпочтительно содержит по меньшей мере три аминокислотные замены в положениях, выбранных из группы, состоящей из Y748, L171, S507, N79, S112, L160, V184, N233, I265, N299, Y426, F555, N616, I632, L706, K1837, R1936, N2038, S2077, S2125, F2215, K2226, K2258, S2315 и V2333. По меньшей мере три аминокислотные замены предпочтительно выбирают из группы, состоящей из Y748S, L171Q, S507E, N79S, S112T, L160S, V184A, N233D, I265T, N299D, Y426H, F555H, N616E, I632T, L706N, K1837E, R1936Q, N2038D, S2077G, S2125G, F2215H, K2226Q, K2258Q, S2315T и V2333A.

Предпочтительные белки FVIII включают замены в четырех положениях в области A1 и/или в 7 положениях в A1, и/или в 3 положениях в A1A2, и/или в 5 положениях в A2, и/или в 6 положениях в A3C1C2, которые обладают удельной коагулянтной активностью, составляющей более 100%, например, согласно следующему списку:

A1: N79, S112, N233, I265; особенно N79S, S112T, N233D, I265T

A1: N79, S112, L160, L171, V184, N233, I265;
особенно N79S, S112T, L160S, L171Q, V184A, N233D, I265T; A1A2: N299, Y426, S507; особенно N299D, Y426H, S507E

A2: F555, N616, I632, L706, Y748; особенно F555H, N616E, I632T, L706N, Y748S

A3C1C2: N2038, S2077, S2125, K2258, S2315, V2333; особенно N2038D, S2077G, S2125G, K2258Q, S2315T, V2333A.

Другие предпочтительные белки FVIII включают замены в 4 положениях в A2 и/или 3 положениях в A3C1C2, и/или 4 положениях в A3C1C2, и/или 4 положениях в A3C1C2, и/или 5 положениях в A3C1C2:

A2: F555, N616, L706, Y748; особенно F555H, N616E, L706N, Y748S

A3C1C2: S2077, S2315, V2333; особенно S2077G, S2315T, V2333A

A3C1C2: N2038, S2077, S2315, V2333; особенно N2038D, S2077G, S2315T, V2333A

A3C1C2: S2077, K2258, S2315, V2333; особенно S2077G, K2258Q, S2315T, V2333A

A3C1C2: N2038, S2077, K2258, S2315, V2333; особенно N2038D, S2077G, K2258Q, S2315T, V2333A.

Предпочтительные комбинации с особенно хорошими результатами в отношении коагулянтной активности (хромогенная коагулянтная активность, свертывающая (коагулянтная) активность и удельная коагулянтная активность) включают замены в следующих положениях:

FVIII-GOF1: L171; S507; Y748; V2333; особенно L171Q; S507E; Y748S; V2333A

FVIII-GOF2: L171; N299; N616; V2333; особенно L171Q; N299D; N616E; V2333A.

Другими предпочтительными комбинациями с особенно хорошими результатами по уменьшению оценки кластера, которые, соответственно, рассчитаны для сильного снижения иммуногенности, являются:

FVIII-LS1: S112; S507; Y748; K1837; N2038; especially S112T; S507E; Y748S; K1837E; N2038D

FVIII-LS2: S112; Y426; N754; K1837; N2038; especially S112T; Y426H; N754D; K1837E; N2038D

Предпочтительные рекомбинантные белки фактора VIII по изобретению содержат аминокислотные замены по меньшей мере в положениях:

a. N79S, S112T, N233D и I265T; и/или

b. N79S, S112T, L160S, L171Q, V184A, N233D и I265T; и/или

c. N299D, Y426H и S507E; и/или

d. F555H, N616E, L706N, Y748S; и/или

e. F555H, N616E, I632T, L706N и Y748S; и/или

f. S2077G, S2315T и V2333A; и/или

g. N2038D, S2077G, S2315T и V2333A; и/или

h. S2077G, K2258Q, S2315T и V2333A; и/или

i. N2038D, S2077G, K2258Q, S2315T и V2333A; и/или

j. N2038D, S2077G, S2125G, K2258Q, S2315T и V2333A; и/или

k. L171Q, S507E, Y748S and V2333A; и/или

l. L171Q, N299D, N616E and V2333A; и/или

m. S112T, S507E, Y748S, K1837E и N2038D; и/или

n. S112T, Y426H, N754D, K1837E и N2038D.

Предпочтительные белки по изобретению имеют замены, перечисленные на фиг. 14 настоящего документа.

Особенно предпочтительные белки содержат комбинации по меньшей мере замен, указанных в пунктах b и c. Как показано на фиг. 14, эти замены в комбинации приводят к высокой хромогенной и свертывающей (коагулянтной) активностям, а также к высокой удельной коагулянтной активности. Другие особенно предпочтительные белки по изобретению содержат комбинацию по меньшей мере замен, указанных в пунктах b и c, и замен, указанных в пунктах d или e, и/или f, g, h, i или j, и/или K1837E. Белок по изобретению может, например, включать замены, указанные в пунктах b, c и d или e. Другие предпочтительные белки по изобретению включают замены, указанные в пунктах b, c и d и f, g, h, i или j. Другие предпочтительные белки по изобретению включают замены, указанные в пунктах b, c и e и f, g, h, i или j.

Необязательно белки дополнительно содержат K1837E. Эта замена оказывает сильное влияние на иммуногенный показатель, но, по-видимому, оказывает негативное влияние на коагулянтную активность белка. Соответственно, также предполагается, что белки по изобретению не содержат замену в K1837 или не содержат K1837E.

Необязательно белки по изобретению, например, содержащие замены Y748S, L171Q, S507E, N79S, S112T, L160S, V184A, N233D, I265T, N299D, Y426H, F555H, I632T, L706N, K1837E, R1936Q, N2038D, S2077G, S2125G, F2215H, K2226Q, K2258Q, S2315T и V2333A, не содержат замену в N616, такую как N616E. С другой стороны, включение этой замены дополнительно снижает иммуногенный показатель и иммуногенность белка, так что в целом включение этой замены является предпочтительным.

В одной из комбинаций белки по изобретению содержат замены Y748S, L171Q, N79S, S112T, L160S, V184A, I265T, N299D, Y426H, F555H, I632T, L706N, R1936Q, N2038D, S2077G, S2125G, F2215H, K2226Q, K2258Q и, необязательно, S507E.

Авторы изобретения смогли, в частности, продемонстрировать предпочтительные комбинации замен рекомбинантных белков фактора VIII, содержащие по меньшей мере аминокислотные замены в положениях N79, S112, L160, L171, V184, N233, I265, N299, Y426, S507, F555, N616, L706 и Y748, где предпочтительными заменами являются N79S, S112T, L160S, L171Q, V184A, N233D, I265T, N299D, Y426H, S507E, F555H, N616E, L706N и Y748S (например, FVIII-14M). Необязательно белок дополнительно включает замену в K1837, такую как K1837E.

Предпочтительно все аминокислоты, выбранные для замены в указанных положениях, снижают оценку кластера соответствующего иммуногенного кластера.

Деиммунизированные рекомбинантные белки фактора VIII по изобретению обладают пониженной иммуногенностью по сравнению с белком фактора VIII, состоящим

из SEQ ID NO: 60 (FVIII-6rs). Иммуногенность можно определить по показателю иммуногенности, который можно рассчитать, как раскрыто в настоящем описании. Показатель иммуногенности FVIII-6rs составляет 7,01, а показатель иммуногенности ReFacto AF - 10,03. Предпочтительно белки фактора VIII по изобретению имеют показатель иммуногенности, который снижен на по меньшей мере 3, по меньшей мере на 5, по меньшей мере на 7, по меньшей мере на 10, по меньшей мере на 12, по меньшей мере на 13 или по меньшей мере на 15 по сравнению с белком фактора VIII без указанных замен, например, по сравнению с FVIII-6rs. Например, FVIII-19M имеет показатель иммуногенности -10,55, т.е. показатель иммуногенности снижен на 17,56 по сравнению с FVIII-6rs. В качестве дополнительного примера SEQ ID NO: 16 (AC_SC) имеет показатель иммуногенности 11,18, который при включении указанных 19 деиммунизирующих аминокислотных замен (SEQ ID: 113 (AC-19M_SC) снижается на 17,58. Дополнительное включение четырех альбумин-связывающие доменов с линкерами в SEQ ID NO: 114 (AD2CD2-19M_SC) приводит к еще более низкому показателю иммуногенности 14,93.

Предпочтительно иммуногенность может быть определена с помощью анализа, включающего совместное культивирование дендритных клеток, инкубированных с указанным белком, с CD4⁺ Т-клетками донора, обедненными регуляторными Т-клетками, и тестирование активации указанных Т-клеток. Такой анализ, предложенный авторами изобретения, более подробно описан ниже. Т-клетки могут быть получены от здорового донора или от пациента, например, больного гемофилией А.

Во всех деиммунизированных рекомбинантных белках FVIII по изобретению положения указаны относительно полноразмерной молекулы человеческого фактора VIII SEQ ID NO: 1. В уровне техники аннотации аминокислот в молекуле FVIII различаются в зависимости от авторов. Это в основном связано с сигнальной последовательностью из 19 аминокислот, которая может быть включена при подсчете аминокислот или может быть опущена. Эта вариация, плюс-минус 19 аминокислот, как правило, является единственной разницей в нумерации полноразмерных последовательностей FVIII. В случае последовательностей FVIII с удаленным В-доменом делеция также может привести к изменению нумерации. В случае тяжелой цепи нумерация коррелирует с нумерацией полноразмерного FVIII. Начиная с делеции В-домена, нумерация легкой цепи либо остается такой же, как и для полноразмерной молекулы FVIII (например, за расположенным перед делецией Q763 после делеции следует D1582), либо может быть продолжена, как если бы делеция отсутствовала (например, за Q763 следует D764, несмотря на отсутствующие аминокислоты). Продолжение нумерации усложняет сравнение аминокислотных последовательностей, если неизвестно, сколько аминокислот было удалено. Продолжение нумерации встречается редко, и большинство авторов сохраняют нумерацию полноразмерной молекулы FVIII, несмотря на делецию В-домена. В соответствии с этим в настоящем изобретении положения замен в рекомбинантном белке FVIII указаны относительно полноразмерной молекулы человеческого FVIII SEQ ID NO: 1. Тем не менее, секретируемый рекомбинантный белок FVIII не содержит

сигнальную последовательность, содержит альбумин-связывающие домены, как указано в настоящем документе, и обычно представляет собой вариант с удаленным В-доменом.

В данной области техники известно, что для надлежащей коагулянтной функции FVIII В-домен не требуется, и поэтому хорошо известны различные белки FVIII с удаленным В-доменом. В контексте настоящего изобретения белок FVIII с делецией В-домена может включать полную или частичную делецию(ии) В-домена. Белок FVIII с удаленным В-доменом может по-прежнему содержать аминотерминальные последовательности В-домена, которые могут, например, иметь важное значение для протеолитического процессинга продукта трансляции. Более того, белок FVIII с удаленным В-доменом может содержать один или более фрагментов В-домена для сохранения одного или более сайтов N-гликозилирования. Белок FVIII предпочтительно не содержит сайтов расщепления фурином, что приводит к одноцепочечному белку, в котором легкая и тяжелая цепи белка связаны ковалентно.

Например, белок FVIII с удаленным В-доменом может по-прежнему содержать 0-200 остатков, например, 1-100 остатков, предпочтительно 8-90 остатков В-домена. Сохранившиеся остатки В-домена могут происходить из N-конца, и/или С-конца, и/или внутренних областей В-домена. Например, сохранившиеся остатки из С-конца В-домена могут включать 1-100, предпочтительно 20-90, более предпочтительно 86 остатков. В других вариантах осуществления сохранившиеся остатки из С-конца могут включать 1-20 остатков, например 4 остатка. Например, сохранившиеся остатки из N-конца В-домена могут включать 1-100, предпочтительно 2-20 остатков, более предпочтительно 2-10 остатков, более предпочтительно 4 остатка. Например, сохранившиеся остатки из внутренних областей В-домена могут содержать от 2 до 20, предпочтительно от 2 до 10, более предпочтительно от 4 до 8 остатков. В предпочтительном варианте белок FVIII содержит 86 С-концевых остатков В-домена и 4 N-концевых остатка В-домена, например, как в FVIII-19M.

Во всем изобретении рекомбинантный белок фактора VIII по изобретению может быть на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичным последовательности зрелого (без сигнальной последовательности) белка FVIII-19M с SEQ ID NO: 63, в котором для определения идентичности последовательности рассматривают только домены A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2 (остатки 20-759 и остатки 1668-2351). Другими словами, при определении идентичности последовательности не учитываются В-домен (остатки 760-1667 полноразмерной человеческой последовательности SEQ ID NO: 1 и соответствующие им остатки в белках с частично удаленным В-доменом) и сигнальная последовательность (остатки 1-19), а также альбумин-связывающие домены и, необязательно, линкеры или другие партнеры по слиянию.

Соответственно, % идентичности последовательности относительно зрелого полноразмерного белка человеческого фактора VIII SEQ ID NO: 1 или его варианта с удаленным В-доменом, например с SEQ ID NO: 61, для белка FVIII с SEQ ID NO: 63

является одним и тем же, в частности, составляет 98,67%, когда для определения идентичности последовательностей учитываются только домены A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2. Предпочтительные белки FVIII по изобретению являются идентичными последовательности SEQ ID NO: 63 на по меньшей мере 98,74%, при этом при определении идентичности последовательности учитываются только домены A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2.

Например, для зрелого белка FVIII с удаленным В-доменом и только с одной из перечисленных замен % идентичности последовательности относительно зрелого белка FVIII-19M с SEQ ID NO: 63 определяют по доменам A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2, т.е. 18 из 1424 аминокислот заменены, и белок, соответственно, является на по меньшей мере 98,74% идентичным последовательности белка FVIII-19M с SEQ ID NO: 63. Для зрелого белка FVIII с удаленным доменом В и с 3 из указанных замен, также встречающихся в FVIII-19M, % идентичности последовательности относительно зрелого белка FVIII-19M SEQ ID NO: 63 определяют по доменам A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2, т.е. 16 из 1424 аминокислот заменены, и белок, соответственно, является на 98,88% идентичным последовательности белка FVIII-19M с SEQ ID NO: 63. В зрелом белке FVIII с удаленным В-доменом по изобретению и с 4 указанными заменами, также встречающимися в FVIII-19M, т.е. заменены 15 из 1424 аминокислот, и, таким образом, % идентичности его последовательности составляет 98,95%. Зрелый белок FVIII с удаленным доменом В, включающий все 38 указанных замен, имеет 19 дополнительных замен по сравнению с FVIII-19M и, таким образом, на 98,67% идентичен последовательности FVIII-19M.

Если идентичность последовательности определяется ссылкой только на домены A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2, идентичность последовательности также определяется только для части молекулы фактора VIII (определенной на основе доменов A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2), т.е. альбумин-связывающие домены и, необязательно, линкеры не учитываются, или если белок представляет собой слитый белок с дополнительным партнером по слиянию (например, содержит вставки любого размера), слитые или вставленные части, белковые домены или области (например, как дополнительно раскрыто в настоящем описании) не учитываются. Таким образом, для определения идентичности последовательностей партнеры по слиянию, если присутствуют, не учитываются, и % идентичности последовательности вычисляют в отношении доменов A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2. Идентичность последовательности можно вычислить методами, известными в данной области, например, с помощью алгоритма Нидлмана-Вунша или, предпочтительно, с помощью алгоритма Смита-Уотермана (Smith et al., 1981. Identification of Common Molecular Subsequences, J Mol Biol. 147:195-197).

В одном из вариантов осуществления все остатки белка FVIII, в частности, применительно к доменам A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2, за исключением указанных в настоящем описании замен, соответствуют (т.е. идентичны) остаткам белка человеческого фактора VIII SEQ ID NO: 1. Необязательно, это также может относиться к В-домену или тем частям В-домена, которые присутствуют.

В другом варианте осуществления белок FVIII по изобретению включает дополнительные мутации, например мутации, известные в данной области техники, для снижения иммуногенности либо в отношении дополнительных Т-клеточных эпитопов и/либо В-клеточных эпитопов, и/или мутации, известные в данной области техники для увеличения периода полувыведения белка из сыворотки, и/или мутации, облегчающие очистку белка, например, приводящие к одноцепочечному белку. Мутации также могут быть введены в результате частичной делеции В-домена и получения одноцепочечного белка.

Рекомбинантный белок фактора VIII по изобретению может быть, например, на по меньшей мере 90%, необязательно, 100% идентичным последовательности aa 20-1533 SEQ ID NO: 65 (FVIII-15M), т.е. зрелый белок не содержит 19 aa N-концевой сигнальной последовательности, при этом для определения идентичности последовательности рассматриваются только домены A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2.

Предпочтительный рекомбинантный белок фактора VIII содержит по меньшей мере 18 аминокислотных замен в положениях N79, S112, L160, L171, V184, N233, I265, N299, Y426, S507, F555, N616, L706, Y748, N2038, S2077, S2315 и V2333, где предпочтительно 18 замен представляют собой N79S, S112T, L160S, L171Q, V184A, N233D, I265T, N299D, Y426H, S507E, F555H, N616E, L706N, Y748S, N2038D, S2077G, S2315T и V2333A. Необязательно, белок является на по меньшей мере 90%, например, 100% идентичным aa 20-1533 SEQ ID NO: 64 (FVIII-18M), т.е. зрелый белок не содержит 19 аминокислот N-концевой сигнальной последовательности, причем для определения идентичности последовательности рассматриваются только домены A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2.

Другой предпочтительный рекомбинантный белок фактора VIII содержит по меньшей мере 19 аминокислотных замен в положениях N79, S112, L160, L171, V184, N233, I265, N299, Y426, S507, F555, N616, L706, Y748, K1837, N2038, S2077, S2315 и V2333, где предпочтительно 19 замен представляют собой N79S, S112T, L160S, L171Q, V184A, N233D, I265T, N299D, Y426H, S507E, F555H, N616E, L706N, Y748S, K1837E, N2038D, S2077G, S2315T и V2333A. Необязательно белок является на 100% идентичным aa 20-1533 SEQ ID NO: 63 (FVIII-19M), т.е. зрелый белок не содержит 19 аминокислот N-концевой сигнальной последовательности, причем для определения идентичности последовательностей рассматривают только домены A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2.

Хотя в целом авторы изобретения обнаружили, что введение указанных выше 19 мутаций приводит к уменьшению количества Т-клеточных эпитопов, было найдено, что мутации в положениях L160, F555 и S2315 обеспечивают потенциальные Т-клеточные эпитопы *de novo*. Таким образом, предпочтительно по возможности избегать этих мутаций. Следовательно, другой предпочтительный рекомбинантный белок фактора VIII содержит по меньшей мере 16 аминокислотных замен в положениях N79, S112, L171, V184, N233, I265, N299, Y426, S507, N616, L706, Y748, K1837, N2038, S2077 и V2333, где предпочтительно 16 замен представляют собой N79S, S112T, L171Q, V184A, N233D,

I265T, N299D, Y426H, S507E, N616E, L706N, Y748S, K1837E, N2038D, S2077G и V2333A. Предпочтительно указанный белок содержит по меньшей мере одно, предпочтительно все L160, F555 и S2315, т.е. он не содержит мутаций в этих положениях. Необязательно белок имеет последовательность, на 100% идентичную aa 20-1533 SEQ ID NO: 134 (FVIII-16M_SC), т.е. зрелый белок не содержит 19 аминокислот N-концевой сигнальной последовательности, причем для определения идентичности последовательностей рассматривают только домены A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2.

Последовательности других белков FVIII, по отношению к которым белки по изобретению могут иметь 100% идентичность последовательности, где для определения идентичности последовательности рассматривают только домены A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2, приведены в SEQ ID NO: 66-73 или 109, причем, хотя все последовательности содержат 19 aa N-концевую сигнальную последовательность, предпочтительные зрелые белки FVIII по изобретению вообще не содержат сигнальную последовательность. Соответственно, они могут быть на по меньшей мере 90% или, необязательно, 100% идентичными aa 20-1533 SEQ ID NO: 66-73 или 103, соответственно, причем для определения идентичности последовательностей рассматривают только домены A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2.

Изобретение также относится к белкам FVIII по изобретению, которые на 100% идентичны последовательности любой из SEQ ID NO: 114-119, причем для определения идентичности последовательности рассматривают только домены A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2, и причем, хотя все последовательности содержат 19 aa N-концевую сигнальную последовательность, предпочтительные зрелые белки FVIII по изобретению вообще не содержат сигнальную последовательность. Соответственно, они могут быть на 100% идентичны aa 20-1778 SEQ ID NO: 114 или aa 20-1594 SEQ ID NO: 115, или aa 20-1575 SEQ ID NO: 116, или aa 20-1575 SEQ ID NO: 117, или aa 20-1686 SEQ ID NO: 118, или aa 20-1778 SEQ ID NO: 119, соответственно, причем для определения идентичности последовательностей рассматривают только домены A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2.

Изобретение также относится к белкам FVIII, которые являются на по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или 100% идентичными последовательности любой из SEQ ID NO: 114-119, причем, хотя все последовательности содержат 19 aa N-концевую сигнальную последовательность, предпочтительные зрелые белки FVIII по изобретению вообще не содержат сигнальную последовательность. Эти белки также могут содержать альбумин-связывающие домены и/или линкеры, приведенные в SEQ ID NO: 114-119. Соответственно, они могут быть на по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или 100% идентичными aa 20-1778 SEQ ID NO: 114. Белок по изобретению может быть на по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или 100% идентичным aa 20-1594 SEQ ID NO: 115. Белок по изобретению может быть на по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по

меньшей мере 99% или 100% идентичным aa 20-1575 SEQ ID NO: 116. Белок по изобретению может быть на по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или 100% идентичным aa 20-1575 SEQ ID NO: 117. Белок по изобретению может быть на по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или 100% идентичным aa 20-1686 SEQ ID NO: 118. Белок по изобретению может быть на по меньшей мере 80%, предпочтительно, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 99% или 100% идентичным aa 20-1778 SEQ ID NO: 119.

Как описано выше, часть FVIII белка FVIII по изобретению может быть деиммунизирована. Дополнительно или альтернативно также можно деиммунизировать линкерные области, расположенные между частями FVIII, ABD и линкерами. Замены в положениях, которые приводят к деиммунизации таких областей, указаны в Таблице 10 ниже. Белки FVIII по изобретению могут содержать по меньшей мере одну, предпочтительно 2 или более, три или более, четыре или более, пять или более, шесть или более, семь или более, восемь или более, девять или более, десять или более, 11 или более, 12 или более, 13 или более или 14 замен, перечисленных в указанной таблице, предпочтительно в одной из перечисленных комбинаций. Кроме того, первая аминокислота расщепляемого тромбином линкера, С-терминального по отношению к последовательности процессинга, может быть заменен на D, как определено, например, выше.

В дополнение к альбумин-связывающим доменам, содержащимся в белке FVIII по изобретению, этот белок может быть белком слияния с другим партнером по слиянию, например, белком слияния рекомбинантного белка фактора VIII, который является на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичным последовательности FVIII-19M, приведенной в SEQ ID NO: 63, причем для вычисления идентичности последовательностей учитывают только домены A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2.

Партнер по слиянию предпочтительно продлевает период полувыведения белка FVIII по настоящему изобретению из сыворотки *in vivo*. Партнер по слиянию может быть выбран из группы, содержащей Fc-участок, альбумин, полипептиды PAS, полипептиды НАР, С-концевой пептид бета-субъединицы хорионического гонадотропина и их комбинации. Белок FVIII может альтернативно или дополнительно быть ковалентно связан с небелковыми партнерами по слиянию, такими как альбумин-связывающие малые молекулы и/или ПЭГ (полиэтиленгликоль) и/или ГЭК (гидроксиэтилкрахмал). Полипептиды PAS или последовательности PAS представляют собой полипептиды, содержащие аминокислотную последовательность, содержащую в основном остатки аланина и серина или содержащие в основном остатки аланина, пролина и серина, при этом последовательности PAS образуют в физиологических условиях конформацию случайного клубка, как определено в WO 2015/023894. Полипептиды или последовательности НАР представляют собой полимеры гомоаминокислот (НАР),

содержащие, например, повторяющиеся последовательности глицина или глицина и серина, как определено в WO 2015/023894. Возможные слияния, партнеры по слиянию и их комбинации более подробно описаны, например, в WO 2015/023894.

Предпочтительно для терапевтического применения рекомбинантный белок FVIII по меньшей мере слит с Fc-участком. В уровне техники известно, что иммуногенность слитых белков FVIII с Fc-участками снижена (Krishnamoorthy et al., Recombinant factor VIII Fc (rFVIII-Fc) fusion protein reduces immunogenicity and induces tolerance in hemophilia A mice, *Cell. Immunol.* 2016, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2015.12.2008>; Carcao et al., Recombinant factor VIII Fc fusion protein for immune tolerance induction in patients with severe haemophilia A with inhibitors - A retrospective analysis. *Haemophilia* 2018:1-8).

Партнеры по слиянию могут, например, быть связаны с N-концом или C-концом белка FVIII по изобретению, но они также могут быть встроены в последовательность FVIII при условии, что белок FVIII остается функциональным, как определено в настоящем описании. Как описано выше, для определения идентичности последовательности считается, что вставки, например, одного, двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти партнеров по слиянию, как определено в настоящем описании, не снижают идентичность последовательности при определении идентичности последовательности со ссылкой на домены A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2.

Авторы изобретения обнаружили, что в клеточных линиях, отобранных для продуцирования высокая доля белка FVIII по изобретению продуцируется в виде одноцепочечного белка. Считается, что продуцирование FVIII в виде одноцепочечного белка не снижает коагулянтную активность, но может оказаться полезным для очистки. Для упрощения очистки белок FVIII по изобретению может быть одноцепочечным белком или по меньшей мере иметь долю одноцепочечного белка, составляющую по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%. Альтернативно, белок FVIII по изобретению может быть получен в виде гетеродимерного белка FVIII. Предпочтительно белок FVIII по изобретению представляет собой одноцепочечный белок фактора VIII с удаленным В-доменом.

В данной области известны рекомбинантные одноцепочечные белки FVIII, в которых, например, удалены по меньшей мере часть В-домена и 4 аминокислоты соседнего кислого домена a3 (например, остатки 784-1671 полноразмерного FVIII), в частности, удален сайта расщепления фурином (EMA/CHMP/699390/2016 - Аналитический отчет (Assessment report) AFSTYLA). Иллюстративный одноцепочечный белок FVIII представлен в виде SEQ ID NO: 62. Иллюстративный одноцепочечный белок FVIII, основанный на SEQ ID NO: 62, который содержит 19 мутаций, как указано в настоящем описании, например, те же 19 мутаций, включенных в FVIII-19M, не содержит 4 аминокислоты доменов a3 FVIII-19M, т.е. он является на 99,72% (по меньшей мере на 99%) идентичным SEQ ID NO: 63, причем для вычисления идентичности последовательностей учитывают только домены A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2. В

указанном белке может быть удален В-домен, и он может быть слитым белком, например, как описано выше.

Белок может быть дополнительно гликозилирован и/или сульфатирован. Предпочтительно посттрансляционные модификации, такие как гликозилирование и/или сульфатирование белка, происходят в клетке человека.

В одном из вариантов осуществления изобретения белок способен к ассоциации с vWF. Например, эффективность связывания белка FVIII по изобретению с vWF составляет 0-100%, 10-90%, 20-80%, 30-70%, 40-60% или 50-60% относительно vWF-связывающей эффективности ReFacto AF, которую можно определить методом ELISA, например, как раскрыто в настоящем описании. Как показано в настоящем описании, связывающая способность белка FVIII по изобретению, содержащего несколько перечисленных мутаций, может быть снижена по сравнению с ReFacto AF, например, до менее чем 60%.

Белок по изобретению предпочтительно стабилен в плазме человека *in vitro* и *in vivo*, так что его можно использовать в фармацевтике. Авторы изобретения смогли показать, что после инкубации *in vitro* в плазме человека при 37°C в течение 24 часов сохраняется примерно 83% хромогенной коагулянтной активности FVIII-19M. Коагулянтная активность FVIII-6rs в тех же условиях сохраняется на уровне примерно 91%, коагулянтная активность ReFacto AF и Nuwiq - на уровне 97%.

Предпочтительно *in vivo* период полувыведения белка FVIII по изобретению из сыворотки крови человека (у пациента без ингибиторов) составляет примерно по меньшей мере 6 часов, предпочтительно по меньшей мере 12 часов, по меньшей мере 18 часов, по меньшей мере 24 часов или по меньшей мере до 30 часов. Как определено в настоящем описании, белок FVIII может быть белком FVIII без дополнительного партнера по слиянию, или он может быть слитым белком, как определено в настоящем описании. Необязательно указанный период полувыведения получают без партнеров по слиянию. В случае присутствия дополнительных партнеров время полувыведения белка FVIII может быть таким же или даже больше. Комбинация указанных в настоящем описании замен снижает показатель иммуногенности у всех субъектов, имеющих по меньшей мере один из проанализированных аллелей супертипа HLA-DR (DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*0801, DRB1*1101, DRB1*1301, DRB1*1501). Эти подтипы присутствуют более чем у 90% населения (см. Southwood et al., J. Immunol. 1998; 160:3363-3373). Таким образом, FVIII по изобретению может успешно использоваться для лечения всех нуждающихся в этом пациентов, в частности пациентов с одним из аллелей супертипа HLA-DR. В таблице 5 на примере FVIII-19M показано, что иммуногенность снижается по-разному у пациентов с разными аллелями.

Таблица 5 А-С: Индивидуальные показатели измерения Т-клеточного эпитопа (ITEM), указывающие на иммуногенность к FVIII-6rs (А) и FVIII-19M (В) для разных супертипов HLA-DR и абсолютное снижение иммуногенности к FVIII-19M по сравнению с FVIII-6rs для разных супертипов HLA-DR (С). Оценка ITEM основана на количестве и интенсивности совпадений EpiMatrix (описание метода см. ниже) для пары аллелей,

нормализованных по длине белка. Низкий показатель ИТЕМ в таблице 5А или В отражает низкую иммуногенность. Сильное снижение показателя ИТЕМ в таблице 5С, т.е. высокое положительное значение в указанной таблице, отражает высокую пользу от введенных замен.

А: FVIII-6rs

	DRB1* 0101	DRB1* 0301	DRB1* 0401	DRB1* 0701	DRB1* 0801	DRB1* 1101	DRB1* 1301	DRB1* 1501
DRB1*0101	1,26							
DRB1*0301	0,54	-0,18						
DRB1*0401	9,49	8,77	17,73					
DRB1*0701	12,25	11,54	20,49	23,25				
DRB1*0801	8,63	7,91	16,86	19,62	16			
DRB1*1101	0,3	-0,42	8,53	11,29	7,67	-0,66		
DRB1*1301	-0,09	-0,81	8,14	10,9	7,28	-1,05	-1,44	
DRB1*1501	0,71	0	8,95	11,71	8,08	-0,25	-0,64	0,17

В: FVIII-19M

	DRB1* 0101	DRB1* 0301	DRB1* 0401	DRB1* 0701	DRB1* 0801	DRB1* 1101	DRB1* 1301	DRB1* 1501
DRB1*0101	-15,51							
DRB1*0301	-15,64	-15,77						
DRB1*0401	-6,51	-6,64	2,48					
DRB1*0701	-5,64	-5,77	3,35	4,23				
DRB1*0801	-8,86	-8,99	0,14	1,01	-2,21			
DRB1*1101	-19,4	-19,53	-10,41	-9,54	-12,75	-23,3		
DRB1*1301	-15,07	-15,2	-6,07	-5,2	-8,42	-18,96	-14,63	
DRB1*1501	-17,6	-17,73	-8,61	-7,74	-10,96	-21,5	-17,16	-19,7

С: Абсолютное снижение показателя иммуногенности к FVIII-19M по сравнению с FVIII-6rs

	DRB1* 0101	DRB1* 0301	DRB1* 0401	DRB1* 0701	DRB1* 0801	DRB1* 1101	DRB1* 1301	DRB1* 1501
--	---------------	---------------	---------------	---------------	---------------	---------------	---------------	---------------

DRB1*0101	16,77							
DRB1*0301	16,18	15,59						
DRB1*0401	16	15,41	15,25					
DRB1*0701	17,89	17,31	17,14	19,02				
DRB1*0801	17,49	16,9	16,72	18,61	18,21			
DRB1*1101	19,7	19,11	18,94	20,83	20,42	22,64		
DRB1*1301	14,98	14,39	14,21	16,1	15,7	17,91	13,19	
DRB1*1501	18,31	17,73	17,56	19,45	19,04	21,25	16,52	19,87

Для всех проанализированных аллелей наблюдается снижение показателя иммуногенности, в частности снижение показателя иммуногенности составляет более 13. Особенно высокое снижение показателя иммуногенности, более 17, демонстрирует, что лечение фармацевтической композицией по изобретению может в частности оказаться эффективным для пациентов, несущих одну из следующих комбинаций типов HLA:

- DRB1*0701 в комбинации с DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*0801, DRB1*1101 или DRB1*1501;
- DRB1*0801 в комбинации с DRB1*0101, DRB1*0701, DRB1*0801, DRB1*1101 или DRB1*1501;
- DRB1*1101 в комбинации с DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*0801, DRB1*1101, DRB1*1301 или DRB1*1501;
- DRB1*1301 в сочетании с DRB1*1101;
- DRB1*1501 в комбинации с DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*0801, DRB1*1101, DRB1*1501

Еще более сильное уменьшение показателя иммуногенности, более чем на 20, указывает на то, что лечение фармацевтической композицией по изобретению может быть даже более эффективным для пациентов, имеющих одну из следующих комбинаций типов HLA: DRB1*1101 в комбинации с DRB1*0701, DRB1*0801, DRB1*1101 или DRB1*1501. Предпочтительным является лечение пациентов с особенно сильным уменьшением показателя иммуногенности.

Изобретение относится к способу получения белка FVIII по изобретению *in vitro*, включающему культивирование клетки-хозяина по изобретению, экспрессирующей указанный белок FVIII, в подходящих условиях и выделение указанного белка FVIII, при этом белок необязательно представлен в виде фармацевтической композиции. Как раскрыто в настоящем описании, клетка-хозяин предпочтительно представляет собой человеческую клетку.

Настоящее изобретение также относится к анализу для определения иммуногенности белка, например белка FVIII по изобретению, включающему совместное культивирование дендритных клеток, инкубированных с указанным белком, с CD4⁺ Т-клетками донора (например, здорового человека или пациента, например, с гемофилией А), обедненными регуляторными Т-клетками, и тестирование активации указанных Т-

клеток. Для такого анализа моноциты могут быть очищены, например, от PBMC, дифференцированы в незрелые DC (iDC) (например, в присутствии IL-4 и GM-CSF) и, наконец, стимулированы для превращения в зрелые DC (mDC) (например, с использованием LPS или смеси цитокинов, таких как IL-1β, IL-6 и TNF-α), и в то же время инкубированы с антигеном, т.е. представляющим интерес белком. CD4⁺CD25⁺-Т-клетки очищают от PBMC того же донора, предпочтительно, из той же партии PBMC, метят CFSE (сукцинимидиловым эфиром карбоксифлуоресцеиндиацетата) для последующего обнаружения пролиферации, и культивируют перед совместным культивированием, например, для обеспечения времени для восстановления клеток и удаления не прочно связанного CFSE. После совместного культивирования с DC, которое предпочтительно происходит при соотношении DC:Т-клетки, составляющем по меньшей мере 1:10, например, в течение периода от примерно 12 ч до примерно 2 недель, от 1 дня до 9 дней или от 2 дней до 7 дней, Т-клетки анализируют на активацию и/или пролиферацию методом проточной цитометрии. Альтернативно или дополнительно супернатант можно анализировать на цитокины. Предпочтительные условия анализа описаны в приведенных ниже примерах. Преимущество этого анализа состоит в том, что он позволяет оценивать как первичные, так и вторичные Т-клеточно-опосредованные иммунные ответы в отсутствие регуляторных CD25⁺ Т-клеток, что облегчает обнаружение иммунных ответов. Ожидается, что результаты будут коррелировать с иммуногенностью белка *in vivo*.

Для деиммунизированного белка FVIII, FVIII-19M, анализ подтвердил, что у большинства проанализированных субъектов наблюдалось снижение пролиферации Т-клеток в ответ на FVIII-19M. Можно сделать вывод, что низкий показатель иммуногенности коррелирует с низкой иммуногенностью белка в анализе *in vitro*, т.е. замены в эпитопах, идентифицированных *in silico*, приводят к снижению иммуногенности.

Нуклеиновые кислоты и клетки-хозяева

Изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей рекомбинантный белок фактора VIII по изобретению. Указанная нуклеиновая кислота может быть вектором экспрессии, например, подходящим для экспрессии указанного рекомбинантного белка фактора VIII в клетке млекопитающего, такой как человеческая клетка, такая как клетка CAP.

Нуклеиновая кислота предпочтительно кодирует FVIII с N-концевой сигнальной последовательностью, например, сигнальной последовательностью из 19 аминокислот SEQ ID NO: 1. Предпочтительные нуклеиновые кислоты по изобретению кодируют рекомбинантный белок FVIII с SEQ ID NO: 47 (ADLCLD_SC), SEQ ID NO: 48 (AD2CD2_SC), SEQ ID NO: 49 (AD2CD2woL_SC), SEQ ID NO: 50 (AD2CD2woLG_SC) или SEQ ID NO: 51 (AbD2CD2_SC). Они могут представлять собой SEQ ID NO: 52-56. Нуклеиновые кислоты по изобретению, кодирующие деиммунизированный белок FVIII, могут иметь, например, любую из SEQ ID NO: 121-126. Нуклеиновые кислоты по изобретению могут представлять собой молекулы ДНК или молекулы РНК. Нуклеиновые

кислоты могут быть оптимизированы для экспрессии в соответствующей клетке-хозяине, например, в человеческой клетке, например клетке CAP.

Вектор экспрессии содержит последовательность, кодирующую белок FVIII, предпочтительно в кодон-оптимизированной форме, под функциональным контролем подходящего промотора, который может быть конститутивным или индуцибельным промотором. Промотор может быть промотором, не связанным с экспрессией FVIII в природе, например EF-1альфа, или гетерологичным промотором, например, CMV или SV40. Кроме того, он может содержать про- и/или эукариотические селективные маркеры, такие как устойчивость к ампициллину и дигидрофолатредуктаза (dhfr), и точки начала репликации, например точку начала SV40 и/или точку начала pBR322. «Кодон-оптимизированный» означает оптимизированный для экспрессии в клетке-хозяине, предпочтительно для экспрессии в человеческой клетке-хозяине.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота может представлять собой вектор, подходящий для генной терапии, например для генной терапии пациента-человека. Векторы, подходящие для генной терапии, известны в данной области техники, например векторы на основе вируса, например на основе аденовируса или аденоассоциированного вируса (AAV) или на основе ретровируса, такие как лентивирусные векторы и т.д., или векторы, не основанные на вирусах, такие как, без ограничения, малые плазмиды и миникольца или векторы на основе транспозонов. Вектор на основе AAV по изобретению может быть, например, упакован в частицы AAV для генной терапии пациентов с гемофилией А.

Изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту по изобретению. Клетка-хозяин может быть бактериальной клеткой, растительной клеткой, грибковой клеткой, дрожжевой клеткой или животной клеткой. Предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку животного, в частности клетку млекопитающего, содержащую вектор экспрессии, подходящий для экспрессии указанного рекомбинантного белка фактора VIII в указанной клетке. Клетка-хозяин предпочтительно представляет собой человеческую клетку, содержащую вектор экспрессии, подходящий для экспрессии указанного рекомбинантного белка фактора VIII в указанной человеческой клетке. Клетка может быть временно или стабильно трансфицирована нуклеиновой кислотой по изобретению. Клетка может быть клеточной линией, первичной клеткой или стволовой клеткой. Для продуцирования белка клетка обычно представляет собой клеточную линию, такую как клетка НЕК, например клетка НЕК-293, клетка CHO, клетка ВНК, эмбриональная клетка сетчатки человека, например Per.C6 Clusell, или человеческая клетка-амниоцит, такая как CAP. Для лечения пациентов-людей белком клетка-хозяин предпочтительно представляет собой человеческую клетку, например клеточную линию НЕК293 или клеточную линию CAP (например, CAP-Т-клетку или CAP-Go-клетку). Авторы изобретения обнаружили, что в клеточной линии CAP продуцируется особенно высокое содержание одноцепочечного белка FVIII по изобретению. Среди клеток CAP предпочтительными являются клетки CAP-Т,

используемые для кратковременной экспрессии, в то время как клетки CAP-Go могут использоваться для создания стабильных клеточных линий, обеспечивающих молекуле FVIII благоприятный профиль гликозилирования.

Клетка может быть аутологичной клеткой пациента с гемофилией А, в частности, человека с гемофилией А, подходящей для продуцирования FVIII этого пациента после трансфекции и повторного введения в организм пациента. Клетка может быть стволовой клеткой, например гемопоэтической стволовой клеткой, но предпочтительно она не является эмбриональной стволовой клеткой, в частности, когда пациентом является человек. Клеткой также может быть гепатоцит, синусоидальная эндотелиальная клетка печени или тромбоцит.

Линии клеток, экспрессирующие белок по изобретению, также можно использовать в способе получения белка по изобретению, включающем культивирование указанных клеток в условиях, подходящих для экспрессии белка FVIII, и очистку указанного белка, например, с помощью множества способов, известных специалисту в данной области техники, как раскрыто в настоящем описании. Такие способы очистки могут включать стандартные процедуры сбора для удаления клеток, например центрифугирование, с последующими стадиями хроматографии, например аффинной хроматографии, и способы переноса белков FVIII в подходящий буфер. Таким образом, изобретение также относится к способу получения белка фактора VIII, включающему культивирование клетки-хозяина по изобретению в условиях, подходящих для экспрессии белка фактора VIII, и выделение белка фактора VIII, при этом способ необязательно включает приготовление белка фактора VIII в виде фармацевтической композиции.

Фармацевтические композиции

Изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный белок фактора VIII по настоящему изобретению, нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению или клетку-хозяин по настоящему изобретению. Такие фармацевтические композиции могут содержать подходящие вспомогательные вещества или носители, например буфер, стабилизирующий агент, наполнитель, консервант, другой (например, рекомбинантный) белок или их комбинации. В контексте изобретения, если в явном виде не указано иное, единственное число означает один или более.

Подходящий буфер для приготовления состава, содержащего белок по изобретению, может, например, содержать 205 мМ NaCl, 5,3 мМ CaCl₂, 6,7 мМ L-гистидина, 1,3% сахарозы и 0,013% Твин 20 в дистиллированной воде, pH 7,0 (буфер для состава FVIII). Указанный буфер используют в раскрытых в настоящем описании экспериментах, если не указано иное. Составы FVIII могут быть стерильными, например, стерильно отфильтрованными, в частности, для использования *in vivo*.

Необязательно, фармацевтическая композиция по изобретению, содержащая белок FVIII, дополнительно содержит альбумин, предпочтительно, человеческий сывороточный альбумин для человека-пациента. Альбумин может, например, находиться в концентрации 0,1-10% масс./масс., например 1-5% человеческий сывороточный альбумин (масс./масс.).

Альбумин может связываться с ABD белков FVIII по изобретению либо до введения, либо после введения человеку.

Фармацевтическая композиция может быть составлена по желанию специалиста в данной области техники, например, для внутривенного (в/в) или подкожного введения, внутривенного или внутримышечного применения. Как правило, она предназначена для введения в виде медленной внутривенной болюсной инъекции. Непрерывная инфузия показана, например, пациентам, нуждающимся в госпитализации по причине сильных кровотечений или хирургических процедур. Также возможно пероральное применение, которое может способствовать индукции толерантности, например, после экспрессии в растениях. Фармацевтическая композиция может быть предназначена для медленного высвобождения.

Фармацевтические композиции, содержащие FVIII, могут быть лиофилизированы.

Благодаря увеличению времени полувыведения *in vivo* фармацевтические композиции по изобретению можно вводить с более длительными интервалами, чем предыдущие композиции FVIII. Например, они могут применяться для введения каждые 5-14 дней, предпочтительно каждые 7-10 дней.

Дозы и схемы лечения могут быть выбраны в зависимости от ситуации, например, для профилактики кровотечений или интермиттирующей (прерывистой) терапии по требованию при эпизодах кровотечения. Решение о дозировке может быть принято врачом. Дозировка зависит от пациента, например, массы тела, статуса FVIII, тяжести заболевания и т.д. Например, FVIII по изобретению можно вводить в дозах от 0,5 до 250 МЕ/кг массы тела каждые 0,5-14 или каждые 6-7 дней внутривенно в зависимости от тяжести заболевания, как правило, от 0,5 до 200 МЕ/кг массы тела.

Изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей белок FVIII по изобретению в комбинации с иммунодепрессантом (например, метилпреднизолоном, преднизолоном, дексаметазоном, циклофосфамидом, ритуксимабом и/или циклоспорином), и/или она может быть предназначена для введения практически одновременно (например, в пределах от пяти минут до 12 часов) с таким агентом. Таким образом, изобретение также относится к набору, содержащему дополнительно к белку FVIII по изобретению, необязательно в комбинации с альбумином, иммунодепрессант, например, иммунодепрессант, выбранный из группы, содержащей метилпреднизолон, преднизолон, дексаметазон, циклофосфамид, ритуксимаб и/или циклоспорин.

Фармацевтическая композиция, например, содержащая белок по изобретению, может быть использована для лечения нуждающегося в этом пациента, в частности, пациента с гемофилией А, например пациента с приобретенной гемофилией, включая с аутоиммунным ответом на FVIII, или пациента с врожденной гемофилией А. Фармацевтической композицией по изобретению можно лечить млекопитающих, таких как мыши или собаки, но пациентом обычно является человек.

Применение фармацевтической композиции по настоящему изобретению, содержащей представленный в настоящем описании деиммунизированный белок FVIII

или кодирующую его нуклеиновую кислоту, особенно выгодно в условиях, когда желательна сниженная иммуногенность, например, при лечении пациента с гемофилией А, ранее не получавшего лечение каким-либо рекомбинантным или плазматическим белком фактора VIII. В соответствии с изобретением частота и/или интенсивность образования у пациента антител, включая ингибирующие антитела, таким образом, снижается по сравнению с лечением обычным FVIII или, предпочтительно, образование антител предотвращается, включая ингибирующие антитела. Фармацевтическую композицию по изобретению также можно использовать для лечения пациента, ранее уже получавшего лечение рекомбинантным и/или плазматическим белком фактора VIII. Что касается пациента с антителами, включая образование ингибирующих антител на рекомбинантный и/или плазматический белок фактора VIII, фармацевтические композиции могут применяться, например, при терапии индукции иммунной толерантности (ИТИ), так как желательно использовать белок FVIII с низкой иммуногенностью или даже толерогенными характеристиками (Carcao et al., Recombinant factor VIII Fc fusion protein for immune tolerance induction in patients with severe haemophilia A with inhibitors - A retrospective analysis. Haemophilia 2018;1-8). Таким образом, композиции по изобретению также можно использовать для индукции ИТИ. Фармацевтические композиции также могут быть полезными для пациента, у которого развился гуморальный ответ, включая образование ингибирующих антител на рекомбинантный и/или плазматический белок фактора VIII, например, который получил ИТИ терапию. Фармацевтические композиции также могут быть полезными для пациента, у которого наблюдался гуморальный ответ, включая образование ингибирующих антител на рекомбинантный и/или плазматический белок фактора VIII, который не получал ИТИ терапию.

Изобретение также относится к флакону, содержащему фармацевтическую композицию по изобретению, например шприцу. Шприц может представлять собой предварительно заполненный шприц, например готовый к использованию шприц.

Авторы изобретения предполагают, что в контексте генной терапии благодаря наличию альбумин-связывающих доменов долгосрочная экспрессия и фолдинг белка FVIII по изобретению могут быть улучшены по сравнению с экспрессией обычного FVIII.

Все публикации, цитируемые в настоящем описании, полностью включены в него. Изобретение дополнительно проиллюстрировано приведенными ниже вариантами осуществления, чертежами и примерами, которые не следует понимать как ограничивающие объем изобретения.

Варианты осуществления

Таким образом, в первом варианте осуществления изобретение относится к рекомбинантному белку фактора VIII, содержащему часть тяжелой цепи и часть легкой цепи фактора VIII и по меньшей мере два альбумин-связывающих домена, где по меньшей мере один альбумин-связывающий домен является С-терминальным по отношению к части тяжелой цепи и по меньшей мере один альбумин-связывающий домен является С-

терминальным по отношению к части легкой цепи, причем если белок является одноцепочечным белком, альбумин-связывающий(ие) домен(ы), С-терминальный(ые) по отношению к части тяжелой цепи, является/являются N-терминальным(и) по отношению к части легкой цепи.

Во втором варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по первому варианту осуществления (варианту осуществления 1) представляет собой одноцепочечный белок.

В третьем варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по варианту осуществления 1 представляет собой двухцепочечный белок.

В четвертом варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-3 один альбумин-связывающий домен является С-терминальным по отношению к части тяжелой цепи, и один альбумин-связывающий домен является С-терминальным по отношению к части легкой цепи.

В пятом варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-3 один альбумин-связывающий домен является С-терминальным по отношению к части тяжелой цепи, и два альбумин-связывающих домена являются С-терминальными по отношению к части легкой цепи. В шестом варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-3 один альбумин-связывающий домен является С-терминальным по отношению к части тяжелой цепи, и три альбумин-связывающих домена являются С-терминальными по отношению к части легкой цепи. В седьмом варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-3 один альбумин-связывающий домен является С-терминальным по отношению к части тяжелой цепи, и четыре альбумин-связывающих домена являются С-терминальными по отношению к части легкой цепи.

В восьмом варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-3 два альбумин-связывающих домена являются С-терминальными по отношению к части тяжелой цепи, и один альбумин-связывающий домен является С-терминальным по отношению к части легкой цепи. В девятом варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-3 три альбумин-связывающих домена являются С-терминальными по отношению к части тяжелой цепи, и один альбумин-связывающий домен является С-терминальным по отношению к части легкой цепи. В десятом варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-3 четыре альбумин-связывающих домена являются С-терминальными по отношению к части тяжелой цепи, и один альбумин-связывающий домен является С-терминальным по отношению к части легкой цепи.

В одиннадцатом варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-3 по меньшей мере два альбумин-связывающих домена являются С-терминальными по отношению к части тяжелой цепи, и по меньшей

мере два альбумин-связывающих домена являются С-терминальными по отношению к части легкой цепи, предпочтительно два альбумин-связывающих домена являются С-терминальными по отношению к части тяжелой цепи, и два альбумин-связывающих домена являются С-терминальными по отношению к части легкой цепи. В двенадцатом варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по варианту осуществления 11 два альбумин-связывающих домена являются С-терминальными по отношению к части тяжелой цепи, и три альбумин-связывающих домена являются С-терминальными по отношению к части легкой цепи. В тринадцатом варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по варианту осуществления 11 два альбумин-связывающих домена являются С-терминальными по отношению к части тяжелой цепи, и четыре альбумин-связывающих домена являются С-терминальными по отношению к части легкой цепи. В четырнадцатом варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по варианту осуществления 11 три альбумин-связывающих домена являются С-терминальными по отношению к части тяжелой цепи, и два альбумин-связывающих домена являются С-терминальными по отношению к части легкой цепи. В пятнадцатом варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по варианту осуществления 11 четыре альбумин-связывающих домена являются С-терминальными по отношению к части тяжелой цепи, и два альбумин-связывающих домена являются С-терминальными по отношению к части легкой цепи.

В шестнадцатом варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-15 альбумин-связывающие домены отделены от части тяжелой цепи, и/или части легкой цепи, и/или других альбумин-связывающих доменов линкером, причем предпочтительно, альбумин-связывающие домены отделены от части тяжелой цепи и части легкой цепи и других альбумин-связывающих доменов линкером.

В семнадцатом варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по варианту осуществления 16 линкер содержит расщепляемый тромбином линкерный участок, который необязательно имеет последовательность SEQ ID NO: 39.

В восемнадцатом варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по любому из вариантов осуществления 16 или 17 линкер содержит глицин-сериновый линкерный участок, который необязательно имеет последовательность SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 41.

В девятнадцатом варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по любому из вариантов осуществления 16-18 указанный линкер представляет собой комбинацию различных линкерных участков, например линкер содержит расщепляемый тромбином линкерный участок, фланкированный с каждой стороны глицин-сериновым линкерным участком, где указанный линкер необязательно имеет последовательность SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 43.

В двадцатом варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-19 альбумин-связывающий домен содержит

последовательность согласно SEQ ID NO: 44.

В двадцать первом варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по варианту осуществления 20 альбумин-связывающий домен содержит последовательность согласно SEQ ID NO: 46.

В двадцать втором варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-21 часть тяжелой цепи содержит домены A1 и A2 и необязательно содержит домены A1-a1-A2-a2 или A1-a1-A2-a2-B.

В двадцать третьем варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-22 часть легкой цепи содержит домены A3, C1 и C2 и необязательно содержит домены a3-A3-C1-C2.

В двадцать четвертом варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-23 B-домен белка фактора VIII удален по меньшей мере частично.

В двадцать пятом варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-24 содержит в одной цепи часть тяжелой цепи, содержащую домены A1 и A2, и часть легкой цепи, содержащую домены A3, C1 и C2 фактора VIII, где

a) в указанном рекомбинантном белке фактора VIII удалены 894 аминокислоты, соответствующие аминокислотам, последовательно расположенным от F761 до P1659 фактора VIII дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1, что приводит к первой делеции;

b) указанный рекомбинантный белок фактора VIII содержит перекрывающую участок первой делеции последовательность процессинга, содержащую SEQ ID NO: 2, или последовательность, содержащую не более одной аминокислотной замены в SEQ ID NO: 2, где указанная последовательность процессинга содержит первый сайт расщепления тромбином;

c) в указанном рекомбинантном белке фактора VIII удалены по меньшей мере аминокислоты, соответствующие аминокислотам с R1664 по R1667 фактора VIII дикого типа, что приводит ко второй делеции; и

d) указанный рекомбинантный белок фактора VIII содержит второй сайт расщепления тромбином, C-терминальный по отношению ко второй делеции и N-терминальный по отношению к домену A3.

В двадцать шестом варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-25, который необязательно представляет собой одноцепочечный белок, содержит часть тяжелой цепи с последовательностью, на по меньшей мере 90% идентичной aa20-aa768 SEQ ID NO: 16, и часть легкой цепи с последовательностью, на по меньшей мере 90% идентичной aa769-aa1445 SEQ ID NO: 16, где указанная идентичность последовательности предпочтительно составляет по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или 100%.

В двадцать седьмом варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII

по любому из вариантов осуществления 1-26, который необязательно представляет собой одноцепочечный белок, содержит часть тяжелой цепи с последовательностью, на по меньшей мере 90% идентичной aa20-aa1667 SEQ ID NO: 1, и часть легкой цепи с последовательностью, на по меньшей мере 90% идентичной aa1668-aa2351 SEQ ID NO: 1, где указанная идентичность последовательности необязательно составляет по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или 100%. В двадцать восьмом варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-4 и 16-27, содержит один альбумин-связывающий домен между частью тяжелой цепи и частью легкой цепи и один альбумин-связывающий домен, С-терминальный по отношению к части легкой цепи,

причем последовательность является на по меньшей мере 70% идентичной последовательности SEQ ID NO: 47.

В двадцать девятом варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 11-28 представляет собой одноцепочечный белок, содержащий по меньшей мере два альбумин-связывающих домена между частью тяжелой цепи и частью легкой цепи и по меньшей мере два альбумин-связывающих домена, С-терминальных по отношению к части легкой цепи, где белок является на по меньшей мере 80%, необязательно на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 98% идентичным последовательности любой из SEQ ID NO: 48, 49 или 51. В тридцатом варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по варианту осуществления 29 является на по меньшей мере 80% идентичным последовательности SEQ ID NO: 48, например, он имеет SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 51.

В тридцать первом варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-30 имеет «b-мутацию», т.е. мутацию аминокислоты, соответствующую Y1699, на F в положении 1699, и мутацию аминокислоты, соответствующую Y1683, на F, в положении 1683 в белке фактора VIII дикого типа с SEQ ID NO: 1.

В тридцать втором варианте осуществления период полувыведения *in vivo* рекомбинантного белка фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-31 у человека удлинен по меньшей мере в 1,2 раза, предпочтительно по меньшей мере в 1,5 раза, необязательно, по меньшей мере в 2 или по меньшей мере в 2,5 раза по сравнению с рекомбинантным белком фактора VIII SEQ ID NO: 28.

В тридцать третьем варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-32 представляет собой белок, слитый по меньшей мере с одним партнером по слиянию, выбранным из группы, состоящей из Fc-участка, альбумина, полипептидов PAS, полипептидов HAP, С-терминального пептида бета-субъединицы хорионического гонадотропина, полиэтиленгликоля и гидроксипропилкрахмала.

В тридцать четвертом варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-33 представляет собой

деиммунизированный белок.

Изобретение относится в качестве тридцать пятого варианта осуществления к рекомбинантному белку фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-34, содержащему по меньшей мере три аминокислотные замены в положениях, выбранных из группы, состоящей из Y748, L171, S507, N79, I80, I105, S112, L160, V184, N233, L235, V257, I265, N299, Y426, Y430, L505, F555, I610, N616, I632, L706, N754, K1837, R1936, S2030, S2037, N2038, S2077, M2123, S2125, F2215, K2226, K2258, V2313, S2315, V2333 и Q2335;

где замены N независимо выбирают из группы, состоящей из D, H, S и E; где замены I независимо выбирают из группы, состоящей из T и V; где замены S независимо выбирают из группы, состоящей из A, N, G, T и E; где замены L независимо выбирают из группы, состоящей из N, Q, F и S; где замены V независимо выбирают из группы, состоящей из A и T; где замены Y независимо выбирают из группы, состоящей из N, H и S; где замены F независимо выбирают из группы, состоящей из H и S; где замены K независимо выбирают из группы, состоящей из N, D, E, Q, S и T; где замены R независимо выбирают из группы, состоящей из Q, H и S; где замены M выбирают из группы, состоящей из R, Q, K и T; и/или где замены Q выбирают из группы, состоящей из R, D, E, H и K;

причем положения указаны относительно полноразмерной молекулы человеческого фактора VIII SEQ ID NO: 1;

и причем рекомбинантный белок фактора VIII сохраняет по меньшей мере 50% коагулянтной активности, определенной с помощью хромогенного анализа, по сравнению с белком фактора VIII, состоящим из SEQ ID NO: 60. Рекомбинантный белок фактора VIII может представлять собой слитый белок. В тридцать седьмом варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII согласно варианту осуществления 35 содержит по меньшей мере три аминокислотные замены в положениях, выбранных из группы, состоящей из Y748, L171, S507, N79, I80, I105, S112, L160, V184, N233, L235, V257, I265, N299, Y426, Y430, L505, F555, I610, N616, L706, N754, K1837, R1936, S2030, S2037, N2038, S2077, M2123, F2215, K2226, K2258, V2313, S2315, V2333 и Q2335.

В тридцать седьмом варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-36 содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену в положении, выбранном из группы, состоящей из Y748, L171, S507, N79, I80, I105, S112, L160, V184, N233, L235, V257, I265, N299, Y426, Y430, L505, F555, I610, N616, I632, L706, N754, K1837, R1936, S2030, S2037, N2038, S2077, M2123, F2125, K2226, K2258, V2313, C2315, B2333 и Q2335;

где замены N независимо выбирают из группы, состоящей из D, H, S и E; где замены I независимо выбирают из группы, состоящей из T и V; где замены S независимо выбирают из группы, состоящей из A, N, G, T и E; где замены L независимо выбирают из группы, состоящей из N, Q, F и S; где замены V независимо выбирают из группы, состоящей из A и T; где замены Y независимо выбирают из группы, состоящей из N, H и

S; где замены F независимо выбирают из группы, состоящей из H и S; где замены K независимо выбирают из группы, состоящей из N, D, E, Q, S и T; где замены R независимо выбирают из группы, состоящей из Q, H и S; где замены M выбирают из группы, состоящей из R, Q, K и T; и/или где замены Q выбирают из группы, состоящей из R, D, E, H и K;

причем, если мутация находится в положении S507, она представляет собой S507E, если мутация находится в положении N616, она представляет собой N616E, и если мутация находится в положении F2215, она представляет собой F2215H;

где положения указаны относительно полноразмерной молекулы человеческого фактора VIII SEQ ID NO: 1,

и причем рекомбинантный белок фактора VIII сохраняет по меньшей мере 50% коагулянтной активности, определенной с помощью хромогенного анализа, по сравнению с белком фактора VIII, состоящим из SEQ ID NO: 60. Белок может представлять собой слитый белок.

В тридцать восьмом варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII в соответствии с любым из вариантов осуществления 35-37 может, например, содержать аминокислотные замены, выбранные из группы, состоящей из Y748S, L171Q, S507E, N79S, I80T, I105V, S112T, L160S, V184A, N233D, L235F, V257A, I265T, N299D, Y426H, Y430H, L505N, F555H, I610T, N616E, I632T, L706N, N754D, K1837E, R1936Q, S2030A, S2037G, N2038D, S2077G, M2123K, S2125G, F2215H, K2226Q, K2258Q, V2313A, S2315T, V2333A и Q2335H.

В тридцать девятом варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 35-38 может, например, содержать от 3 до 25 указанных замен, причем замены могут быть расположены в разных иммуногенных кластерах.

В сороковом варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 35-39 может, например, содержать не менее трех аминокислотных замен в положениях, выбранных из группы, состоящей из Y748, L171, S507, N79, S112, L160, V184, N233, I265, N299, Y426, F555, N616, I632, L706, K1837, R1936, N2038, S2077, S2125, F2215, K2226, K2258, S2315 и V2333;

где по меньшей мере три аминокислотные замены предпочтительно выбирают из группы, состоящей из Y748S, L171Q, S507E, N79S, S112T, L160S, V184A, N233D, I265T, N299D, Y426H, F555H, N616E, I632T, L706N, K1837E, R1936Q, N2038D, S2077G, S2125G, F2215H, K2226Q, K2258Q, S2315T и V2333A.

В сорок первом варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 35-40 может, например, содержать аминокислотные замены по меньшей мере в положениях:

- a. N79S, S112T, N233D, and I265T; и/или
- b. N79S, S112T, L160S, L171Q, V184A, N233D, and I265T; и/или
- c. N299D, Y426H и S507E; и/или

- d. F555H, N616E, L706N, Y748S; и/или
- e. F555H, N616E, I632T, L706N и Y748S; и/или
- f. S2077G, S2315T и V2333A; и/или
- g. N2038D, S2077G, S2315T и V2333A; и/или
- h. S2077G, K2258Q, S2315T и V2333A; и/или
- i. N2038D, S2077G, K2258Q, S2315T и V2333A; и/или
- j. N2038D, S2077G, S2125G, K2258Q, S2315T и V2333A; и/или
- k. L171Q, S507E, Y748S и V2333A; и/или
- l. L171Q, N299D, N616E и V2333A; и/или
- m. S112T, S507E, Y748S, K1837E и N2038D; и/или
- n. S112T, Y426H, N754D, K1837E и N2038D,

предпочтительно в виде комбинации по меньшей мере замен, указанных в b и c, необязательно дополнительно включая замены, выбранные из замен, указанных в d или e и/или f, g, h, i или j, и/или K1837E.

В сорок втором варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 35-41 может, например, содержать по меньшей мере аминокислотные замены в положениях N79, S112, L160, L171, V184, N233, I265, N299, Y426, S507, F555, N616, L706 и Y748, где предпочтительными заменами являются N79S, S112T, L160S, L171Q, V184A, N233D, I265T, N299D, Y426H, S507E, F555H, N616E, L706N и Y748S. В сорок третьем варианте осуществления белок по варианту осуществления 42 дополнительно включает K1837E. Необязательно белок содержит аминокислотную последовательность в соответствии с aa 20-1533 SEQ ID NO: 119.

В сорок четвертом варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 35-42 может, например, содержать по меньшей мере аминокислотные замены в положениях N79, S112, L160, L171, V184, N233, I265, N299, Y426, S507, F555, N616, L706, Y748, N2038, S2077, S2315 и V2333, где предпочтительно 18 замен представляют собой N79S, S112T, L160S, L171Q, V184A, N233D, I265T, N299D, Y426H, S507E, F555H, N616E, L706N, Y748S, N2038D, S2077G, S2315T и V2333A. В сорок пятом варианте осуществления белок по варианту осуществления 44 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, предпочтительно 95% идентичную aa 20-1533 SEQ ID NO: 114.

В 46-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 35-38 содержит по меньшей мере одно, предпочтительно, все L160, F555 и S2315, т.е. он не содержит мутаций в этих положениях. В 47-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 35-38 и 46 может, например, содержать по меньшей мере аминокислотные замены в положениях N79, S112, L171, V184, N233, I265, N299, Y426, S507, N616, L706 и Y748, где предпочтительными заменами являются N79S, S112T, L171Q, V184A, N233D, I265T, N299D, Y426H, S507E, N616E, L706N и Y748S. В 48-м варианте осуществления белок по варианту осуществления 47 дополнительно включает K1837E.

В 49-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 35-38 или 46-48 может, например, содержать по меньшей мере аминокислотные замены в положениях N79, S112, L171, V184, N233, I265, N299, Y426, S507, N616, L706, Y748, N2038, S2077 и V2333, где предпочтительно 15 замен представляют собой N79S, S112T, L171Q, V184A, N233D, I265T, N299D, Y426H, S507E, N616E, L706N, Y748S, N2038D, S2077G и V2333A. В 50-м варианте осуществления белок по варианту осуществления 49 содержит аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 90%, предпочтительно 95% идентичную aa 20-1533 SEQ ID NO: 134 (FVIII-16M_SC). В 51-м варианте осуществления белок по варианту осуществления 49 содержит аминокислотную последовательность, имеющую SEQ ID NO: 114, за исключением положений L160, F555 и S2315 (AD2CD2-19M_SC-16M).

В 52-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 35-51 может, например, содержать по меньшей мере аминокислотную замену в положении K1837, где предпочтительно указанная замена представляет собой K1837E. В 53-м варианте осуществления белок по варианту осуществления 52 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с aa 20-1533 SEQ ID NO: 114.

В 54-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 35-52 может, например, обладать пониженной иммуногенностью по сравнению с белком фактора VIII, состоящим из SEQ ID NO: 60, и предпочтительно также по сравнению с белком фактора VIII, состоящим из SEQ ID NO: 61.

В 55-м варианте осуществления в рекомбинантном белке фактора VIII по варианту осуществления 54 указанную иммуногенность определяют по показателю иммуногенности или с помощью анализа, включающего совместное культивирование дендритных клеток, инкубированных с указанным белком, с CD4⁺ Т-клетками донора, обедненными регуляторными Т-клетками, и тестирование активации указанных Т-клеток, предпочтительно, с помощью указанного анализа.

В 56-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 35-55 может, например, быть на по меньшей мере 90% идентичным по последовательности белку фактора VIII SEQ ID NO: 63, где для определения идентичности последовательности рассматривают только домены A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2. Он также может представлять собой слитый белок указанного рекомбинантного белка фактора VIII.

В 57-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-56 может, например, быть одноцепочечным белком фактора VIII. В 58-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-57 может, например, быть гетеродимерным белком фактора VIII.

В 59-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из

вариантов осуществления 1-57 может, например, быть одноцепочечным белком фактора VIII с удаленным В-доменом. В 60-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по варианту осуществления 59 содержит последовательность процессинга SEQ ID NO: 2.

В 61-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по варианту осуществления 59 содержит последовательность процессинга SEQ ID NO: 5, где X предпочтительно представляет собой А или S. В 62-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по варианту осуществления 61 содержит последовательность процессинга SEQ ID NO: 5, где X представляет собой А. В 63-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по варианту осуществления 61 содержит последовательность процессинга SEQ ID NO: 5, где X представляет собой S. В 64-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по варианту осуществления 59 содержит последовательность процессинга SEQ ID NO: 132. В 65-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по варианту осуществления 59 содержит последовательность процессинга SEQ ID NO: 2 и дополнительно содержит последовательность SEQ ID NO: 131, перекрывающуюся с указанной последовательностью процессинга. Варианты осуществления с 61 по 65 позволяют избежать образования потенциальных Т-клеточных эпитопов, которые могут быть введены последовательностью процессинга SEQ ID NO: 2.

В 66-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-65 может, например, представлять собой слитый белок, где партнер по слиянию выбирают из группы, содержащей Fc-участок, альбумин, полипептиды PAS, полипептиды HAP, С-концевой пептид бета-субъединицы хорионического гонадотропина, альбумин-связывающие малые молекулы, полиэтиленгликоль, гидроксипропилкрахмал и их комбинации.

Рекомбинантный белок фактора VIII также может быть деиммунизирован на участках стыка, образованных путем слияния последовательностей FVIII, линкера и ABD. Таким образом, в 67-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-66 может содержать один или более, предпочтительно все замены F761G, F779G, F1632G, F858G, F1711G и F936G. В 68-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-67 может содержать одну или более, предпочтительно все замены P766Q и N772D. В 69-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-66 или 68 может содержать одну или более, предпочтительно все замены R784Q, S787G, R1637Q, S1640G, R836Q, S866G, R1716Q, S1719G, R941Q и S944G. В 70-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-69 может содержать замену S926G. В 71-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-70 может содержать замену N1625D. В 72-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-70 может

содержать замену N1625Y. В 73-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-67 может содержать все замены F761G, F779G, F1632G, F858G, F1711G, S926G и F936G. В 74-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-67 или 73 может содержать все замены F761G, F779G, F1632G, F858G, F1711G, S926G, F936G и N1625D. В 75-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-66 или 68-69 может содержать все замены P766Q, N772D, R784Q, S787G, R1637Q, S1640G, R863Q, S866G, R1716Q, S1719G, R941Q и S944G. В 76-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-66 68-69 или 75 может содержать все замены P766Q, N772D, R784Q, S787G, R1637Q, S1640G, R863Q, S866G, R1716Q, S1719G, S926G, R941Q и S944G. В 77-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-66 или 68-69, или 75-76 может содержать по меньшей мере одну, предпочтительно все замены P766Q, N772D, R784Q, S787G, R1637Q, S1640G, R863Q, S866G, R1716Q, S1719G, S926G, R941Q, S944G и N1625D. В 78-м варианте осуществления рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-66 или 68-69, или 75-76 может содержать по меньшей мере одну, предпочтительно все замены P766Q, N772D, R784Q, S787G, R1637Q, S1640G, R863Q, S866G, R1716Q, S1719G, S926G, R941Q, S944G и N1625Y.

В вариантах осуществления 67-78 указанные замены относятся к положениям относительно SEQ ID NO: 48 или 114 (SEQ ID NO: 48 и 114 имеют одинаковое количество положений, таким образом они являются взаимозаменяемыми). Хотя ссылка на эти последовательности в случае указанных положений не обязательно означает, что замены должны быть введены в белки FVIII этих последовательностей, в варианте осуществления 79 замены, указанные в любом из вариантов осуществления 67-78, введены в белок FVIII с SEQ ID NO: 48. В варианте осуществления 80 замены, указанные в любом из вариантов осуществления 67-78, введены в белок FVIII SEQ ID NO: 114. Однако соответствующие замены также можно вводить в другие белки AD2CD2_SC. Например, в варианте осуществления 81 замены, указанные в любом из вариантов осуществления 67-78, введены в AD2CD2-16M_SC с SEQ ID NO: 114, но с L160, F555 и S2315 (эти три положения относятся к положениям относительно SEQ ID NO: 1).

В 82-м варианте осуществления изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-81. В 83-м варианте осуществления нуклеиновая кислота по варианту осуществления 82 представляет собой вектор экспрессии, предпочтительно подходящий для экспрессии указанного рекомбинантного белка фактора VIII в клетке млекопитающего, предпочтительно в человеческой клетке, такой как клетка CAP.

В 84-м варианте осуществления изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 82 или 83. В 85-м варианте осуществления клетка-хозяин по варианту 84 представляет собой клетку

млекопитающего, содержащую вектор экспрессии, подходящий для экспрессии указанного рекомбинантного белка фактора VIII в указанной клетке, предпочтительно человеческой клетке, выбранной из группы, содержащей клетку Nek293 или клетку CAP (например, клетку CAP-T или клетку CAP-Go).

В 86-м варианте осуществления изобретение относится к способу получения рекомбинантного белка фактора VIII, включающему культивирование клетки-хозяина по вариантам осуществления 84 или 85 в условиях, подходящих для экспрессии белка фактора VIII, и выделение рекомбинантного белка фактора VIII, где способ необязательно включает приготовление белка фактора VIII в виде фармацевтической композиции.

В 87-м варианте осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей рекомбинантный белок фактора VIII по любому из вариантов осуществления 1-81, нуклеиновую кислоту по любому из вариантов осуществления 82-83 или клетку-хозяина по любому из вариантов осуществления 84-85. В 88-м варианте осуществления фармацевтическая композиция по варианту осуществления 87 дополнительно содержит биологически приемлемый носитель, такой как вода или буфер, необязательно, при физиологическом значении pH, предпочтительно, буфер для состава FVIII, и/или фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества. В 89-м варианте осуществления фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 87 или 88 дополнительно содержит альбумин, например, 0,1-5%, например 1% человеческий сывороточный альбумин.

В 90-м варианте осуществления изобретение относится к фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 87-89 или набору, дополнительно содержащему иммунодепрессант, например, иммунодепрессант, выбранный из группы, содержащей метилпреднизолон, преднизолон, дексаметазон, циклофосфамид, ритуксимаб и/или циклоспорин.

Изобретение дополнительно относится, в качестве 91-го варианта осуществления, к фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 87-90 для применения для лечения гемофилии А, где необязательно лечение представляет собой индукцию иммунологической толерантности (ИТ). В 92-м варианте осуществления фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 87-91 предназначена для применения для лечения пациента с гемофилией А, выбранного из группы, содержащей пациента, ранее не получавшего лечение каким-либо белком фактора VIII, пациента, ранее получавшего лечение белком фактора VIII, пациента с гуморальным ответом, включая образование ингибирующих антител на белок фактора VIII, и пациента с гуморальным иммунным ответом, включая образование ингибирующих антител на белок фактора VIII, который получал ИТ терапию или не получал ИТ терапию.

В 93-м варианте осуществления фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 87-92 предназначена для введения каждые 5-14 дней, предпочтительно, каждые 7-10 дней.

В 94-м варианте осуществления изобретение относится к флакону, например,

предварительно заполненному или готовому к применению шприцу, содержащему фармацевтическую композицию по любому из вариантов осуществления 87-93.

В 95-м варианте осуществления изобретение относится к способу лечения, включающему введение эффективного количества фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 87-93 нуждающемуся в этом пациенту, например, пациенту с гемофилией А, который может быть выбран из группы пациентов, определенных в настоящем описании.

В настоящем описании раскрыты белки и нуклеиновые кислоты, например, имеющие следующие последовательности:

SEQ ID NO: 1 человеческий FVIII дикого типа

SEQ ID NO: 2 последовательность процессинга в предпочтительных одноцепочечных конструкциях

SEQ ID NO: 4 последовательность процессинга в V0

SEQ ID NO: 5 вариант последовательности процессинга, X может меняться для деиммунизации

SEQ ID NO: 6 вариант последовательности процессинга, X может меняться для деиммунизации

SEQ ID NO: 7 вариант последовательности процессинга, X может меняться для деиммунизации

SEQ ID NO: 8 вариант последовательности процессинга, X может меняться для деиммунизации

SEQ ID NO: 9 связывающая последовательность, например, в V0

SEQ ID NO: 16 одноцепочечный FVIII V0 (AC_SC)

SEQ ID NO: 28 6rs-REF

SEQ ID NO: 39 расщепляемый тромбином линкер

SEQ ID NO: 40 глицин-сериновый линкер G1, G в положении 14 присутствует или отсутствует

SEQ ID NO: 41 глицин-сериновый линкер G2

SEQ ID NO: 42 расщепляемый тромбином линкер, фланкированный с каждой стороны глицин-сериновым линкером, строго повторяющийся

SEQ ID NO: 43 расщепляемый тромбином линкер, фланкированный с каждой стороны глицин-сериновым линкером, неповторяющийся

SEQ ID NO: 44 консенсусная последовательность ABD, см. выше

SEQ ID NO: 45 ABD1

SEQ ID NO: 46 ABD2

SEQ ID NO: 47 ADLCLD_SC aa

SEQ ID NO: 48 AD2CD2_SC aa

SEQ ID NO: 49 AD2CD2woL_SC aa

SEQ ID NO: 50 AD2CD2woLG_SC aa

SEQ ID NO: 51 AbD2CD2_SC aa

SEQ ID NO: 52 ADLCLD_SC na

SEQ ID NO: 53 AD2CD2_SC na

SEQ ID NO: 54 AD2CD2woL_SC na

SEQ ID NO: 55 AD2CD2woLG_SC na

SEQ ID NO: 56 AbD2CD2_SC na

SEQ ID NO: 57 оптимизированная ДНК-последовательность, кодирующая SEQ ID NO: 46

SEQ ID NO: 58 иллюстративная ДНК, кодирующая глицин-сериновый линкер G1
SEQ ID NO: 40

SEQ ID NO: 59 иллюстративная ДНК, кодирующая глицин-сериновый линкер G2
SEQ ID NO: 41

SEQ ID NO: 60 FVIII-6rs

SEQ ID NO: 61 ReFacto AF

SEQ ID NO: 62 scFVIII с удаленным В-доменом

SEQ ID NO: 63 FVIII-19M

SEQ ID NO: 64 FVIII-18M

SEQ ID NO: 65 FVIII-15M

SEQ ID NO: 66 FVIII-A1-7M

SEQ ID NO: 67 FVIII-A2-4M

SEQ ID NO: 68 FVIII-BA3-1M

SEQ ID NO: 69 FVIII-A3C2-4M

SEQ ID NO: 70 FVIII-GOF1

SEQ ID NO: 71 FVIII-GOF2

SEQ ID NO: 72 FVIII-LS1

SEQ ID NO: 73 FVIII-LS2

SEQ ID NO: 74-108+112 иммуногенные кластеры

SEQ ID NO: 109 FVIII-A1A2-3M

SEQ ID NO: 110 обеспечивает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей FVIII-19M.

SEQ ID NO: 111 обеспечивает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей FVIII-6rs.

SEQ ID NO: 113 одноцепочечная V0-19M (AC-19M_SC) aa

SEQ ID NO: 114 AD2CD2-19M_SC aa

SEQ ID NO: 115 ALDLCLD-19M_SC aa

SEQ ID NO: 116 ADLCLD-19M_SC-V1 aa

SEQ ID NO: 117 ADLCLD-19M_SC-V2 aa

SEQ ID NO: 118 AD2CD-19M_SC aa

SEQ ID NO: 119 AD2CD2-15M_SC aa

SEQ ID NO: 120 одноцепочечная V0-19M (AC-19M_SC) na

SEQ ID NO: 121 AD2CD2-19M_SC na

SEQ ID NO: 122 ALDLCLD-19M_SC na

SEQ ID NO: 123 ADLCLD-19M_SC-V1 na

SEQ ID NO: 124 ADLCLD-19M_SC-V2 na

SEQ ID NO: 125 AD2CD-19M_SC na

SEQ ID NO: 126 AD2CD2-15M_SC na

SEQ ID NO: 127 последовательность F761-S769, перекрывающаяся с sc последовательности процессинга SEQ ID NO: 2:

SEQ ID NO: 128 деиммунизированный вариант SEQ ID NO: 127 с F761A

SEQ ID NO: 129 деиммунизированный вариант SEQ ID NO: 127 с F761S

SEQ ID NO: 130 деиммунизированный вариант SEQ ID NO: 127 с P766E

SEQ ID NO: 131 деиммунизированный вариант SEQ ID NO: 127 с S769D

SEQ ID NO: 132 деиммунизированная последовательность процессинга с P766E

SEQ ID NO: 133 FVIII-16M

SEQ ID NO: 134 одноцепочечный V0-16M (AC-16M_SC)

SEQ ID NO: 135 F01_ AD2CD2-19M_SC

SEQ ID NO: 136 F02_ AD2CD2-19M_SC

SEQ ID NO: 137 F03_ AD2CD2-19M_SC

SEQ ID NO: 138 F04_ AD2CD2-19M_SC

SEQ ID NO: 139 F01_ AD2CD2-16M_SC

SEQ ID NO: 140 F02_ AD2CD2-16M_SC

SEQ ID NO: 141 F01_ AD2CD2_SC

SEQ ID NO: 142 F02_ AD2CD2_SC

SEQ ID NO: 143 F03_ AD2CD2_SC

SEQ ID NO: 144 F04_ AD2CD2_SC

SEQ ID NO: 145 D01_ AD2CD2_SC

SEQ ID NO: 146 D02_ AD2CD2_SC

SEQ ID NO: 147 D03_ AD2CD2_SC

SEQ ID NO: 148 D04_ AD2CD2_SC

SEQ ID NO: 149 D05_ AD2CD2_SC

SEQ ID NO: 150 D06_ AD2CD2_SC

SEQ ID NO: 151 D07_ AD2CD2_SC

SEQ ID NO: 152 D08_ AD2CD2_SC

SEQ ID NO: 153 D09_ AD2CD2_SC

SEQ ID NO: 154 D10_ AD2CD2_SC

SEQ ID NO: 155 D11_ AD2CD2_SC

SEQ ID NO: 156 E01_ AD2CD2-19M_SC

SEQ ID NO: 157 E02_ AD2CD2-19M_SC

SEQ ID NO: 158 E03_ AD2CD2-19M_SC

SEQ ID NO: 159 E04_ AD2CD2-19M_SC

SEQ ID NO: 160 E05_ AD2CD2-19M_SC

SEQ ID NO: 161 E06_AD2CD2-19M_SC

SEQ ID NO: 162 E07_AD2CD2-19M_SC

SEQ ID NO: 163 E08_AD2CD2-19M_SC

SEQ ID NO: 164 E09_AD2CD2-19M_SC

SEQ ID NO: 165 E10_AD2CD2-19M_SC

SEQ ID NO: 166 E11_AD2CD2-19M_SC

SEQ ID NO: 167 G08_AD2CD2-16M_SC

SEQ ID NO: 168 G11_AD2CD2-16M_SC

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг. 1 показано связывание с человеческим альбумином ADLCLD_SC, белка FVIII по изобретению, содержащего два альбумин-связывающих домена, по сравнению с FVIII 6rs-Ref, белком, имеющим последовательность ReFacto AF. Оба белка FVIII тестировали в присутствии и в отсутствие HSA с помощью описанного анализа по оценке альбумин-связывающей способности.

На фиг. 2 показана фактор фон Виллебранда (vWF)-связывающая способность различных слитых белков FVIII-альбумин-связывающий домен относительно ReFacto AF. Все молекулы FVIII тестировали в отношении связывания с vWF в присутствии или в отсутствие человеческого альбумина. Чем больше альбумин-связывающих доменов включено в FVIII, тем более низким было связывание с vWF в целом. Присутствие человеческого альбумина резко снижало связывание с vWF.

Фиг. 3. Сравнение функциональности *in vitro* неочищенных слитых вариантов FVIII-ABD и контролей FVIII. Супернатанты клеточных культур клеток CAP-T, экспрессирующих двухцепочечную молекулу FVIII 6rs-REF, одноцепочечную молекулу FVIII AC_SC и слитые молекулы FVIII-ABD AD2CD2_SC, AD2CD2woLG_SC, AD2CD2wL_SC, ACD4woLG_SC и ACL(GD)4_SC, анализировали на хромогенную активность FVIII (A), свертывающую активность FVIII, индуцированную реагентом Actin FSL (B), и уровни антигена FVIII, указывающие на общее количество белка FVIII (C). Удельную хромогенную активность вычисляли в виде отношения хромогенной активности FVIII к антигену FVIII, выраженного в % (D). Удельную свертывающую активность вычисляли в виде отношения свертывающей активности FVIII к антигену FVIII, выраженного в % (E). n=2.

Фиг. 4 Анализ методом вестерн-блоттинга неочищенных слитых вариантов FVIII-ABD и контрольных белков FVIII для оценки структурных свойств. Супернатанты клеточных культур клеток CAP-T, экспрессирующих двухцепочечную молекулу FVIII 6rs-REF, одноцепочечную молекулу FVIII AC_SC и слитые молекулы FVIII-ABD AD2CD2_SC, AD2CD2woLG_SC, AD2CD2wL_SC и ACD4woLG_SC, разделяли методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия в невозстанавливающих условиях с последующим блоттингом на основе PVDF мембраны. Для детектирования использовали очищенное первичное антитело овцы к человеческому фактору VIII и антитело осла к овечьему IgG (H&L), конъюгированное с CF680. Для

определения размера в качестве маркера использовали Precision Plus All Blue.

На фиг. 5 показана фармакокинетика AD2CD2_SC *in vivo* по сравнению с ReFacto AF после однократной инъекции 200 ЕД/кг FVIII (с 1% человеческого альбумина) мышам, нокаутным по мышинному альбумину, экспрессирующим человеческую α -цепь вместо мышинного неонатального Fc-рецептора. Определенные значения антигена FVIII нормализовали и представляли в процентах в зависимости от времени.

На фиг. 6 показана фармакокинетика AD2CD2_SC *in vivo* по сравнению с ReFacto AF после однократной инъекции геттингенским мини-свиньям 30 ед. антигена FVIII/кг в составе, содержащем либо 1%, либо 10% человеческого альбумина. Брали образцы плазмы, и с помощью ELISA измеряли уровни антигена FVIII. Средние уровни антигена FVIII показаны в ед/мл в зависимости от времени, указанного в часах. $n=3$ мини-свиньи на группу.

На фиг. 7 показано общее время кровотечения (первая колонка каждой группы, левая ось Y) и общая кровопотеря (вторая колонка каждой группы, правая ось Y) после перерезки хвоста у мышей с гемофилией A, которым 20 ч ранее ввели либо контрольный носитель, либо ReFacto AF, либо Elocate, либо AD2CD2_SC, либо ADLCLD_SC. Мышей C57BL/6NCrl без гемофилии обрабатывали 0,9% NaCl и использовали в качестве контроля.

Фиг. 8: (A) Структура белка FVIII и образование белка FVIII-19M по изобретению за несколько раундов селекции. (B) Аминокислотная последовательность FVIII-19M, включая сигнальную последовательность. Сигнальная последовательность: курсив, домен A1: подчеркнутый, домен A2: двойное подчеркивание, домен B: подчеркнутый жирным шрифтом, домен A3: подчеркнутый пунктиром, домен C1: подчеркнутый пунктиром, домен C2: подчеркнутый волнистой линией, промежуточные домены a1, a2, a3: не отмечены, мутации относительно FVIII-6rs отмечены курсивом, жирным шрифтом и более крупным шрифтом.

Фиг. 9: Относительная коагулянтная активность вариантов FVIII с одиночными мутациями. Коагулянтную активность FVIII каждого варианта с одиночной мутацией рассчитывали относительно коагулянтной активности FVIII контрольного FVIII-6rs. В скобках указаны мутации, принадлежащие одному кластеру. (A) Мутации в домене A1. (B) Мутации в домене A2. (C) Мутации в домене A3. (D) Мутации в домене C1. (E) Мутации в домене C2.

Фиг. 10: Удельная коагулянтная активность вариантов FVIII с одиночными мутациями. Отношение коагулянтной активности FVIII к антигену FVIII вычисляли для каждого варианта с одиночной мутацией. В скобках указаны мутации, принадлежащие одному кластеру. (A) Мутации в домене A1. (B) Мутации в домене A2. (C) Мутации в домене A3. (D) Мутации в домене C1. (E) Мутации в домене C2.

Фиг. 11: Результаты комбинированных мутаций в участках A1, A1A2, A2 и A3C1C2. (A) Относительная коагулянтная активность вариантов FVIII. Коагулянтную активность FVIII каждого варианта рассчитывали относительно коагулянтной активности

FVIII контрольного FVIII-6rs. (B) Удельная коагулянтная активность вариантов FVIII. Для каждого варианта вычисляли отношение коагулянтной активности FVIII к антигену FVIII.

Фиг. 12: Относительная коагулянтная активность вариантов FVIII, содержащих разные мутации, основанные на матрице DOE. Коагулянтную активность FVIII каждого варианта рассчитывали относительно коагулянтной активности FVIII контрольного FVIII-6rs. (A) Результаты для вариантов в домене A2. (B) Результаты для вариантов в домене A3C1C2.

Фиг. 13: Коагулянтная активность FVIII с комбинированными мутациями в участках A2 и A3C1C2 после матрицы DOE. (A) Относительная коагулянтная активность вариантов FVIII. Коагулянтную активность FVIII каждого варианта рассчитывали относительно коагулянтной активности FVIII контрольного FVIII-6rs. (B) Удельная коагулянтная активность вариантов FVIII. Для каждого варианта вычисляли отношение хромогенной коагулянтной активности FVIII к антигену FVIII.

Фиг. 14: Относительная и удельная коагулянтная активность вариантов FVIII со специфическими мутациями (A, B). Относительную коагулянтную активность определяли относительно коагулянтной активности FVIII-6rs. Удельная коагулянтная активность относится к отношению хромогенной коагулянтной активности к антигену. Коагулянтная активность предпочтительных белков FVIII с мутациями в определенных доменах FVIII (A) и белков FVIII с тремя мутациями (B). Свертывающая активность FVIII-BA3-1M не определялась.

Фиг. 15: ROTEM-анализ FVIII-19M, FVIII-6rs, ReFacto AF и Nuwiq для оценки времени свертывания крови. Проанализированы различные концентрации FVIII. Измерения выполняли в двух повторах, и отображали средние значения.

Фиг. 16: Результаты TGA (анализ образования тромбина) для ReFacto AF, Nuwiq, FVIII-19M и FVIII-6rs. Все продукты разводили до 0,25 ЕД/мл, 0,063 ЕД/мл и 0,016 ЕД/мл коагулянтной активности FVIII. Каждая точка указывает на результаты одного TGA. Линия обозначает медиану четырех выполненных анализов. Статистический анализ выполняли с помощью теста Фридмана. (A) Количество образованного пикового тромбина для каждого продукта при данной концентрации на основе стандарта тромбина. (B) Площадь под кривой для каждого продукта при данной концентрации. (C) Время, необходимое для пиковой генерации тромбина для каждого продукта при данной концентрации.

Фиг. 17: Связывание разных продуктов FVIII с vWF. Сила связывания ReFacto AF с vWF была установлена равной 1 и служила эталоном для других продуктов. Каждая точка указывает на результаты одного ELISA. Линия означает медиану трех выполненных анализов. Статистический анализ выполняли с помощью теста Фридмана.

Фиг. 18: Удельная коагулянтная активность четырех независимых продуктов FVIII-6rs и FVIII-19M на основе очищенного белка. (A) Удельная коагулянтная активность, основанная на измерении хромогенной коагулянтной активности FVIII. Линия означает медиану четырех измерений. (B) Удельная коагулянтная активность, основанная на

измерении свертывающей активности FVIII. Линия означает медиану четырех измерений.

Фиг. 19: Вестерн-блот активированного тромбином FVIII. Каждый продукт использовался в неактивированной и активированной формах. В неактивированной форме наблюдали типичные полосы одиночной цепи (≈ 200 кДа), тяжелой цепи (≈ 95 -110 кДа) и легкой цепи (≈ 80 -90 кДа). После расщепления тромбином появились дополнительные полосы для A1A2 (≈ 90 кДа), A3C1C2 (≈ 75 кДа), A1 (≈ 50 кДа), A2 (≈ 40 кДа) и Ba3 (≈ 20 кДа). FVIII детектировали с помощью первичных поликлональных овечьих антител к человеческому фактору VIII и вторичных ослиных антител к овечьему IgG IRDye 800CW.

Фиг. 20: Анализ иммуногенности *in vitro*. Моноциты очищают от PBMC, дифференцируют в iDC и, наконец, стимулируют для превращения в mDC, и инкубируют с антигеном, т.е. представляющим интерес белком. CD4+CD25-T-клетки также очищают от PBMC и культивируют перед совместным культивированием для регенерации. После совместного культивирования T-клетки анализируют на активацию и/или пролиферацию методом проточной цитометрии. Необязательно супернатант анализируют на цитокины.

Фиг. 21: Результаты анализа иммуногенности *in vitro*. Различие между пролиферацией CD4+T-клеток в ответ на DC, стимулированные IL-Mix плюс FVIII-19M, и DC, стимулированные IL-Mix плюс FVIII-6rs. Столбцы ниже 0 указывают на сниженный ответ CD4⁺ T-клеток на FVIII-19M. Более низкий ответ T-клеток на FVIII-19M по сравнению с FVIII-6rs является значимым согласно тесту Вилкоксона ($p=0,0371$).

Фиг. 22: Сравнение неочищенного слитого варианта FVIII-ABD с (AD2CD2-19M_SC) или без (AD2CD2_SC) 19 деиммунизирующих аминокислотных замен с контролем FVIII в отношении уровня экспрессии белка и его функциональности *in vitro*. Супернатанты клеточных культур клеток CAP-T, экспрессирующих двухцепочечную молекулу FVIII 6rs-REF (последовательность ReFacto), слитую молекулу FVIII-ABD AD2CD2_SC и деиммунизированную слитую молекулу FVIII-ABD AD2CD2-19M_SC, анализировали на хромогенную активность FVIII (A), и уровни антигена FVIII, указывающие на общее количество белка FVIII (B). Удельную хромогенную активность вычисляли в виде отношения хромогенной активности FVIII к антигену FVIII, выраженного в % (C). $n=2$.

На фиг. 23 показана фармакокинетика *in vivo* AD2CD2-19M_SC по сравнению с ReFacto AF после однократной внутривенной инъекции 200 ЕД/кг FVIII мышам с гемофилией А. Определяли значения антигена FVIII и хромогенную активность FVIII. Значения антигена FVIII показаны в зависимости от времени. Белок по изобретению явно имеет более длительный период полувыведения *in vivo*.

На фиг. 24 показана фармакокинетика *in vivo* AD2CD2_SC и AD2CD2-19M_SC по сравнению с ReFacto AF после однократной внутривенной инъекции геттингенским мини-свиньям 30 ед. FVIII:Ag/кг, приготовленного с 10% человеческим альбумином. Брали образцы плазмы, и измеряли уровни антигена FVIII. Средние уровни антигена FVIII показаны в ед/мл в зависимости от времени, указанного в часах. $n=3$ мини-свиньи на группу. Белки по изобретению явно имеют более длительный период полувыведения *in vivo*.

vivo.

На фиг. 25 показано общее время кровотечения после надреза хвостовой вены у мышей с гемофилией А, которым за 30 мин до этого ввели либо контрольный носитель (группа 6), либо разные дозы (группы 1-5) AD2CD2 19M_SC (200, 70, 20, 7 или 2 ЕД/кг FVIII) внутривенно. Контрольный носитель также вводили мышам C57BL/6NCrl без гемофилии (группа 7). N=10 мышей на группу.

На фиг. 26 показана ингибирующая эффективность пяти антител к FVIII (ESH-8, GMA-8009, GMA-8015, GMA-8026, CL20035AP) к стандартной плазме человека (SHP), ReFacto AF, AD2CD2_SC и AD2CD2-19M_SC.

На фиг. 27 показано количество иммуногенных кластеров, идентифицированных с помощью технологии MAPPs в различных вариантах FVIII, а именно, ReFacto AF, AC-19M_SC и AD2CD2-19M_SC. Общее количество кластеров уменьшено как в AC-19M_SC, так и в AD2CD2-19M_SC по сравнению с ReFacto AF (общее количество кластеров: столбцы 1-3). Количество кластеров со сниженной частотой (FRQ) в когорте доноров по сравнению с ReFacto AF показано в столбцах 4 и 5, включая количество удаленных кластеров (заштрихованная часть столбцов). В столбцах 6 и 7 отсутствуют кластеры с повышенным FRQ по сравнению с ReFacto AF, включая кластеры, не наблюдаемые для ReFacto AF, показанные в заштрихованных частях столбцов.

На фиг. 28 показана хромогенная (A, C) и удельная хромогенная (B, D) активность FVIII специфических белков FVIII по изобретению деиммунизированных в участке стыка.

На фиг. 29 показано общее время кровотечения у мышей с гемофилией А после введения различных количеств специфических белков FVIII по изобретению деиммунизированных в участке стыка.

На фиг. 30 показаны нормализованная хромогенная активность FVIII (A) и нормализованные по антигену FVIII уровни (B) специфических белков FVIII по изобретению.

Примеры

1. Оценка белков фактора VIII с добавлением альбумин-связывающих доменов для разработки нового терапевтического средства против гемофилии А.

Материал и методы

Получение конструкций

Эксперименты выполняли с целью поиска и разработки подходящего остова для интеграции альбумин-связывающих доменов. Эксперименты выполняли, взяв за основу вариант FVIII с удаленным В-доменом и одноцепочечные варианты FVIII. Базовая двухцепочечная конструкция представляла собой оптимизированную по кодонам последовательность ReFacto AF® (Pfizer), в которую для простоты клонирования было добавлено 6 сайтов рестрикции, используя «молчащие» мутации, но некоторые из этих сайтов рестрикции были повторно удалены в результате оптимизации кодонов. Основная двухцепочечная последовательность представляет собой 6rs-REF (SEQ ID NO: 28). Используемой базовой одноцепочечной конструкцией была V0 (SEQ ID NO: 16,

EP19173440).

Во-первых, для разработки последовательности ДНК за основу брали последовательность белка ABD (Affibody AB, Solna, Швеция). Если не указано иное, использовали последовательность ABD2. Кроме того, были разработаны оптимизированные по кодонам линкеры, частично расщепляемые тромбином. Если не указано иное, глицин-сериновый линкер представлял собой G1, а расщепляемый тромбином линкер представлял собой L. В таблице 1 ниже показаны структуры слитых белков с альбумин-связывающими доменами (ABD) для одноцепочечных молекул.

Для конструкций, кодирующих FVIII по изобретению, и конструкций сравнения, также проанализированных в этом контексте, синтезировали либо полную последовательность FVIII, либо участки ДНК, несущие приблизительно 700-1200 п.н. от домена a2 FVIII до домена A3. Синтезированную ДНК оптимизировали по кодонам для всего целевого гена. Фрагменты ДНК от a2 до A3 фланкировали на 5'-конце сайтом рестрикции EcoRV и на 3'-конце сайтом рестрикции EcoRI, и эти сайты рестрикции также присутствовали в используемой основной последовательности FVIII. Для С-терминального слияния с легкой цепью фрагменты ДНК, несущие приблизительно 1500-2100 п.н., также синтезировали в кодон-оптимизированной форме. Такие фрагменты ДНК фланкировали на 5'-конце сайтом рестрикции EcoRI в домене A3 и на 3'-конце сайтом рестрикции NotI. Рестрикция ДНК-вставок и остов плазмиды FVIII обеспечивали направленное лигирование и получение одноцепочечных плазмид FVIII. Полностью синтезированную ДНК FVIII фланкировали на 5'-конце сайтом рестрикции HindIII и на 3'-конце сайтом рестрикции NotI.

Трансформация E.coli K12 указанными плазмидами, размножение трансформированных бактерий в условиях селекции ампициллином и получение плазмид позволило получить эти плазмиды в большом количестве. Работа по генной инженерии была выполнена компанией Thermo Fisher Scientific после проектирования с помощью программного обеспечения VectorNTI (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США).

Культивирование клеток CAP-T

Для анализа кандидатов для новых рекомбинантных молекул FVIII временную и стабильную экспрессию конструкций, интегрированных в векторы экспрессии, осуществляли в человеческих клеточных линиях. Предпочтительными клеточными линиями являются клетки Hek293 и CAP, обе из которых происходят из человеческих амниоцитов. Из-за более высоких выходов активных молекул FVIII клетки CAP, в частности, клетки CAP-T выбирали в качестве предпочтительной системы экспрессии для временной трансфекции, а клетки CAP-Go - для стабильной экспрессии.

Временную трансфекцию осуществляли с помощью программ нуклеофекции. Выполняли скрининг супернатантов на активность FVIII и антиген. Выполняли очистку рекомбинантных белков из клеток CAP, включая аффинную хроматографию FVIII.

В частности, клетки CAP-T (Cevec Pharmaceuticals, Köln, Germany) культивировали в среде PEM с добавлением 4 mM GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 35050038) и 5

мкг/мл бластицидина (Thermo Fisher Scientific, R21001; полная среда PEM). Для оттаивания клеток необходимое количество замороженных флаконов переносили на водяную баню с температурой 37°C. После оттаивания каждый флакон переносили в 10 мл охлажденной полной среды PEM. Клеточную суспензию центрифугировали при 150×g в течение 5 минут. Во время этой стадии промывки удаляли диметилсульфоксид (ДМСО), используемый для криоконсервации. Осадок ресуспендировали в 15 мл теплой полной среды PEM и переносили в шейкерную колбу на 125 мл. Клетки инкубировали при 37°C во влажном инкубаторе с атмосферой, содержащей 5% CO₂. Колбы устанавливали на встряхивающую платформу, вращающуюся со скоростью 185 об/мин с орбитой 50 мм.

Клетки пересеивали каждые 3-4 дня. Свежую культуру доводили до $0,5 \times 10^6$ клеток/мл путем переноса необходимого количества культивируемой клеточной суспензии в новую колбу и добавления полной среды PEM. В случае, если перенесенная клеточная суспензия превышала 20% от общего объема, суспензию центрифугировали при 150×g в течение 5 минут и осадок ресуспендировали в свежей полной среде PEM. Объем клеточной суспензии на встряхиваемую колбу составлял 20% от общего объема колбы.

После оттаивания перед проведением экспериментов по трансфекции выполняли как минимум три посева.

Экспрессия белка в клетках CAP-T путем временной трансфекции

Клетки CAP-T трансфицировали, используя 4D-NucleofectorTM (Lonza, Базель, Швейцария). Для каждой трансфекции 10×10^6 клеток CAP-T центрифугировали при 150×g в течение 5 минут в конических пробирках на 15 мл. Клетки ресуспендировали в 95 мкл дополненного буфера SE с учетом объема осадка и объема раствора плазмид. Затем к клеточной суспензии добавляли 5 мкг соответствующей плазмиды с последующим осторожным перемешиванием. Раствор переносили в нуклеокуветы на 100 мкл. Использовали программу трансфекции ED-100. После трансфекции клетки из одной нуклеокуветы переносили в шейкерные колбы на 125 мл, содержащие 12,5 мл полной среды PEM. Клетки культивировали в течение 4 дней, как описано выше. На 4-й день клетки собирали центрифугированием при 150×g в течение 5 минут. Белок в более высоких количествах может быть получен путем комбинирования подходов по 12,5 мл, как описано выше.

Супернатанты проверяли на активность FVIII и антиген сразу после сбора.

Далее анализировали рекомбинантный белок фактора VIII. Активность FVIII измеряли с помощью анализа хромогенной активности и анализа индуцированной FSL свертывающей активности. Антиген FVIII оценивали с помощью ELISA. В качестве дополнительного анализа биологической активности анализировали расщепление рекомбинантных белков тромбином. Более того, распределение цепи и внешний вид тестировали методом вестерн-блоттинга. Также тестировали связывание с vWF и связывание с альбумином.

Экспрессия белка в клетках CAP Go пулами стабильных клеток

Для получения материала в больших количествах для проведения исследований на мини-свиньях, в Cevac Pharmaceuticals GmbH (Кельн, Германия) создавали стабильные пулы CAP-Go, экспрессирующие либо AD2CD2_SC, либо AD2CD2-19M_SC. Для этого последовательности, кодирующие FVIII, клонировали в плазмиду CEVEC pStbl-bsd-MCS(-), используя сайты рестрикции SgrD1 и Not1. Затем фрагмент разделяли электрофорезом в агарозном геле, очищали гель-фильтрацией и клонировали в pStbl-bsd-MCS(-), который предварительно разрезали с помощью SgrD1 и Not1 и обрабатывали фосфатазой кишечника телят (CIP). Вставки и вектор лигировали с помощью T4-ДНК-лигазы и трансформировали в химически компетентные клетки *E. coli* (XL2-Blue). Плазмидную ДНК очищали с помощью набора Maxi Kit от Machery-Nagel. Все процессы клонирования, а также очистку плазмид осуществляли в процессе производства, не содержащем TSE.

Перед нуклеофекцией кольцевые плазмиды линеаризовали с помощью ScaI. Для этого 20-40 мкг плазмидной ДНК инкубировали в течение 5-8 ч с 50-200 ЕД соответствующего фермента при 37°C. Затем ДНК очищали экстракцией фенол-хлороформ-изоамиловым спиртом, и фенол вымывали смесью хлороформ-изоамиловый спирт. Для очистки ДНК осаждением этанолом к раствору ДНК добавляли 1/10 объема 3М NaOAc, pH 5,2, и 2 объема этанола и инкубировали в течение ночи при -20°C. Осадок ДНК осаждали центрифугированием (30 мин, 13000 об/мин, 4°C), промывали 70% этанолом, повторно центрифугировали, сушили на воздухе и ресуспендировали в TE-буфере. Качество линеаризованной ДНК подтверждали анализом ДНК в агарозном геле.

Для нуклеофекции подсчитывали количество клеток CAP-Go с помощью Cedex XS (Roche Applied Science, Innovatis) и определяли плотность жизнеспособных клеток и жизнеспособность. Для каждой реакции нуклеофекции собирали 1×10^7 клеток центрифугированием ($150 \times g$ в течение 5 мин). Клетки ресуспендировали в 100 мкл полного раствора нуклеофектора V (Lonza) и смешивали с 5 мкг линеаризованной плазмиды соответствующей конструкции. Суспензию ДНК/клеток переносили в кювету и выполняли нуклеофекцию с помощью программы X001 на Nucleofector II (Lonza). После импульса клетки восстанавливали путем добавления в кювету 500 мкл предварительно нагретой полной среды PEM (= с добавлением 4 мМ L-аланил-L-глутамин) и осторожно переносили в 11,5 мл полной среды PEM в колбу для встряхивания объемом 125 мл. Кювету один раз промывали 500 мкл свежей среды для восстановления оставшихся клеток.

Через 72 ч после нуклеофекции определяли количество клеток и жизнеспособность трансфицированных клеток. Клетки собирали центрифугированием и ресуспендировали в 20 мл полной среды PEM, содержащей 5 мкг/мл бастидина в качестве маркера селекции. Клетки культивировали в инкубаторе-шейкере Kühner при 37°C, 5% CO₂ при 185 об/мин и амплитуде 5 см. После восстановления клеток после селекции, их размножали, и клетки из стабильных пулов криоконсервировали.

Для серийного производства культуру инокулировали при плотности жизнеспособных клеток 1×10^6 клеток/мл в 800 мл полной среды PEM во встряхиваемой

колбе объемом 2 л. Клетки инкубировали в инкубаторе-шейкере Kühner при 185 об/мин, 37°C, 5% CO₂ в течение 4 дней. Клеточные супернатанты, содержащие FVIII, собирали центрифугированием и очищали с помощью аффинной хроматографии, как описано в другом месте этого документа.

Активность FVIII - анализ хромогенной активности

Активность FVIII определяли с помощью хромогенного анализа. В этом двухэтапном анализе на первом этапе FX активируют FIXa и FVIIIa. На втором этапе активированный FX гидролизует хромогенный субстрат, что приводит к изменению цвета, которое можно измерить при 405 нм. Поскольку кальций и фосфолипиды присутствуют в оптимальных количествах, а также доступен избыток FIXa и FX, скорость активации FX зависит только от количества активного FVIII в образце.

Реагенты для этого хромогенного анализа активности FVIII брали из набора Coatest® SP FVIII. Набор содержал фосфолипиды, хлорид кальция (CaCl₂), следовые количества тромбина, субстрат S-2765, смесь FIXa и FX и ингибитор тромбина I-2581. Ингибитор добавляли для предотвращения гидролиза субстрата тромбином, образующимся в ходе реакции. Все разведения выполняли в дистиллированной воде или Трис-BSA (TBSA) буфере, содержащем 25 мМ Трис, 150 мМ хлорида натрия (NaCl) и 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) при pH 7,4. Каждый образец разбавляли по меньшей мере 1:2 плазмой, обедненной FVIII. Дальнейшие разведения выполняли с помощью буфера TBSA.

Анализ выполняли с помощью полностью автоматизированного анализатора гемостаза BCS XP (Siemens Healthcare, Эрланген, Германия). Все реагенты, включая воду, буфер TBSA и образцы, вводили в анализатор. Для каждого образца в анализаторе смешивали 34 мкл хлорида кальция, 20 мкл буфера TBSA, 10 мкл образца, 40 мкл воды, 11 мкл фосфолипидов и 56 мкл смеси FIXa-FX. Эту смесь инкубировали в течение 300 секунд. После этого к реакции добавляли 50 мкл S-2765+I-2581. После добавления субстрата измеряли поглощение при 405 нм в течение 200 секунд.

Чтобы рассчитать количество активного FVIII, с помощью программного обеспечения анализатора оценивали наклон кривой измеренной кинетики между 30 и 190 секундами после начала реакции. Этот результат сопоставляли с калибровочной кривой, полученной с использованием биологического эталонного препарата (BRP) FVIII. Активность BRP указана в МЕ/мл. Однако можно предположить, что МЕ/мл эквивалентна ЕД/мл. Результаты указаны в виде «% от нормы». Эти результаты были преобразованы в Ед/мл, поскольку 100% нормальной активности FVIII эквивалентны 1 Ед активности FVIII в расчете на 1 мл.

Индукцированная FSL свертывающая активность

В дополнение к двухэтапному хромогенному анализу (см. выше) также выполняли одноэтапный анализ свертывания крови для определения количества активного FVIII. Во время этого анализа обедненную FVIII плазму, CaCl₂, активатор Actin FSL и образец, содержащий FVIII, смешивали в одном этапе. Активатор приводит к генерации FXIa,

который активирует FIX. FVIIIa, FIXa и FX образуют теназный комплекс, который активирует FX. Дальнейшая активация протромбина и фибриногена в итоге приводит к образованию фибринового сгустка. Измеряют время, необходимое для образования сгустка, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). АЧТВ меняется в зависимости от количества FVIII.

Анализ свертывания крови выполняли с помощью BCS XP. В анализатор вводили буфер TBSA, обедненную FVIII плазму, Actin FSL, CaCl_2 и образец. Образец разбавляли по меньшей мере 1:2 плазмой, обедненной FVIII. Дальнейшие разведения выполняли буфером TBSA. Для каждого образца в анализаторе смешивали 45 мкл буфера TBSA, 5 мкл образца, 50 мкл плазмы, обедненной FVIII, и 50 мкл Actin FSL. Реакцию начинали добавлением 50 мкл CaCl_2 . Анализатор измерял время, необходимое для образования сгустка.

Для вычисления количества активного FVIII с помощью программного обеспечения анализатора в начале реакции оценивали исходную экстинкцию при 405 нм. Анализ всех последующих значений поглощения в течение 200 секунд выполняли относительно исходного значения поглощения. Первый момент времени, превышающий определенный порог, определяли как время свертывания крови. Этот результат сопоставляли с калибровочной кривой, полученной с помощью BRP FVIII.

ELISA для оценки антигена FVIII

Количество антигена FVIII определяли с помощью ELISA_Asserachrom® VIII:Ag (Diagnostica Stago, Asnières sur Seine Cedex, Франция). В этом сэндвич-ELISA используемый FVIII связывают мышиными моноклональными фрагментами F(ab')_2 к человеческому FVIII, нанесенными производителем на планшет. Обнаружение связанного FVIII происходит с помощью связанных с пероксидазой мышиных моноклональных антител к человеческому FVIII. Если FVIII присутствует, антитело связанное с пероксидазой, связывается с FVIII и может быть обнаружено добавлением раствора тетраметилбензидина (ТМБ). В результате реакции с пероксидазой ТМБ превращается из прозрачного в сине-зеленый раствор. Через короткое время эту реакцию останавливают добавлением серной кислоты (H_2SO_4), которая окрашивает раствор в желтый цвет. Количество связанного FVIII коррелирует с интенсивностью желтого цвета, который можно измерить при 450 нм. Окончательные количества FVIII рассчитывают с помощью калибровочной кривой, полученной путем измерения не менее пяти серийных разведений калибратора с известной концентрацией антигена.

Поставляемые калибратор и контроль разбавляли 500 мкл дистиллированной воды за 30 минут до начала ELISA. После инкубации в течение этого времени калибратор разбавляли 1:10 поставляемым фосфатным буфером. Это было исходной концентрацией. Калибратор последовательно разбавляли 1:2 до разведения 1:64. Поскольку концентрация калибратора содержала приблизительно 1 ЕД/мл FVIII, в зависимости от партии, начальная концентрация была эквивалентна 0,1 ЕД/мл FVIII, тогда как последнее разведение содержало приблизительно 0,0016 ЕД/мл FVIII. Контроль разбавляли 1:10 и

1:20 фосфатным буфером. Все образцы разбавляли фосфатным буфером в зависимости от их ранее определенной активности (см. выше) с целью попадания в середину калибровочной кривой. После разбавления образцов FVIII, контроля и калибратора в лунку вносили по 200 мкл каждого раствора в повторях. Кроме того, в две лунки вносили по 200 мкл фосфатного буфера в качестве холостого контроля. Планшет, накрытый пленкой, инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. В течение этого времени связанные с пероксидазой антитела к человеческому FVIII восстанавливали 8 мл фосфатного буфера и инкубировали 30 минут при комнатной температуре. После иммобилизации антигена лунки пятикратно промывали поставляемым промывочным раствором, предварительно разбавленным дистиллированной водой в соотношении 1:20. Сразу после промывки в каждую лунку добавляли по 200 мкл связанных с пероксидазой антител к человеческому FVIII и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре, накрыв пленкой. После этого планшет промывали пять раз, как и раньше. Для определения количества связанного FVIII в каждую лунку добавляли по 200 мкл раствора TMB и инкубировали ровно 5 минут при комнатной температуре. Эту реакцию останавливали добавлением в каждую лунку по 50 мкл 1M H₂SO₄. После 15-минутной инкубации при комнатной температуре оптическую плотность каждой лунки измеряли при 450 нм с помощью планшетного ридера POLARstar Omega (BMG LABTECH, Ортенберг, Германия).

Результаты ELISA рассчитывали с помощью программного обеспечения MARS (BMG Labtech). На первом этапе все лунки корректировали относительно холостых показаний и вычисляли среднее значение дубликатов. После этого использовали 4-параметрическую подгонку кривой для определения концентрации по калибровочной кривой. По этой калибровочной кривой определяли количество антигена FVIII в каждой лунке. На последнем этапе значения корректировали с помощью коэффициента разбавления, что дало количество антигена FVIII в каждом образце.

Адаптированный ELISA для оценки антигена FVIII для измерения в образцах геттингенских мини-свиней

Поставляемый калибратор и контрольный образец Asserachrom® VIII:Ag ELISA (Diagnostica Stago, Asnières sur Seine Cedex, France, Cat. No. 00280) растворяли в 500 мкл дистиллированной воды за 30 минут до начала ELISA. После инкубации в течение этого времени калибратор разбавляли 1:5 в плазме геттингенских мини-свиней, а затем 1:2 в поставляемом фосфатном буфере. Это дало исходную концентрацию. Калибратор последовательно разбавляли 1:2, чтобы покрыть диапазон концентраций от 96 мЕд/мл до 1,5 мЕд/мл. Все образцы разбавляли плазмой мини-свиней, за исключением последней стадии разведения, которую выполняли 1:2 в фосфатном буфере. Все разведения выполняли таким образом, чтобы они попали в середину калибровочной кривой. После разбавления образцов FVIII и калибратора в лунку вносили по 100 мкл каждого раствора в повторях (объем был уменьшен на 50% по сравнению с инструкцией). Кроме того, в две лунки вносили по 100 мкл фосфатного буфера в качестве холостого контроля. Планшет,

накрытый пленкой, инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре. В течение этого времени связанные с пероксидазой антитела к человеческому FVIII восстанавливали 8 мл фосфатного буфера и инкубировали 30 минут при комнатной температуре. После иммобилизации антигена лунки пятикратно промывали поставляемым промывочным раствором, предварительно разбавленным дистиллированной водой в соотношении 1:20. Сразу после промывки в каждую лунку добавляли по 200 мкл связанных с пероксидазой антител к человеческому FVIII и инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре, накрыв пленкой. После этого планшет промывали пять раз, как и раньше. Для определения количества связанного FVIII в каждую лунку добавляли по 200 мкл раствора ТМВ и инкубировали ровно 5 минут при комнатной температуре. Эту реакцию останавливали добавлением в каждую лунку по 50 мкл 1M H_2SO_4 . После 15-минутной инкубации при комнатной температуре оптическую плотность каждой лунки измеряли при 450 нм с помощью планшетного ридера POLARstar Omega (BMG LABTECH, Ортенберг, Германия).

Результаты ELISA рассчитывали с помощью программного обеспечения MARS (BMG Labtech). На первом этапе все лунки корректировали относительно холостого показания и вычисляли среднее значение дубликатов. После этого применяли 4-параметрическую подгонку кривой для определения концентрации по калибровочной кривой. В соответствии с этой калибровочной кривой определяли количество антигена FVIII в каждой лунке, и значения корректировали с помощью коэффициента разбавления, в результате чего получали количество антигена FVIII в каждом образце. Поскольку уровень детектирования AD2CD2_SC и AD2CD2-19M_SC в присутствии альбумина снизился, определяли поправочный коэффициент путем введения используемого раствора в плазму мини-свиней и оценки снижения уровня детектирования FVIII:Ag. Полученный поправочный коэффициент применяли для расчета конкретных концентраций, используемых для дальнейшей фармакокинетической оценки.

Анализ альбумин-связывающей способности

20% сывороточный человеческий альбумин (HSA) разбавляли 1:4000 в PBS. 96-луночные планшеты для ELISA заполняли 100 мкл/лунку разбавленным раствором HSA, и процесс нанесения осуществляли путем инкубации при 37°C и встряхивании при 400 об/мин на термошейкере в течение 2 ч. Планшеты для ELISA промывали 3 раза 300 мкл/лунку промывочного буфера. Стандартный контроль и образцы FVIII с предварительной инкубацией альбумина или без нее разводили Трис/NaCl pH 7,4 до концентрации хромогенной активности 0,5 ЕД/мл и добавляли в количестве 100 мкл/лунку в виде 7-кратного серийного разведения 1:2. Инкубацию выполняли в течение 1 ч при 37°C на термошейкере под крышкой. Тем временем FIXa и FX растворяли вместе в 10 мл водной среды, субстрат (S-2765 и I-2581) растворяли в 12 мл водной среды. После инкубации планшеты с FVIII снова промывали 3 раза промывочным буфером в количестве 300 мкл/лунка. Фосфолипиды и раствор FIXa/FX смешивали в соотношении 1:5, затем добавляли по 50 мкл/лунку этого раствора и инкубировали в течение 5 мин при

37°C. Без стадии промывки в каждую лунку добавляли по 25 мкл CaCl_2 с последующей 5-минутной инкубацией при 37°C. Наконец, добавляли 50 мкл/лунку субстрата и определяли активированный FX-опосредованный оборот субстрата при 405 нм в течение 25 циклов с последующим измерением конечной точки с помощью ридера ELISA.

Анализ vWF-связывающей способности

1 ЕД/мл каждой молекулы FVIII предварительно инкубировали или не инкубировали с 40 мг/мл альбумина в течение 30 минут при комнатной температуре, чтобы стимулировать связывание ABD-альбумин, и анализ для определения vWF-связывающей способности выполняли следующим образом.

Очищенный от плазмы vWF (Biotest AG) разбавляли 0,9% раствором NaCl до концентрации 0,1 ЕД/мл. Нанесение на 96-луночные планшеты для ELISA осуществляли путем переноса 100 мкл этого раствора в каждую лунку с последующей 2-часовой инкубацией при 37°C при встряхивании при 400 об/мин. Лунки промывали 3 раза по 300 мкл промывочного буфера (8 мМ фосфата натрия, 2 мМ фосфата калия, 0,14 М NaCl, 10 мМ KCl, 0,05% твин-20, pH 7,4). Стандарт FVIII (коммерческий rFVIII без vWF) и образцы предварительно разбавляли буфером для разбавления (25 мМ Трис, 150 мМ NaCl, pH 7,4) до концентрации 0,25 ЕД/мл в соответствии с хромогенной активностью и переносили в каждую лунку планшета в виде 7-кратного серийного разведения 1:2 (100 мкл/лунка). Инкубацию выполняли в течение 1 ч при 37°C и при 400 об/мин. Тем временем FIXa и FX растворяли вместе в 10 мл водной среды, субстрат (S-2765 и I-2581) растворяли в 12 мл водной среды. После инкубации FVIII планшеты снова промывали 3 раза промывочным буфером в количестве 300 мкл/лунка. Фосфолипиды и раствор FIXa/FX смешивали в соотношении 1:5, затем добавляли по 50 мкл/лунку этого раствора и инкубировали в течение 5 мин при 37°C. Без стадии промывки в каждую лунку добавляли по 25 мкл CaCl_2 с последующей 5-минутной инкубацией при 37°C. Наконец, добавляли 50 мкл/лунку субстрата и определяли активированный FX-опосредованный оборот субстрата при 405 нм в течение 25 циклов с последующим измерением конечной точки с помощью ридера ELISA.

Вестерн-блот

Электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) в восстанавливающих условиях

Клеточные супернатанты, клеточные лизаты или очищенный материал вариантов FVIII соответствующим образом разбавляли 1x NuPAGE LDS Sample Buffer (4x, Thermo Fisher Scientific, NP0007) и дополнительно разбавляли 1:2 восстанавливающим буфером для образцов. Восстанавливающий буфер для образцов получали путем объединения 2,5 частей буфера для образцов NuPAGE LDS с 1 частью восстановителя для образцов NuPAGE (10x, Thermo Fisher Scientific, NP0004). 20 мкл каждого образца смешивали с 20 мкл восстанавливающего буфера для образцов в 1,5 мл флаконе и нагревали в течение 10 мин при 70°C в термошейкере (Eppendorf). Протеиновый гель NuPAGE 4-12% Bis-Tris (Thermo Fisher Scientific) вводили в систему электрофореза XCell SureLock Mini-Cell

(Thermo Fisher Scientific), а внутреннюю и внешнюю камеры заполняли 1x рабочим буфером NuPAGE MOPS SDS (Thermo Fisher Scientific, NP0001). Во внутреннюю камеру добавляли 500 мкл антиоксиданта NuPAGE (Thermo Fisher Scientific). В гель вводили 10 мкл каждого приготовленного образца и 4 мкл стандарта Precision Plus Protein All Blue (Bio-Rad, 161-0373), разведенного 1/10 в 1x буфере для образцов LDS Sample Buffer. Разделение образцов достигалось прогоном геля при постоянном напряжении 200 В в течение 50-60 мин.

SDS-PAGE в невосстанавливающих условиях

20 мкл клеточных супернатантов, клеточных лизатов или очищенного материала вариантов FVIII предварительно разбавляли 10 мкл буфера для образцов NuPAGE LDS Sample Buffer (4x, Thermo Fisher Scientific, NP0007) и 10 мкл дистиллированной воды или использовали без разбавления. Образцы нагревали в течение 10 мин при 70°C в термошейкере (Eppendorf). Протеиновый гель NuPAGE™ 3-8% Tris-Acetate Protein Gel (Thermo Fisher Scientific) вводили в систему электрофореза XCell SureLock Mini-Cell (Thermo Fisher Scientific), а внутреннюю и внешнюю камеры заполняли 1x трис-ацетатным рабочим буфером с SDS NuPAGE™ (Thermo Fisher Scientific, LA0041). В гель загружали 10 мкл каждого приготовленного образца и 4 мкл стандарта Precision Plus Protein All Blue (Bio-Rad, 161-0373), разведенного 1/10 в буфере для образцов 1x LDS Sample Buffer. Разделение образцов достигалось прогоном геля при постоянном напряжении 150 В в течение 55-70 мин.

Вестерн-блоттинг и детектирование

Для оценки разделенных белков путем детектирования с помощью иммунофлуоресцентного метода образцы переносили на 0,2 мкм нитроцеллюлозную мембрану Odyssey (Li-Cor) или мембрану Amersham Hybond Low Fluorescence из поливинилиденфторида (PVDF) (GE Healthcare Life Sciences) с помощью модуля для блоттинга XCell II (Thermo Fisher Scientific) для полумокрого переноса белка. Мембрану PVDF активировали в метаноле, и затем наносили на гель SDS, тогда как мембрану из нитроцеллюлозы наносили непосредственно на гель SDS. Систему заполняли буфером для переноса NuPAGE (20X, Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкциями производителя. Белковый блоттинг выполняли в течение 1 ч при 30 В. После переноса белка мембрану блокировали в течение ночи при 4°C в блокирующем буфере Odyssey (Li-Cor). Затем мембрану инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре совместно либо с кроличьим моноклональным антителом к фактору VIII (Sino Biological, 13909-R226, 1:1000), либо с мышинным моноклональным антителом к человеческому фактору VIII (Merck, MAB038, 1:2500), либо с 0,0004 мкг/мкл овечьего поликлонального антитела к человеческому фактору VIII:C (Cedarlane, CL20035AP, 1,5000), каждое из которых разводили в блокирующем буфере Odyssey, содержащем 0,05% Твин 20. После инкубации мембрану промывали 4 раза в течение 5 мин в 0,1% PBST. Для детектирования тяжелой и легкой цепей FVIII мембрану инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с 0,067 мкг/мл ослиного антимышиного IRDye 800CW (Li-Cor, 926-32212, 1:15000) и 0,067

мкг/мл ослиного антикроличьего IRDye 680RD (Li-Cor, 926-32212, 1:15000), которые разбавляли блокирующим буфером Odyssey, содержащим 0,05% Твин 20. Альтернативно, ослиное антитело CF680 к овечьему IgG (H&L) (Biotium, 20062-1) использовали при разведении 1:5000 в блокирующем буфере Odyssey для связывания соответствующего первичного антитела. Наконец, мембрану промывали 4 раза по 5 мин в 0,1% PBST, 2 раза по 5 мин в PBS и ополаскивали водой. Мембрану визуализировали с помощью устройства для визуализации Licor Odyssey Imager.

Фармакодинамические исследования

В хвостовую вену самкам мышей с гемофилией А путем однократной внутривенной инъекции вводили факторы свертывания в дозах до 200 ЕД/кг массы тела или контрольный раствор в соответствующих количествах. Через 0,5, 4 или 20 часов после введения дозы анализ кровотока из надрезанной хвостовой вены выполняли следующим образом: животных анестезировали 5% изофлураном в 30% O_2 и 70% N_2O и сразу помещали в положение лежа на грелку при $+37^\circ C$. Надрез хвостовой вены выполняли, как описано Johansen et al., 2016. Haemophilia 22(4):625-631.

Кровотечение контролировали в течение 60 минут, а время кровотечения определяли с помощью секундомера. Отмечали время первичного кровотечения до первой остановки кровотечения. После первичного обескровливания хвост помещали в новую центрифужную пробирку, заполненную предварительно подогретым физиологическим раствором. Если через 15, 30 и 45 минут после травмы у мыши не было кровотечения, хвост вынимали из солевого раствора и рану осторожно протирали дважды смоченным солевым раствором марлевым тампоном в дистальном направлении. Сразу после протирки хвост повторно погружали в солевой раствор. Совокупное время кровотечения всех последующих кровотечений составляет вторичное время кровотечения. Общее время кровотечения определяли в виде суммы времени первичного и всех вторичных кровотечений.

После определения времени кровотечения пробирку центрифугировали при 4140 g при комнатной температуре в течение 3 минут. Супернатант удаляли кроме 1 мл. Клеточный осадок ресуспендировали и содержание гемоглобина определяли методом, аналогичным описанному Elm et al. (2012).

Результаты и обсуждение

Создание и предварительный скрининг нескольких разных слитых белков FVIII-ABD, охватывающих двухцепочечные и одноцепочечные конструкции FVIII, было очень многообещающим в первоначальных экспериментах и было сходным как для одноцепочечных, так и для двухцепочечных остовов.

Слияние ABD между тяжелой и легкой цепью приводило к увеличению образования одноцепочечной молекулы FVIII по сравнению с двухцепочечными формами (данные не показаны).

Представленные в настоящем описании белки FVIII, дополнительно разработанные и созданные, перечислены в таблице 1.

Таблица 1. Структура соответствующих вариантов FVIII с ABD слиянием.

A=A1+a1+A2+a2+усеченный домен В FVIII, C=a3 (необязательно укороченный) + домены A3+C1+C2 FVIII, L=расщепляемый тромбином линкер, G=гибкий глицин-сериновый линкер 1 (G1), D=ABD2,

Название конструкции	Структура	Белок по изобретению?
AD2CD2_SC	ALDGLGDLCLDGLGD_S C	Да
ADLCLD_SC	ADLCLD_SC	Да
AbD2CD2_SC	ALDGLGDLCLDGLGD_S C + Y1699F+Y1683F	Да
AD2CD_SC	ALDGLGDLCLD_SC	Да
ACLD_SC	ACLD_SC	Нет
ADLC_SC	ADLC_SC	Нет
AD2C_SC	AD2C_SC	Нет
ACLDGLGD_SC	ACLDGLGD_SC	Нет
AD2CD2woLG_SC	ADDCDD_SC	Да
AD2CD2woL_SC	AGDGDGCGDGD_SC	Да
ACD4woLG_SC	ACDDDD_SC	Нет
ACL(GD)4_SC	ACLDGDGDGDGD_SC	Нет

Шесть одноцепочечных слитых молекул FVIII-ABD создавали *in silico*, и экспрессию соответствующих конструкций ДНК тестировали либо в клетках HEK293, либо в клетках CAP-T (см. таблицу 2). Поскольку все эти варианты FVIII-ABD экспрессировались, секретировались и были функциональными, судя по результатам измерения хромогенной активности FVIII, все молекулы получали в культуре клеток CAP-T среднего масштаба и успешно очищали в более высоких количествах, чем необходимо для дальнейшей характеристики и ФК (фармакокинетического) анализа.

Таблица 2. FVIII-ABD слитые белки, проанализированные в супернатантах трансфицированных клеток HEK293 или CAP-T. (n/a: недоступно)

Конструкция	Хромогенная активность, [Ед/мл]	Связывающая активность [Ед/мл]	FVIII:Ag [Ед/мл]	Удельная хромогенная активность [%]	Экспрессирующая клеточная линия
ADLC_SC	0,98	0,9	0,47	209	HEK293
ACLD_SC	1,26	0,79	0,72	175	HEK293
ADLCLD_SC	1	0,45	n/a	n/a	HEK293
AD2CD2_SC	1,45	0,35	0,71	204	CAP-T

AD2CD_SC	1,3	0,5	0,48	271	CAP-T
AD2C_SC	2,0	1,0	n/a	n/a	CAP-T
ADLC_SC	0,9	n/a	n/a	n/a	CAP-T
ADLCLD_SC	1,9	n/a	n/a	n/a	CAP-T

Все шесть очищенных FVIII-ABD слитых вариантов были всесторонне охарактеризованы несколькими методами, включая определение антигена FVIII и хромогенной активности, индуцированное Actin FSL свертывание крови, детектирование тяжелых и легких цепей методом вестерн-блоттинга (WB), анализ расщепления тромбином и связывание с vWF и альбумином. В таблице 3 представлен обзор полученных вариантов FVIII-ABD с точки зрения хромогенной и свертывающей активности, а также уровни антигена в конечных растворах. Измерение этих значений показало, что FVIII-ABD слитые белки все еще способны выполнять свою биологическую функцию: связывание фактора IXa и фактора X, приводя к активации последнего. Сравнение удельной хромогенной активности (хромогенная активность/антиген*100) демонстрирует сходство ADLC_SC и ReFacto AF® (109% против 104%). Однако удельная хромогенная активность всех других FVIII-ABD намного выше и колеблется в пределах от 130% до 206%.

Интересно, что результаты свидетельствуют о том, что увеличение количества мотивов ABD в одной молекуле FVIII снижает свертывающую активность, а также способность связываться с vWF. Снижение свертывающей активности может быть вызвано параметрами настройки анализа, которая строго зависит от времени. Это может не отражать свертывающую активность *in vivo*.

Таблица 3 Результаты измерения хромогенной активности FVIII, индуцированной FSL свертывающей активности и уровней антигена. Указанную удельную активность рассчитывали по отношению хромогенной активности к антигену.

Вариант FVIII-ABD	Хромогенная активность, [Ед/мл]	Индуктированное FSL свертывание крови [Ед/мл]	Антиген [Ед/мл]	Удельная активность [%]
ADLC_SC	147	101	135	109
ACLD_SC	150	100	101	149
ADLCLD_SC	128	80	62	206
AD2CD_SC	120	61	92	130
AD2CD2_SC	164	42	96	171
AD2C_SC	112	72	78	144
ReFacto AF®	253	242	243	104

(Контроль)				
------------	--	--	--	--

Вестерн-блоттинг использовали для наблюдения за паттернами тяжелых и легких цепей разных FVIII-ABD слитых молекул по сравнению с ReFacto AF® (данные не показаны). Анализ показал, что, в отличие от ReFacto AF®, варианты FVIII-ABD в основном экспрессировались в виде одноцепочечных молекул.

Активацию вариантов FVIII-ABD исследовали путем прямой инкубации с тромбином при 37°C в течение 8 мин и последующего SDS-PAGE анализа в восстанавливающих условиях с последующим вестерн-блоттингом. Полосы активированных тромбином или необработанных молекул FVIII-ABD показывают, что все молекулы FVIII-ABD активировались тромбином аналогичным для ReFacto AF® образом (данные не представлены).

Связывание варианта ADLCLD_SC с альбумином тестировали с помощью анализа по сравнению с FVIII 6rs-Ref, который продемонстрировал альбумин-связывающую способность (фиг. 1). Избыток несвязанного растворимого альбумина ингибировал связывание с альбумином, иммобилизованным на планшете.

Влияние модификаций ABD и линкера на связывание между FVIII и vWF исследовали в двух условиях: 1. непосредственно, без присутствия альбумина; 2. после 30-минутной предварительной инкубации с физиологическими концентрациями альбумина, способствующими связыванию ABD-альбумин. Как показано на фиг. 2, связывание слитых белков FVIII-ABD с vWF снижается пропорционально увеличению количества мотивов ABD. Однако только один мотив ABD на FVIII не влияет на связывание vWF в отсутствие альбумина, независимо от его положения в молекуле. Когда FVIII-ABD предварительно инкубировали с альбумином, снижение связывания с vWF наблюдали для всех вариантов FVIII-ABD. Это снижение связывания с vWF увеличивалось с увеличением количества доменов ABD, включенных в FVIII.

Для изучения влияния линкеров на продуцирование и функциональность вариантов FVIII-ABD также получали один предпочтительный вариант, AD2CD2_SC (I) без каких-либо линкеров между FVIII и доменами ABD (AD2CD2woLG_SC) и (II) с линкерами G1, но без расщепляемых тромбином линкеров L (AD2CD2woL_SC). Эти варианты сравнивали с двухцепочечным FVIII 6rs-Ref (аминокислотная последовательность ReFacto), одноцепочечным остовом FVIII AC_SC и двумя вариантами FVIII-ABD, имеющими четыре С-концевых домена ABD либо без каких-либо линкеров (ACD4woLG_SC), либо с одним расщепляемым тромбином линкером, за которым следовали четыре домена ABD, разделенные линкерами G1 (ACL(GD)4_SC).

Соответствующие плазмиды, кодирующие разные варианты FVIII, нуклеофицировали в клетки CAP-T, и супернатанты 4-дневных клеточных культур тестировали на хромогенную активность FVIII, свертывающую активность FVIII и уровни антигена FVIII в соответствии с описанными выше методами. Как показано на фиг. 3, AD2CD2woLG_SC, ACD4woLG_SC и ACL(GD)4_SC экспрессировались только в небольших количествах, их хромогенная активность была сильно снижена.

AD2CD2woLG_SC не экспрессировался в больших количествах, но имел некоторую удельную хромогенную активность. Ни у одного из этих вариантов не наблюдали свертывающей активности FVIII. По сравнению со всеми другими контролями, AD2CD2_SC и AD2CD2woL_SC продемонстрировали хорошие уровни антигена FVIII и высокую хромогенную и свертывающую активность FVIII, что дало превосходные значения удельной хромогенной активности, составляющей приблизительно 200% или более. AD2CD2_SC показал особенно высокую удельную свертывающую активность.

Анализ методом вестерн-блоттинга, основанный на разделении этих вариантов с помощью SDS-PAGE в невозстанавливающих условиях, показан на фиг. 4. За исключением FVIII брс-Ref, все другие варианты в основном представлены в виде однопепочечных молекул FVIII. Однако AD2CD2woLG_SC и AD2CD2woL_SC склонны образовывать мультимеры или агрегаты, чего не наблюдается для варианта AD2CD2_SC.

3. Фармакокинетические эксперименты

Очистку вариантов FVIII ABD выполняли для экспериментов *in vivo* на основе супернатантов трансфицированных клеток CAP-T с помощью сильно анионообменной хроматографии и аффинной хроматографии.

Для изучения влияния введенных в молекулы FVIII мотивов ABD на увеличение периода полувыведения выполняли два фармакокинетических (ФК) исследования на мышах с гемофилией А. Использовали по 12 мышей на каждый тестируемый элемент, по 2 или 3 на каждый момент времени. Все молекулы FVIII-ABD вводили в единичной дозе 200 ЕД/кг массы тела (6 мл/кг) путем однократной внутривенной инъекции в хвостовую вену самкам мышей с гемофилией А (B6, 129S4-F8<tm1Kaz>/J). Образцы плазмы, взятые через 0,5, 4, 8, 12 и 20 часов (и 24 часа) после инъекции, анализировали на хромогенную активность FVIII и уровни антигена в цитратной плазме, которую затем экстрагировали центрифугированием. Образцы плазмы хранили при -80°C и анализировали на антиген FVIII и хромогенную активность. ReFacto AF® тестировали в качестве контроля наряду с вариантами FVIII-ABD.

Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 Вычисленное значение $t_{1/2}$ для вариантов FVIII-ABD. *Данные AD2C_SC имели сильный разброс. $t_{1/2}$ указано в часах

Вариант FVIII-ABD	Антиген: $t_{1/2}$	Хромогенная активность: $t_{1/2}$
Исследование 1		
ACLD_SC	4,8	4,3
AD2CD_SC	4,3	5,0
AD2CD2_SC	14,5	9,4
ReFacto® (контроль)	5,7	4,1
Исследование 2		

ADLC_SC	7,8	6,8
ADLCLD_SC	10,4	10,5
AD2C_SC*	13,0	6,1
ReFacto® (контроль)	7,0	6,8

Таким образом, с помощью фармакокинетических исследований на мышах с гемофилией А были идентифицированы предпочтительные белки FVIII по изобретению, время полувыведения которых увеличено в 2,5 раза (например, ADLCLD_SC - примерно в 1,5 раза; AD2CD2_SC - примерно в 2,5 раза). Фармакокинетику AbD2CD2_SC тестировали в отдельном исследовании, которая была аналогичной AD2CD2_SC.

Отмечено, что удлинение периода полувыведения может даже оказаться недооцененным при использовании мышинной модели гемофилии А из-за несоответствия мышинового и человеческого альбумина (период полувыведения мышинового альбумина составляет всего около двух дней). Тем не менее, наблюдаемый относительно продолжительный период полувыведения белков FVIII по изобретению уже позволяет потенциально сократить внутривенную инъекцию FVIII пациентам с гемофилией с 2-3 дней до режима дозирования один раз в неделю.

Помимо этого, выполняли фармакокинетическую проверку обоснованности концепции на мышах Tg32 с дефицитом альбумина, нокаутных по мышинному альбумину и экспрессирующих α-цепь человеческого FcRn вместо мышинной (B6.Cg-Albem12Mvw Fcgrttm1Dcr Tg(FCGRT)32Dcr/MvwJ). Эта мышинная модель (Alb-/mFcRn-/hFcRn+) отличается от мышей с гемофилией А демонстрирует ситуацию, более близкую к человеческой, поскольку инъецированный человеческий альбумин имеет период полувыведения приблизительно 20 дней, что соответствует периоду полувыведения у человека. Внутривенную инъекцию FVIII (AD2CD2_SC; ReFacto AF®) выполняли в дозе 200 ЕД/кг (на основании хромогенной активности) плюс 1% человеческого альбумина.

Результаты, показанные на фиг. 5, продемонстрировали увеличение периода полувыведения AD2CD2_SC по сравнению с ReFacto AF® примерно в 4 раза, что позволяет потенциально сократить в/в инъекцию FVIII пациентам с 2-3 дней до режима дозирования один раз 8-12 дней.

Фармакокинетическое исследование также выполняли на геттингенских мини-свиньях. Трём животным в группе вводили либо (I) ReFacto AF+1% человеческий сывороточный альбумин (HSA), (II) ReFacto AF+10% HSA, (III) AD2CD2_SC+1% HSA, либо (IV) AD2CD2_SC+10% HSA в дозе 30 ЕД антигена FVIII/кг массы тела через ушную вену. Образцы крови брали до введения дозы, через 4, 12, 36, 48 и 120 ч после введения, и сразу выделяли цитратную плазму путем центрифугирования. Биоаналитическое измерение образца выполняли методом ELISA, используя антиген FVIII, который является специфическим для человеческого FVIII, и FVIII свиньи не детектируется. Оценка с помощью некомпартментного анализа (фиг. 6) позволила получить периоды полувыведения для (I) ReFacto AF+1% HSA - 7,1 ч, (II) ReFacto AF+10% HSA - 6,4 ч, (III)

AD2CD2_SC+1% HSA - 18,6 ч и (IV) AD2CD2_SC+10% HSA - 20,7 ч. Таким образом, в этой модели для AD2CD2_SC наблюдали приблизительно 3-х кратное увеличение периода полувыведения по сравнению с ReFacto AF.

Кроме того, выполняли фармакодинамические исследования. Мышам с гемофилией А (Jackson № B6; 129S4-F8<tm1Kaz>/J) и контрольным мышам (Jackson № C57BL/6NCrl) внутривенно вводили вариант FVIII (ReFacto®, Elocate®, AD2CD2_SC, ADLCLD_SC) или контрольный раствор (Vehicle Control, 0,9% NaCl) в дозе 200 ЕД/кг (на основе хромогенной активности FVIII) и анализировали потерю веса за счет кровотечения, время кровотечения и количество гемоглобина по OD550. Для анализа активности FVIII брали дополнительные образцы плазмы (0,5 ч р.а. путем ретроорбитального забора, после эксперимента). Как показано на фиг. 7, все белки FVIII по изобретению уменьшают общее время кровотечения и кровопотерю, как и у контрольных мышей, что указывает на функциональность AD2CD2_SC и ADLCLD_SC *in vivo*.

4. Создание деиммунизированных белков FVIII

Первоначальный анализ *in silico* пептидов человеческого FVIII, связывающихся с МНС класса II (Т-клеточные эпитопы), выполняли с помощью инструментов EpiMatrix (EpiVax, Провиденс, Род-Айленд, США), которые позволяют предсказать эффективность связывания в отношении панели из восьми общих аллелей супертипа II класса (DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*0801, DRB1*1110, DRB1*1301, DRB1*1501), охватывающих большую часть человеческой популяции (>90%), и алгоритм ClustiMer для идентификации предполагаемых кластеров Т-клеточных эпитопов (установленных иммуногенных кластеров). Анализ выполняли для последовательности FVIII SEQ ID NO: 60 (FVIII-6rs), включающей 1514 аминокислот, исключая 19 аминокислот сигнальной последовательности и 818 аминокислот В-домена. Исключенные аминокислоты В-домена не интерферировали ни с фуриновым, ни с тромбиновым сайтом расщепления. Инструменты *in silico* позволили выявить в общей сложности 52 кластера иммуногенных пептидов с оценкой кластера от 4 до 34, что указывает на очень высокое сродство связывания при высоких значениях и более низкое сродство при низких значениях. Кластеры включали от 14 до 22 аминокислот, а некоторые кластеры перекрывались несколькими аминокислотами.

Для 12 из 52 кластеров были исключены мутации аминокислот либо из-за интерференции с областями, важными для связывающей активности или стабильности, либо из-за отсутствия возможных замен. Для деиммунизации оставшихся 40 кластеров было отобрано 74 мутации. Заменяемые аминокислоты предпочтительно были основаны на заменах, происходящих естественным образом у других видов. Если естественные замены отсутствовали, замены аминокислот выбирали из матриц точечных принятых мутаций (РАМ), которые содержат мутации, возникшие в результате естественного отбора. В частности, на основе матриц РАМ замены N независимо выбирают из группы, состоящей из D, H, S; замена I представляет собой T; где замены S независимо выбирают

из группы, состоящей из A, N, G, T; замены L независимо выбирают из группы, состоящей из N и Q; замены V независимо выбирают из группы, состоящей из A и T; замены Y независимо выбирают из группы, состоящей из N и H; замены F независимо выбирают из группы, состоящей из H и S; замены K независимо выбирают из группы, состоящей из N, D, E, Q, S и T; замены R независимо выбирают из группы, состоящей из Q, H и S; замены M выбирают из группы, состоящей из R, Q, K и T; и/или замены Q выбирают из группы, состоящей из R, D, E, H и K.

Для некоторых кластеров было указано до трех мутаций, каждая из которых приводила к сильному снижению оценки кластера. В этих случаях для включения отбирали все мутации. В случае, если дополнительная мутация приводила только к небольшому снижению оценки, эту мутацию отбрасывали. Кроме того, мутации в пяти кластерах были полностью исключены, поскольку общая оценка кластера уже была низкой, и прогнозируемое улучшение за счет мутаций было незначительным. Эти критерии исключения привели к сокращению с 74 до 57 мутаций, подлежащих включению в (BDD)-FVIII с удаленным В-доменом:

N79S, I80T, I105V, L107N, S112T, L160S, L171Q, V184A, F214H, N233D, L235F, V257A, I265T, N299D, I310T, F312S, Y426H, Y430H, L481N, F484S, L505N, S507E, L548N, F555H, I610T, N616E, F627H, I632T, Y657D, M701K, L706N, Y748S, N754D, F1710H, F1794H, K1837E, R1936Q, F1937H, L1963Q, S2030A, S2037G, N2038D, S2077G, M2123K, S2125G, Y2134H, Y2167N, F2215H, K2226Q, F2253H, K2258Q, V2276A, F2279H, V2313A, S2315T, V2333A, Q2335H.

Таблица 6: Иммуногенные кластеры, идентифицированные в FVIII

SEQ ID NO:	Кластер	Мутация	Исходная оценка кластера	Оценка кластера с мутацией	Примечание
74	DHLEFNIAKPRPPWMG	N79S	7,95	-5,77	
		I80T	7,95	-5,77	
75	YDTVVITLKNMASHPVSL	I105V	30,62	2,57	
		L107N	30,62	2,57	
		S112T	30,62	2,57	
76	VWQVLKENGPMASDPL	L160S	7,03	-3,12	
77	SDPLCLTYSYLSHVDLVK	L171Q	9,95	-1,25	
78	HVDLVKDLNSGLIGAL	V184A	12,53	3,48	
79	TQTLHKFILLFAVFDEGK	F214H	13,64	-0,24	
80	GKSWHSETKNSLMQD	N233D	7,29	-3,96	
		L235F	7,29	-3,96	
81	MHTVNGYVNRSLPGLIG	V257A	13,7	-1,99	

		I265T	13,7	-1,99	
82	GHTFLVRNHRQASLEIS	N299D	14,01	-0,37	
83	ISPITFLTAQTLLMDLG	I310T	25,2	12,74	
		F312S	25,2	-2,07	Оценка в комбинации с I310T
84	DRSYKSQYLNNGPQRIGRK	Y426H	14,68	-5,13	
		Y430H	14,68	-5,13	
85	GDTLLIIFKNQASRPYNIY	L481N	30,49	4,94	
		F484S	30,49	4,94	
86	ITDVRPLYSRRLPKG VKHL	L505N	16,09	-4,74	
		S507E	16,09	-4,74	
87	PRCLTRYYSFVNMERDLAS GL	L548N	19,1	-0,74	
		F555H	19,1	-0,74	
88	TENIQRFLPNPAGVQLED	I610T	17,73	-6,49	
		N616E	17,73	-6,49	
89	PEFQASNIMHSINGYVFDS	F627H	12,7	-3,78	
		I632T	12,7	-3,78	
90	EVAYWYILSIGAQTDFL	Y657D	17,4	-3,84	
91	ETVFMSMENPGLWIL	M701K	16	0,45	
		L706N	16	0,45	
92	ISAYLLSKNNAIEPRS	Y748S	24,24	-2,62	
		N754D	24,24	-2,62	
93	PRSFQKKTRHYFIAA	F1710H	6,3	-2,28	
94	MVTFRNQASRPYSFY S	F1794H	13,23	-4,73	
95	KTYFWKVQH HMAPTKD	K1837E	8,59	-1,3	
96	DPTFKENYRFHAI NGYIMDT L	R1936Q	17,3	7,72	
		F1937H	17,3	-7,05	Оценка в комбинации с R1936Q
97	DQRIRWYLLSMG SNENIHS	L1963Q	18,81	1,99	
112	GEHLHAGMSTLFLVYS	S2030A	-0,9	-4,6	
98	MSTLFLVYSNKCQTPL	S2037G	14,83	-4,83	
		N2038D	14,83	-4,83	

99	PKLARLHYSGSINAWSTKE	S2077G	11,91	-3,34	
100	SSLYISQFIIMYSLDGKKW	M2123K	16,48	0,93	
		S2125G	16,48	0,93	
101	GKKWQTYRGNSTGTLMVF	Y2134H	13,52	-0,14	
102	IARYIRLHPHTHSIRST	Y2167N	9,4	1,07	
103	SSYFTNMFATWSPSK	F2215H	4,91	-5,77	
104	KARLHLQGRSNAWRPQV	K2226Q	6,51	-2,05	
105	WLQVDFQKTMKVTGVTT	F2253H	6,29	-0,57	
		K2258Q	6,29	-5,68	
106	TSMYVKEFLISSSQDGHQW	V2276A	16,48	-3,59	Оценка в комбинации с F2279H
		F2279H	16,48	2,33	
107	QDSFTPVVNSLDPPLLTRY	V2313A	8,19	-5,41	
		S2315T	8,19	-3,3	
108	PQSWVHQIALRMEVL	V2333A	9,56	-1,52	
		Q2335H	9,56	-1,52	

Мутаций вводили в три раунда. В то время как в первом раунде вводили только одиночные мутации, второй и третий раунды включали комбинацию успешно введенных одиночных мутаций из первого раунда. Для каждого раунда наиболее важным показателем была коагулянтная активность мутированных вариантов FVIII по сравнению с немутированным контрольным FVIII. Подход показан на фиг. 8.

Для всех вариантов FVIII синтезировали последовательность ДНК, которую клонировали в остов вектора под контролем промотора EF-1a. Для уменьшения размера синтезированных фрагментов в последовательность FVIII были интегрированы три дополнительных сайта рестрикции посредством молчащих мутаций. Последовательность уже содержала сайты рестрикции в начале (HindIII) и в конце (XbaI) последовательности FVIII, предназначенной для клонирования в остов. Один дополнительный сайт рестрикции (BamHI) появился естественным образом после удаления последовательности В-домена. Это привело, в комбинации с тремя дополнительными сайтами рестрикции (KpnI, XmaI и EcoRI), к молекуле FVIII с шестью уникальными сайтами рестрикции. В результате это привело не только к укорочению синтезируемых последовательностей, но также к созданию модульной системы, упрощающей комбинирование мутаций. Молекула FVIII, полученная из последовательности с шестью сайтами рестрикции, была эталонной молекулой для всех проводимых экспериментов и была названа FVIII-6rs. Аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 60. Выбор триплетов оснований для новых аминокислот был основан на таблице использования человеческих

кодонов. Для аминокислоты выбирали триплет оснований, наиболее часто используемый в геноме человека.

Все мутации были протестированы с целью определения, приводят ли отдельные замены к функциональным молекулам FVIII. Варианты FVIII, содержащие одиночные мутации, получали в небольшой культуре HEK293-F. Клетки HEK293-F трансфицировали в повторах для каждой конструкции FVIII в нуклеокуветах. Трансфицированные клетки культивировали в течение 4 дней. После культивирования супернатант, содержащий FVIII, собирали центрифугированием. Коагулянтную активность FVIII в супернатанте анализировали хромогенным методом в двух повторах, как описано здесь. Оставшийся супернатант замораживали до проведения анализа ELISA с антигеном FVIII. Для сравнения результатов коагулянтной активности для разных конструкций из разных дней трансфекции клетки HEK293-F дополнительно трансфицировали эталонным вектором, кодирующим FVIII-6rs. Поэтому коагулянтную активность FVIII для каждого варианта не указывали в ед/мл, а рассчитывали относительную коагулянтную активность, указывающую коагулянтную активность варианта относительно FVIII-6rs того же дня трансфекции.

На фиг. 9 показана относительная коагулянтная активность вариантов с одной мутацией, локализованной в домене FVIII. Анализ показал, что только восемь мутаций привели к полной потере коагулянтной активности FVIII в супернатанте клеточной культуры. Одна из них, L1963Q, представляла собой контрольную мутацию, которая, как известно, приводила к тяжелой гемофилии А. Одиннадцать мутаций приводили к коагулянтной активности FVIII в супернатанте, которая была ниже 50% коагулянтной активности контрольного образца. Таким образом, из дальнейших экспериментов было исключено в общей сумме 19 мутаций из-за низкой коагулянтной активности FVIII или в связи с ее отсутствием. Тем не менее, хотя 19 исключенных мутаций были распределены по 16 иммуногенным кластерам, только десять иммуногенных кластеров подлежали исключению, поскольку в другие шесть кластеров были успешно включены дополнительные мутации. Остальные 38 мутаций привели к вариантам FVIII с коагулянтной активностью, которая была по меньшей мере эквивалентна половине коагулянтной активности FVIII-6rs. В дополнение к коагулянтной активности определяли значения антигена вариантов FVIII, и результирующую удельную коагулянтную активность (фиг. 10). Поскольку удельная коагулянтная активность представляет собой отношение хромогенной коагулянтной активности FVIII к антигену FVIII, 100% означало, что величина коагулянтной активности FVIII была эквивалентной количеству антигена FVIII. Однако большинство значений превышало 100%. Более высокие значения могут указывать на улучшение коагулянтной активности вариантов. Из 38 активных вариантов FVIII 35 продемонстрировали удельную коагулянтную активность, составляющую по меньшей мере 100%. Удельная коагулянтная активность трех оставшихся вариантов была ниже 100%, но выше 70%, что указывает на наличие неактивной фракции продуцируемого FVIII. У пяти из исключенных вариантов FVIII удельная коагулянтная активность была

ниже 70%, причем у трех из них значения даже были ниже 25%, указывая на то, что большая часть секретируемого FVIII является неактивной. В отличие от этого, у шести из исключенных вариантов удельная коагулянтная активность была высокой, выше 100%, что предполагало наличие активного FVIII, но с пониженной секрецией. Для всех восьми вариантов без коагулянтной активности FVIII, что дало удельную коагулянтную активность, равную 0%, антиген FVIII также не был обнаружен.

Это указывало на то, что введенные мутации приводили либо к отсутствию продуцирования, либо к отсутствию секреции вариантов FVIII.

В этом первом раунде отбора 38 одиночных замен (N79S, I80T, I105V, S112T, L160S, L171Q, V184A, N233D, L235F, V257A, I265T, N299D, Y426H, Y430H, L505N, S507E, F555H, I610T, N616E, I632T, L706N, Y748S, N754D, K1837E, R1936Q, S2030A, S2037G, N2038D, S2077G, M2123K, S2125G, F2215H, K2226Q, K2258Q, V2313A, S2315T, V2333A, Q2335H) привели к функциональной молекуле FIII со значительной коагулянтной активностью (по меньшей мере эквивалентной половине коагулянтной активности FVIII-6rs).

Были протестированы пять дополнительных одиночных мутаций (S660G, I658T, N1796D, N2137H, I2168T). Эти мутации были предложены для четырех иммуногенных кластеров, которые должны были быть исключены в первом раунде скрининга из-за нефункциональных мутированных вариантов. Эти пять мутаций изначально не были протестированы, так как они имели более низкое рассчитанное влияние на снижение иммуногенности. Однако анализ вариантов выявил только низкую коагулянтную активность FVIII или ее отсутствие в супернатанте, хотя удельная коагулянтная активность трех вариантов составила примерно 100%. Тем не менее, мутации не были перенесены на второй раунд скрининга, так как коагулянтная активность была довольно низкой, превышала 50%-й предел только на примерно 10% для I658T и N2137H.

Хотя все 38 успешно введенных одиночных мутаций имели характеристики, позволяющие их перенести во второй раунд скрининга, для каждого иммуногенного кластера была отобрана только одна мутация, чтобы сохранить возможность комбинирования одиночных мутаций. Следовательно, мутация, приводящая к более низкой коагулянтной активности FVIII, исключалась. Кроме того, было обнаружено, что мутация S2030A не является частью кластера, содержащего S2037G и N2038D, а является частью предшествующего кластера. Поскольку вычисленная оценка этого кластера уже была очень низкой без мутации, S2030A также был исключен. Это дало 25 мутаций, которые были перенесены во второй раунд скрининга.

Во втором раунде скрининга было отобрано 25 из 38 мутаций (N79S, S112T, L160S, L171Q, V184A, N233D, I265T, N299D, Y426H, S507E, F555H, N616E, I632T, L706N, Y748S, K1837E, R1936Q, N2038D, S2077G, S2125G, F2215H, K2226Q, K2258Q, S2315T, V2333A).

Была предпринята попытка моделирования *in silico* вариантов FVIII, включающих мутации, но она не увенчалась успехом из-за отсутствия полной кристаллической

структуры FVIII с достаточно высоким разрешением. Авторы изобретения решили объединить функциональные одиночные мутации в небольшие группы, чтобы сохранить идентификацию мутаций, которые приводят к неактивному белку в комбинации с другими мутациями. Для каждого участка (определяемого сайтами рестрикции) создавали один вектор, содержащий все мутации, которые давали варианты FVIII с относительной коагулянтной активностью выше 50%. Кроме того, был создан один вектор, содержащий только те мутации, которые приводили к относительной коагулянтной активности выше 80% и снижали показатель иммуногенности для кластера не менее чем на 15 баллов. Для участков A1A2 и A2 был сконструирован только один вектор, так как все мутации имели относительную коагулянтную активность выше 80% и снижали показатель более чем на 15 баллов. На основании этого были получены варианты FVIII, содержащие замены в следующих положениях, как показано в таблице 7.

Таблица 7

Участок	Количество мутаций	Относительная коагулянтная активность одиночных мутаций	Мутации
A1	4	>80%	N79S, S112T, N233D, I265T
A1	7	>50%	N79S, S112T, L160S, L171Q, V184A, N233D, I265T
A1A2	3	>80%	N299D, Y426H, S507E
A2	5	>80%	F555H, N616E, I632T, L706N, Y748S
A3C1C2	6	>80%	N2038D, S2077G, S2125G, K2258Q, S2315T, V2333A
A3C1C2	9	>50%	R1936Q, N2038D, S2077G, S2125G, F2215H, K2226Q, K2258Q, S2315T, V2333A

Продуцирование вариантов FVIII осуществляли, как описано для первого раунда. Через четыре дня продуцирования определяли коагулянтную активность FVIII в супернатанте клеточной культуры. Коагулянтную активность, сравнимую или даже улучшенную относительно контрольного FVIII-6rs, получили в участках A1 и A1A2 (фиг. 11A). В частности, комбинация трех мутаций в участке A1A2 оказывает положительное влияние на продуцирование и/или секрецию варианта FVIII, приводя к более чем двукратному увеличению количества секретируемых активных FVIII-6rs. Благодаря хорошей коагулянтной активности семь мутаций в A1 и три мутации в A1A2 были перенесены в третий раунд. В участке A2 коагулянтная активность варианта FVIII была ниже 80%, а в двух вариантах участка A3C1C2 коагулянтная активность была ниже 40%. Из-за этих результатов мутации, объединенные в A2 и A3C1C2, пришлось дополнительно

проанализировать. Удельная коагулянтная активность для всех комбинаций превышала 100%, что указывало на то, что полученные варианты FVIII были функциональными, за исключением варианта с девятью мутациями в участке A3C1C2 (фиг. 11B). Низкая удельная коагулянтная активность этого варианта указывала на то, что секретиrowался в основном неактивный FVIII.

Для детектирования мутаций в участках A2 и A3C1C2, которые подавляют коагулянтную активность варианта FVIII, создавали две матрицы планирования эксперимента (DOE). Чтобы избежать синтеза векторов со всеми возможными комбинациями мутаций, пять мутаций в участке A2 были смоделированы путем составления плана полуреплики, тогда как шесть мутаций в участке A3C1C2 были проанализированы путем составления дробного 8-ми факторного плана. Помимо уже протестированных вариантов (одиночный мутант, полный мутант и наивный вариант), создавали десять векторов для участка A2 и 14 векторов для участка A3C1C2. Как и ранее, варианты продуцировали в клетках HEK293-F и определяли коагулянтную активность FVIII в супернатанте. Анализ показал, что мутация I632T в участке A2, вероятно, ответственна за снижение коагулянтной активности, так как она встречалась во всех вариантах с коагулянтной активностью ниже 100% (фиг. 5A). Указанный мутант предпочтительно не входит в состав белков по изобретению. В участке A3C1C2 три мутации, N2038D, S2125G и K2258Q, по-видимому, снижали коагулянтную активность FVIII (фиг. 12B). Однако очевидное влияние на снижение коагулянтной активности было обнаружено только для мутации S2125G, которую предпочтительно не включали в белки по изобретению. Что касается N2038D и K2258Q, то невозможно было четко определить, является ли их влияние результатом комбинации только двух этих мутаций или результатом их комбинации с S2125G.

Удельная коагулянтная активность всех вариантов в участках A2 и A3C1C2 составляла по меньшей мере примерно 100% (данные не показаны), свидетельствуя о том, что сниженная коагулянтная активность FVIII по сравнению с FVIII-6rs, вероятно, связана с проблемами продуцирования или секреции, а не с неактивным FVIII.

На основе результатов, полученных из матриц DOE, создавали один вектор для участка A2 и четыре вектора для участка A3C1C2. В четырех векторах A3C1C2 отсутствовала либо только мутация S2125G, либо мутация S2125G в комбинации с K2258Q или N2038D, либо все три мутации. Включенные мутации в пяти векторах показаны в Таблице 8 ниже.

Таблица 8

Участок	Количество мутаций	Мутации
A2	4	F555H, N616E, L706N, Y748S
A3C1C2	3	S2077G, S2315T, V2333A
A3C1C2	4 (без K2258Q)	N2038D, S2077G, S2315T, V2333A
A3C1C2	4 (без N2038D)	S2077G, K2258Q, S2315T, V2333A

A3C1C2	5	N2038D, S2077G, K2258Q, S2315T, V2333A
--------	---	--

Измерение коагулянтной активности FVIII в супернатанте клеток HEK293-F, трансфицированных разными векторами, показало, что коагулянтная активность варианта с четырьмя мутациями в участке A2 сравнима с коагулянтной активностью FVIII-6rs (фиг. 13A). В отличие от этого, хотя все четыре варианта A3C1C2 были активными, коагулянтная активность вариантов, содержащих пять мутаций и четыре мутации без мутации N2038D, была сниженной по сравнению с FVIII-6rs. Это указывает на то, что исключение только одной мутации N2038D не влияет на продуцирование или секрецию FVIII, поскольку коагулянтная активность оставалась низкой. Напротив, исключение K2258Q приводило к увеличению коагулянтной активности FVIII. Однако, неэффективное в качестве единичной делеции, исключение N2038D в комбинации с K2258Q имело аддитивный эффект и дополнительно улучшило коагулянтную активность варианта FVIII. Тем не менее, комбинация четырех мутаций, все еще содержащая N2038D, была переведена в третий раунд. Это было связано с целью включения множества мутаций и, соответственно, максимального снижения иммуногенности. Кроме того, результаты по коагулянтной активности для этого варианта составили примерно 100% и были аналогичны результатам для комбинаций в других участках. Удельная коагулянтная активность для всех вариантов составила не менее 100%, что свидетельствует о наличии только активного FVIII.

Наконец, второй раунд скрининга дал 19 мутациям, которые можно было объединить в пять участков. В участки A1 и A1A2 может быть включена комбинация всех мутаций из первого раунда. Это было невозможно для участков A2 и A3C1C2. На основании матрицы DOE необходимо было исключить одну мутацию в участке A2 и пять мутаций в участке A3C1C2.

Соответственно, во втором раунде были исключены шесть дополнительных мутаций. Последний раунд скрининга включал одну молекулу FVIII, содержащую все 19 мутаций (N79S; S112T; L160S; L171Q; V184A; N233D; I265T; N299D; Y426H; S507E; F555H; N616E; L706N; Y748S; K1837E; N2038D; S2077G; S2315T; V2333A), оставшихся после раундов скрининга 1 и 2. Было показано, что этот мутантный вариант FVIII функционален в отношении коагуляции и содержит большое количество одиночных замен, что делает молекулу менее иммуногенной.

Благодаря введению 19 мутаций в последовательность FVIII первоначальный показатель иммуногенности FVIII-6rs 7,01 был снижен до -10,55 для FVIII-19M. Показатель иммуногенности указывает на иммуногенность представляющего интерес белка относительно белка со случайной последовательностью. Показатель иммуногенности белка со случайной последовательностью принимают равной 0. Чтобы иметь возможность сравнения показателей разных белков разной длины, показатель дается из расчета на 1000 9-ти мерных пептидов, на которые делит белок для анализа *in silico*. Иллюстративные показатели иммуногенности других белков составляют примерно 23 для столбнячного токсина, 10,03 для Reacto AF, примерно -10 для альбумина или

примерно -42 для Fc-участка IgG.

Поскольку оказалось, что введение мутаций больше всего влияет на участок A3C1C2, для сравнения коагулянтной активности создавали дополнительный вектор без мутаций в участке A3C1C2 (FVIII-15M). Это дало два белка, содержащих в общей сложности 15 (FVIII-15M, SEQ ID NO: 65) и 19 мутаций (FVIII-19M, SEQ ID NO: 63). Для обоих векторов анализ коагулянтной активности FVIII в супернатанте показал коагулянтную активность, по меньшей мере сравнимую с FVIII-6rs. Концентрация секретированного активного FVIII в случае варианта с 15 мутациями была более высокой по сравнению с вариантом с 19 мутациями. Удельная коагулянтная активность составляла примерно 100% для FVIII-15M и выше 100% для FVIII-19M.

Еще один вариант не содержал замену в положении K1837, такую как замена K1837E, которая, по-видимому, снижает коагулянтную активность, но содержал другие замены варианта FVIII-19M. Этот вариант был обозначен FVIII-18M. Он имел примерно такую же удельную коагулянтную активность, что и FVIII-19M, но более высокую хромогенную коагулянтную активность, измеренную в надосадочной жидкости. Можно сделать вывод, что замена K1837E может в определенной степени снижать продуцирование, фолдинг или секрецию FVIII. Однако коагулянтная активность FVIII-18M, применительно к свертывающей активности, также улучшается, поэтому эта замена также может снизить коагулянтную активность. Тем не менее, дальнейшие анализы, описанные ниже, показывают, что FVIII-19M можно использовать в терапевтических целях.

Были получены другие предпочтительные варианты, например белок FVIII FVIII-GOF1 с заменами L171Q, S507E, Y748S и V2333A; и FVIII-GOF2 с заменами L171Q, N299D, N616E и V2333A. Эти варианты включают замены в различных областях, и демонстрируют наилучшие результаты в отношении коагулянтной активности и удельной коагулянтной активности. Следующие варианты включают замены с лучшими результатами в отношении снижения показателя иммуногенности: FVIII-LS1 с заменами S112T, S507E, Y748S, K1837E и N2038D; и FVIII-LS2 с заменами S112T, Y426H, N754D, K1837E и N2038D. Следует отметить, что замены S507E и Y748S очень выгодны в отношении обоих аспектов. Таким образом, предпочтительные белки по изобретению содержат по меньшей мере указанные замены, а также необязательно L171Q и V2333A. Кроме того, оптимальным для снижения иммуногенности является включение всех семи предпочтительных замен в область A1.

На фиг. 14 суммированы данные по хромогенной коагулянтной активности, свертывающей (коагулянтной) активности и удельной коагулянтной активности разных белков фактора VIII, где все конструкции продуцировали в клетках HEK293-F, при этом анализ выполняли в супернатанте клеток. Измеренная относительная коагулянтная активность дана в процентах относительно коагулянтной активности FVIII-6rs, который всегда продуцировали и тестировали параллельно. Удельная коагулянтная активность основана на отношении детектированной хромогенной коагулянтной активности к

антигену, обнаруженному в супернатанте методом ELISA, как описано ниже.

Для дальнейших экспериментов конструкции FVIII-19M и FVIII-6rs продуцировали в клетках CAP-T, что приводило к увеличению массы белка. Затем FVIII-19M и FVIII-6rs очищали из супернатанта клеточной культуры.

Выполняли разные анализы сравнения FVIII-19M с FVIII-6rs, ReFacto AF и Nuwiq с помощью SDS-PAGE и вестерн-блоттинга. Блот показал, что FVIII-19M и FVIII-6rs в основном продуцируются в виде одноцепочечных белков, по сравнению с двумя коммерчески доступными продуктами, которые в основном представляют собой двухцепочечные FVIII. Это различие может быть связано с тем, что для продуцирования используются разные клеточные линии. Два дополнительных вестерн-блоттинга показали, что FVIII-19M и FVIII-6rs являются гликозилированными и сульфатированными, подтверждая, что в клетках CAP-T имели место посттрансляционные модификации. Однако невозможно сделать детальный вывод о том, были ли сульфатированы все шесть тирозинов и какие модели гликозилирования были добавлены.

Время свертывания крови для разных продуктов FVIII определяли методом ROTEM. Во время этого анализа анализировали время свертывания плазмы в зависимости от количества и функциональности примененного FVIII. Продукты FVIII добавляли к плазме с дефицитом FVIII, и свертывание крови инициировалось внутренней системой коагуляции. Измеряли время до начала образования сгустка. При добавлении различных концентраций FVIII было обнаружено увеличение времени свертывания в соответствии со снижением концентрации FVIII. При сравнении разных продуктов ReFacto AF (Pfizer Inc., продуцируется в клетках CHO) и Nuwiq (Octapharma AG, продуцируется в клетках HEK), оба из которых имеют удаленный В-домен, продемонстрировали очень сходное время свертывания крови, тогда как для FVIII-6rs время свертывания было немного больше и еще больше для FVIII-19M (фиг. 15). Однако все значения времени свертывания крови варьировали всего лишь в пределах от 120 секунд до 160 секунд при 1 ЕД/мл FVIII, все еще находясь в нормальном диапазоне времени свертывания 100-240 секунд у здоровых людей.

В анализе образования тромбина (фиг. 16) количество образованного пикового тромбина и время, необходимое для пиковой генерации тромбина, для FVIII-6rs были аналогичными таковым для ReFacto AF и Nuwiq, но в случае FVIII-6rs площадь под кривой была немного меньше. FVIII-19M продемонстрировал значительно более низкие результаты пиковой генерации тромбина, площади под кривой и времени, необходимого для пиковой генерации тромбина, особенно по сравнению с ReFacto AF и Nuwiq. Однако эти результаты были сравнимы с результатами ROTEM, с несколько увеличенным временем свертывания для FVIII-19M.

vWF-связывающую способность FVIII-19M и FVIII-6rs определяли методом ELISA. ReFacto AF использовали в качестве эталона, и эффективность связывания ReFacto AF с vWF устанавливали равной 1. Все другие активности рассчитывали относительно ReFacto AF. Данные показали, что ReFacto AF и Nuwiq имеют аналогичное связывание

vWF, которое нарушено у FVIII-6rs и FVIII-19M (фиг. 17). Однако между Nuwiq и FVIII-19M было обнаружено единственное существенное различие. Пониженное связывание, в том числе у FVIII-6rs, может быть связано с различными посттрансляционными модификациями, происходящими в клетках CAP-T. Это может быть связано со сниженным сульфатированием, обнаруженным в тяжелой и легкой цепях методом вестерн-блоттинга. Отсутствие сульфатирования могло повлиять на связывание vWF, поскольку для связывания vWF сульфатирование Y1683 является особенно важным. Однако снижение сульфатирования не может быть единственной причиной сниженного связывания с vWF, поскольку вестерн-блоттинг не показал наличия сульфатирования у ReFacto AF, который при этом хорошо связывается с vWF. Таким образом, снижение эффективности FVIII-19M по сравнению с FVIII-6rs может быть связано с дополнительными структурными изменениями, происходящими в результате введения мутаций, влияющих на связывание vWF.

Немного более низкая коагулянтная активность FVIII-19M в экспериментах, проведенных для оценки времени свертывания крови, образования тромбина и связывания с vWF, может быть, по меньшей мере частично, объяснена более низкой коагулянтной активностью, измеренной в анализе свертывания по сравнению с хромогенным анализом, поскольку хромогенный анализ может в частности завышать коагулянтную активность FVIII-19M (фиг. 18).

Для анализа иммуногенности белков FVIII использовали два разных подхода:

Оценка иммуногенности

Сниженную иммуногенность молекулы FVIII с 19 одиночными точечными мутациями оценивали методом расчета *in silico*. Начальный показатель иммуногенности молекулы без мутаций был снижен с примерно 7 до примерно -11 для молекулы FVIII с 19 точечными мутациями. Показатели иммуногенности рассчитывали по отношению к белку с рандомизированной последовательностью той же длины, что и анализируемый FVIII.

Показатель иммуногенности, который указывает на иммуногенный потенциал белка, рассчитывали с использованием системы EpiMatrix компании EpiVax. Чтобы иметь возможность сравнивать показатель иммуногенности представляющего интерес белка с показателями других белков, его соотносят с показателем белка с рандомизированной аминокислотной последовательностью. Показатель иммуногенности этого «среднего» белка устанавливают равным нулю. Кроме того, показатель иммуногенности указан из расчета на 1000 пептидов, каждый из которых содержит девять аминокислот. Благодаря этому можно сравнивать белки разной длины. Показатели иммуногенности выше нуля указывают на присутствие избытка лигандов МНС класса II и означают более высокий потенциал иммуногенности, в то время как показатели ниже нуля указывают на присутствие меньшего количества потенциальных лигандов МНС класса II, чем в случайно выбранном белке, и на более низкий потенциал иммуногенности. Считается, что белки с показателем выше +20 обладают значительным иммуногенным потенциалом.

Анализ иммуногенности *in vitro*

Разрабатывали анализ *in vitro* на основе Т-клеток для анализа иммуногенности представляющего интерес белка, такого как FVIII, который основан на дендритных клетках (DC) и обедненных регуляторными Т-клетками CD4⁺ Т-клетках здоровых доноров и стимуляции представляющим интерес белком.

С помощью анализа иммуногенности *in vitro* на основе Т-клеток было показано, что рекомбинантная молекула FVIII-19М менее иммуногенна по сравнению с молекулой FVIII без мутаций.

Анализ *in vitro* позволяет определить, активируется ли меньшее количество Т-клеток из-за присутствия меньшего количества пептидов FVIII-19М на поверхности DC. Анализ включает DC, полученные из моноцитов и CD4⁺CD25⁻ Т-клеток. Перед совместным культивированием популяцию клеток истощали по CD4⁺CD25⁺ Т-клеткам, поскольку эта субпопуляция состояла в основном из регуляторных Т-клеток. Это было важно, поскольку ожидалось, что популяция Т-клеток, полученная от здоровых доноров, а также толерантных пациентов с гемофилией А, будет содержать регуляторные Т-клетки, подавляющие FVIII-специфические Т-клетки, которые не истощаются в течение онтогенеза (Kamate, C., Lenting, P. J., van den Berg, H. M. & Mutis, T. Depletion of CD4⁺/CD25^{high} regulatory T cells may enhance or uncover factor VIII-specific T-cell responses in healthy individuals. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 5, 611-613 (2007)). Поскольку целью анализа была стимуляция FVIII-специфических Т-клеток, осуществляли истощение по регуляторным Т-клеткам. Подход с использованием DC в качестве APC был выбран по двум причинам. С одной стороны, основное внимание уделялось активации CD4⁺ Т-клеток на основе взаимодействия с презентируемыми эпитопами FVIII. Влияние из-за взаимодействия с другими иммунными клетками могло исказить результаты. С другой стороны, анализ также можно проводить с клетками, полученными от пациентов с гемофилией А. Эти пациенты, особенно пациенты с гемофилией А, ранее не получавшие лечения, могут все еще иметь наивные Т-клетки, и активация наивных Т-клеток будет в основном опосредована DC.

Как показано на фиг. 20, моноциты очищали от размороженных PBMC и дифференцировали в незрелые DC (iDC) с использованием IL-4 и GM-CSF, например, через 5 дней. Клетки стимулировали, например, в течение 1 дня цитокинами (например, IL-Mix, как определено ниже) и антигеном, например, представляющим интерес FVIII, для получения зрелых DC (mDC). CD4⁺CD25⁻ Т-клетки очищали от PBMC за два дня до совместного культивирования с mDC. После очистки CD4⁺CD25⁻ Т-клетки метили CFSE (сукцинимидиловым эфиром диацетата карбоксифлуоресцеина) и культивировали в течение 2 дней в присутствии IL-2, чтобы они восстановились после процесса очистки и мечения. mDC и меченые CD4⁺CD25⁻ Т-клетки совместно культивировали, например, в течение 9 дней. Т-клетки собирали и анализировали с помощью проточной цитометрии.

Анализ DC-Т-клеток выполняли с FVIII-19М и FVIII-6rs. Клетки очищали от PBMC здоровых доноров. DC стимулировали после дифференцировки, используя либо только предварительно определенный IL-Mix, либо IL-Mix с дополнительным белком.

Дополнительным белком был ReFacto AF в качестве положительного контроля пролиферации FVIII-специфических Т-клеток, а также FVIII-6rs и FVIII-19M в качестве представляющих интерес белков. Концентрация продуктов FVIII составляла 15 ЕД/мл, чтобы гарантировать наличие достаточного количества FVIII. Совместное культивирование осуществляли в 48-луночных планшетах, что приводило к соотношению DC:Т-клеток не менее 1:10. Все клетки анализировали с помощью проточной цитометрии после их очистки для обеспечения чистоты, а Т-клетки анализировали до совместного культивирования, чтобы исключить предварительную активацию, и через 9 дней совместного культивирования. Результаты анализа Т-клеток методом проточной цитометрии через 9 дней совместного культивирования дополнительно анализировали. Для каждого подхода определяли пролиферацию всех CD4⁺ Т-клеток.

Всего было проанализировано 23 разных здоровых донора. Для окончательного анализа были исключены доноры, у которых на DC, обработанные только IL-Mix, наблюдался более высокий Т-клеточный ответ, чем на DC, обработанные IL-Mix и FVIII, а также доноры, у которых жизнеспособность Т-клеток заметно различалась при стимуляции разными белками FVIII. Поскольку не все здоровые люди имеют Т-клетки против FVIII, ожидалось, что не все здоровые доноры будут реагировать на FVIII. На основании этого отбора были проанализированы результаты 10 здоровых доноров.

На фиг. 21 показано различие между пролиферацией CD4⁺ Т-клеток в ответ на DC, стимулированные IL-Mix плюс FVIII-19M, и пролиферацией CD4⁺ Т-клеток в ответ на DC, стимулированные IL-Mix и FVIII-6rs. Результаты ниже 0 указывают на сниженный ответ Т-клеток на FVIII-19M по сравнению с FVIII-6rs. Этот сниженный ответ был обнаружен у большинства доноров. Однако у небольшого количества доноров результаты были выше 0. Несмотря на это, различия в пролиферации у этих доноров были ниже 10%, тогда как более высокие различия были обнаружены в группе доноров, демонстрирующих сниженный ответ на FVIII-19M. В целом, количество доноров со сниженным ответом на FVIII-19M, было больше, который приводил к значительному снижению пролиферации CD4⁺ Т-клеток в ответ на DC, стимулированные IL-Mix и FVIII-19M. Эти результаты анализа DC-Т-клеток *in vitro* подтвердили снижение пролиферации CD4⁺ Т-клеток в ответ на деиммунизированный вариант FVIII, содержащий мутации 19 аминокислот.

Стабильность *in vitro*

Рекомбинантный белок FVIII по изобретению инкубировали в плазме с дефицитом FVIII при 37°C и анализировали коагулянтную активность через разные периоды времени по сравнению с ReFacto AF, Nuwiq и FVIII-6rs. Как показано в Таблице 9, потеря коагулянтной активности была приемлемой для всех анализируемых белков.

Таблица 9: Хромогенная коагулянтная активность белков FVIII, инкубированных в FVIII-дефицитной плазме при 37°C.

Продукт FVIII	Часы	Хромогенная коагулянтная активность в ЕД/мл
---------------	------	---

ReFacto AF	0	1,01
	4	1,06
	8	1,02
	24	0,98
Nuwiq	0	1,10
	4	1,14
	8	1,14
	24	1,07
FVIII-19M	0	1,04
	4	0,92
	8	0,91
	24	0,87
FVIII-6rs	0	1,09
	4	1,04
	8	1,00
	24	0,99

Методы

Анализ in silico

Моделирование Т-клеточного эпитопа in silico (инструменты EpiMatrix) применялось для идентификации пептидов, связывающихся с МНС класса II, кластеризации результатов, сравнения кластеров с другими белками и прогнозирования аминокислотных замен.

Инструменты моделирования, используемые для анализа in silico, коммерчески доступны от EpiVax (Провиденс, Род-Айленд, США). Инструменты позволяют анализировать белковые последовательности для поиска пептидов, связывающиеся с МНС класса II. Эти пептиды дополнительно анализируют на возможность осуществления потенциальных аминокислотных замен с целью уменьшения этого связывания.

Молекула FVIII, используемая для процесса моделирования, представляла собой молекулу фактора VIII с удаленным В-доменом (BDD FVIII), в которой удалены 818 аминокислот В-домена (FVIII-6rs, SEQ ID NO: 60). Процесс моделирования состоял из четырех этапов. На первом этапе с помощью инструмента EpiMatrix белок был разделен на пептиды, состоящие из девяти аминокислот, так называемые 9-мерные пептиды. Это связано с тем, что основная область связывания МНС класса II включает девять аминокислот. 9-мерная последовательность и следующая за ней 9-мерная последовательность перекрывается на восемь аминокислот. При построении этих сильно перекрывающихся 9-мерных последовательностей потенциальные связывающие пептиды не теряются. Связывающую способность всех 9-мерных последовательностей тестировали

в отношении восьми распространенных аллелей супертипа HLA класса II (DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*0801, DRB1*1101, DRB1*1301, DRB1*1501), охватывающих более 90% человеческой популяции (De Groot, A S, MCMURRY, J. & MOISE, L. Prediction of immunogenicity: in silico paradigms, ex vivo and in vivo correlates. *Current Opinion in Pharmacology* 8, 620-626 (2008); Moise, L. et al. Effect of HLA DR epitope de-immunization of Factor VIII in vitro and in vivo. *Clinical Immunology* 142, 320-331 (2012)). Потенциал связывания аллеля HLA каждой 9-мерной последовательности был обозначен «оценкой Z». Эта оценка указывала на силу связывания, нормированную на частоту данного аллеля в популяции (De Groot, Anne S. & Martin, W. Reducing risk, improving outcomes: Bioengineering less immunogenic protein therapeutics. *Clinical Immunology* 131, 189-201 (2009)). A 9-mer with a high Z-score for at least four HLA alleles was regarded as highly immunogenic and called an EpiBar (Weber, C. A. et al. T cell epitope: Friend or Foe? Immunogenicity of biologics in context. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61, 965-976 (2009)).

На следующем этапе перекрывающиеся EpiBars были кластеризованы с помощью программы ClustiMer (Moise, L. et al. Effect of HLA DR epitope de-immunization of Factor VIII in vitro and in vivo. *Clinical Immunology* 142, 320-331 (2012)). Этот анализ привел к кластерам EpiBar, содержащим до 25 аминокислот, связывающихся с МНС класса II, происходящими из нескольких аллелей HLA. Перед оптимизацией этих кластеров был проведен анализ сходства с другими эндогенными белками с помощью программы JanusMatrix. Перекрывание последовательности по меньшей мере двумя другими эндогенными белками приводило к исключению кластера из дальнейшей модификации из-за очень высокой вероятности установления центральной толерантности к обычным эндогенным пептидам. Кроме того, не рассматривали и модифицировали кластеры, включающие сайты расщепления, сайты активации или другие сайты, важные для активности FVIII. На последнем этапе аминокислотную замену вычисляли с помощью OptiMatrix. Этот инструмент позволяет оценить вклад каждой аминокислоты идентифицированного кластера в связывание с МНС класса II (Moise, L. et al. Effect of HLA DR epitope de-immunization of Factor VIII in vitro and in vivo. *Clinical Immunology* 142, 320-331 (2012)). После этого с помощью OptiMatrix вычислили, какие аминокислотные замены снижают сродство связывания с МНС класса II (De Groot, Anne S. & Moise, L. Prediction of immunogenicity for therapeutic proteins: State of the art. *Current Opinion in Drug Discovery & Development* 10, 1-9 (2007)). Эти оптимизации основаны на принципах, согласно которым аминокислотная замена должна быть консервативной, предпочтительно происходить у других видов и не должна быть зарегистрирована в базе данных, содержащей все известные мутации FVIII, приводящие к гемофилии А (Kemball-Cook, G., Tuddenham, Edward GD & Wacey, AI The Factor VIII Structure and Mutation Resource Site: HAMSTeRS Version 4. *Nucleic Acids Research* 26, 216-219 (1998)).

Анализ мутаций

По результатам in silico рекомендуемые замены аминокислот вводили в последовательность FVIII. Каждая мутация молекулы фактора VIII подвергалась

скринингу на коагулянтную активность FVIII. В первом раунде вводили одиночные мутации. Второй и третий раунды включали комбинацию успешно введенных одиночных мутаций из первого раунда. Эталонная молекула представляла собой FVIII-6rs с шестью уникальными сайтами рестрикции. Одиночные мутации (первый раунд) и комбинации мутаций (второй и третий раунды) анализировали после продуцирования (временной трансфекции) в линиях человеческих клеток (HEK293-F), при этом продуцированный и секретируемый белок анализировали в супернатанте клеточной культуры. Коагулянтную активность FVIII анализировали хромогенным и клоттинговым методами. Значения антигена анализировали с помощью ELISA с использованием антигена FVIII. Удельную коагулянтную активность рассчитывали в виде отношение коагулянтной активности к антигену.

В первом раунде из 57 рекомендованных мутаций 19 мутаций были исключены из-за низкой коагулянтной активности FVIII или ее отсутствия. Остальные 38 мутаций привели к вариантам FVIII с коагулянтной активностью, по меньшей мере равной половине коагулянтной активности эталонной молекулы. Для второго раунда было выбрано 25 мутаций, по одной мутации для каждого иммуногенного кластера. Анализировали комбинации мутаций, объединенных в участки (определяемые сайтами рестрикции) (относительная и удельная коагулянтная активность). Дальнейший анализ выполняли на основе матриц DOE.

Крупномасштабное продуцирование рекомбинантных белков осуществляли в клетках CAP-T путем временной трансфекции и последующей очистки (SAEx - сильная анионообменная хроматография - альтернативно TFF - тангенциальная проточная фильтрация, AC - аффинная хроматография с FVIII, замена буфера с помощью SEC - эксклюзионной хроматографии).

Затем выполняли анализ посттрансляционных модификаций и функциональности (вестерн-блоттинг для детектирования тяжелой и легкой цепей FVIII, расщепления тромбином, гликозилирования и сульфатирования, 2D-DIGE и функциональные анализы ROTEM, TGA и vWF-FVIII ELISA).

Пониженную иммуногенность рекомбинантных белков по изобретению подтверждали *in silico* и *in vitro* (DC-T-клеточный анализ).

Трансфекция

Для временной трансфекции использовали эукариотические клеточные системы, а именно клетки CAP-T и клетки HEK. Клетки CAP представляют собой иммортализованную клеточную линию на основе первичных человеческих амниоцитов и растут в суспензии. CAP-T-клетки основаны на исходных CAP-клетках и дополнительно экспрессируют большой Т-антиген обезьяньего вируса 40. CAP-T-клетки особенно пригодны для временной трансфекции. Кроме того, для временной трансфекции использовали клеточную линию HEK 293-F. Клеточная линия HEK 293-F происходит от исходной клеточной линии HEK 293 и адаптирована к выращиванию в суспензии в бессывороточной среде. Клетки HEK использовали для продуцирования разных

мутантных вариантов FVIII в небольших масштабах.

Временную трансфекцию осуществляли с помощью электропорации с использованием коммерчески доступной системы 4D-Nucleofector (Lonza Group Ltd., Базель). Электропорацию осуществляли, используя $7 \cdot 10^6$ клеток HEK293-F и 7 мкг плазмиды FVIII в объеме 100 мкл. $1 \cdot 10^7$ клеток CAP-T использовали для трансфекции 5 мкг плазмиды FVIII в объеме 100 мкл. После трансфекции клетки инкубировали в течение 4 дней. Клетки и супернатант использовали для дальнейшего анализа.

Очистка белка

FVIII-6rs и FVIII-19M продуцировали в клетках CAP-T объемом до 800 мл. Очистку осуществляли непосредственно из супернатанта клеточной культуры с помощью FPLC. Первым этапом была либо тангенциальная поточная фильтрация, либо ионообменная хроматография с использованием сильных анионообменных колонок HiTrap Capto Q (GE Healthcare Europe GmbH, Фрайбург). На этом этапе образец концентрировали, белки клетки-хозяина «теряли» и буфер заменяли. По хроматограмме определяли фракции, содержащие элюированный белок. Второй стадией была аффинная хроматография с использованием колонки, заполненной коммерчески доступной смолой VIIISelect (GE Healthcare Europe GmbH, Фрайбург). Фракции, содержащие элюированный FVIII, определяли по хроматограмме. Последним этапом была замена буфера на буфер для состава FVIII с помощью эксклюзионной хроматографии с использованием колонок HiTrap De-salting (GE Healthcare Europe GmbH, Фрайбург). Фракции, содержащие FVIII, определяли по высокому УФ-пику и стабильному пику электропроводности на хроматограмме. После очистки продукты FVIII концентрировали на центрифужных колонках (Merck Millipore, Darmstadt) с отсечением по молекулярной массе 10 кДа. Все колонки работали в условиях, указанных производителем.

Методы анализа

Если не указано иное, анализ выполняли, как описано выше.

Для детектирования сульфотирозинов в вестерн-блоттинге использовали мышинное антитело к человеческому сульфотирозину (Merck Millipore, Darmstadt). Вторичным антителом было антимышиное антитело осла, связанное с IRDye 800CW. Подготовку выполняли, как описано выше.

Для определения, могут ли варианты FVIII активироваться тромбином, образцы инкубировали с 10 ЕД/мл тромбина в течение 8 минут при 37°C перед SDS-PAGE и вестерн-блоттингом. SDS-PAGE и вестерн-блоттинг выполняли, как описано выше. Первичным антителом для обнаружения FVIII в вестерн-блоттинге было поликлональное овечье антитело к человеческому фактору VIII (Cedarlane, Burlington) для детектирования тяжелой и легкой цепей, и вторичное анти-овечье ослиное антитело, связанное с IRDye 800CW (LI-COR Biotechnology GmbH, Бад-Гомбург).

Функциональные анализы

В анализе образования тромбина (TGA) измеряют количество образовавшегося тромбина. Происходит каскад свертывания, запускаемый тканевым фактором через

внешний путь. В итоге образовавшийся тромбин расщепляет флуорогенный субстрат, который можно измерить при 460 нм. Анализ осуществляли с FVIII, разведенным в FVIII-дефицитной плазме. Анализировали концентрации FVIII до 0,25 ЕД/мл. Реагент TGA C low и субстрат TGA, оба коммерчески доступные от Technoclone (Вена), добавляли в каждую лунку с образцом в соответствии с протоколом производителя. Реагент TGA C low состоит из низких концентраций мицелл фосфолипидов, содержащих рекомбинантный человеческий тканевый фактор, для инициации каскада свертывания крови. Субстрат представляет собой флуорогенный субстрат, окончательно расщепляемый образовавшимся тромбином. Реакцию осуществляли при 37°C в планшетном ридере и измеряли развитие окраски флуорогенного субстрата в течение двух часов. В дополнение к образцам измеряли калибровочную кривую, используя калибровочный набор TGA, также доступный от компании Technoclone (Вена). Количество образовавшегося тромбина рассчитывали по калибровочной кривой. Кроме того, площадь под кривой и время образования максимального количества тромбина рассчитывали на основе первого отклонения построенной кривой.

Также использовали тромбоэластометрию (ТЕМ) с использованием системы ROTEM (Tem International GmbH, Мюнхен) для определения функциональности вариантов FVIII. В этом методе образец наносят на чашку, а в середину чашки вставляют штифт. Образец находится в пространстве между чашкой и штифтом. Штифт вращается, и его вращение контролируется световым лучом, который отражается от штифта на детектор. В начале коагуляции образовавшийся сгусток ограничивает движение штифта до максимума, когда формируется окончательный сгусток. В отличие от TGA, в системе ROTEM свертывание было инициировано через внутренний путь с использованием реагентов in-tem, коммерчески доступных от Tem International GmbH (Мюнхен). Анализировали концентрации FVIII от 1 ЕД/мл до 0,01 ЕД/мл, основанные на хромогенной коагулянтной активности. Реагенты использовали, как описано в протоколе производителя. Все измерения и расчеты выполнялись автоматически системой ROTEM. Наконец, определяли время свертывания крови.

DC-T клеточный анализ in vitro

DC и Т-клетки для анализа in vitro получали из PBMC здоровых доноров. PBMC очищали либо из продуктов лейкофереза, либо из донорской цельной крови здоровых доноров с помощью градиента плотности с использованием Лимфофлот (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). PBMC криоконсервировали при -150°C до момента использования для анализа. Моноциты, а также CD4⁺CD25⁻ Т-клетки очищали с помощью технологии MACS, коммерчески доступной от Miltenyi Biotec (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach). Для очистки моноцитов использовали CD14 микросферы, тогда как для очистки Т-клеток использовали набор для выделения CD4⁺CD25⁺ регуляторных Т-клеток (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach). Очистку моноцитов осуществляли в соответствии с протоколами производителя. Для очистки CD4⁺CD25⁻ Т-клеток двухэтапный процесс, рекомендованный в протоколе производителя, выполняли в одну

стадию, осуществляя отрицательный отбор $CD4^+$ Т-клеток и положительный отбор $CD25^+$ клеток параллельно и используя только одну очистительную колонку. Используемое количество антител соответствовало протоколу, а время инкубации соответствовало этапу отрицательной селекции. Моноциты были первыми клетками, которые были очищены в ходе анализа. После очистки моноциты высевали при концентрации $1 \cdot 10^6$ клеток/мл в среде X-VIVO-15 (Lonza Group Ltd., Базель). Для дифференцировки моноцитов в DC в каждую лунку добавляли гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) с конечной концентрацией 4000 ЕД/мл и 1250 ЕД/мл интерлейкина (IL)-4 (PeproTech, Гамбург). Моноциты культивировали в течение пяти дней при 37°C . Через 4 дня выполняли очистку $CD4^+CD25^-$ Т-клеток. После очистки Т-клетки метили CFSE (BioLegend, Koblenz) в соответствии с Quah et al., Nature Protocols, 2007. Затем очищенные Т-клетки высевали в конечной концентрации $2 \cdot 10^6$ клеток/мл в X-VIVO-15. К клеточной суспензии добавляли IL-2 (PeproTech, Гамбург) в конечной концентрации 20 ЕД/мл. Т-клетки культивировали при 37°C в течение 2 дней. За 24 часа до начала совместного культивирования DC и $CD4^+CD25^-$ Т-клеток DC стимулировали IL-Mix, состоящей из 10 нг/мл IL-1 β , 10 нг/мл IL-6 и 10 нг/мл фактора некроза опухоли (TNF)- α (Miltenyi Biotec GmbH, Бергш-Гладбах) с 15 ЕД/мл FVIII или без него. На следующий день Т-клетки собирали и определяли их количество. В свежей среде X-VIVO 15 устанавливали концентрацию Т-клеток, равной $2 \cdot 10^6$ клеток/мл. Супернатант из лунок, содержащих DC, осторожно удаляли, чтобы не повредить DC. Суспензию Т-клеток вносили в лунки с DC, чтобы достичь соотношения DC:Т-клетки по меньшей мере 1:10. Количество добавляемой суспензии Т-клеток зависело от размера лунки, в которую первоначально высевали DC. Никаких дополнительных цитокинов в среду не добавляли. Клетки совместно культивировали в течение 9 дней при 37°C . После этого Т-клетки собирали и анализировали их пролиферацию с помощью проточной цитометрии.

5. Деиммунизированные белки FVIII по изобретению.

19 деиммунизирующих аминокислотных замен FVIII-19M вводили в слитые молекулы FVIII-ABD на уровне ДНК. Последовательности ДНК создавали *in silico* с помощью VectorNTI (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США), а затем синтезировали полную последовательность FVIII и клонировали в целевой вектор. Трансформация E.coli K12 указанными плазмидами, размножение трансформированных бактерий в условиях селекции ампициллином и получение плазмид позволило получить эти плазмиды в большом количестве. Работы по генной инженерии проводились компанией Thermo Fisher Scientific.

Культивирование клеток CAP-T и экспрессию плазмид, кодирующих FVIII, путем временной трансфекции выполняли, как описано здесь в других разделах. Для проверки уровней экспрессии и функциональности деиммунизированных белков FVIII, слитых с альбумин-связывающими доменами, плазмиды, кодирующие молекулу AD2CD2-19M_SC, деиммунизированный вариант FVIII-ABD, и слитую молекулу AD2CD2_SC, обе из которых включают 4 альбумин-связывающих домена, и контрольный FVIII 6rs-Ref

(последовательность ReFacto), подвергали нуклеофекции в клетки CAP-T. 4-дневные супернатанты клеточных культур тестировали на хромогенную активность FVIII и уровни антигена FVIII в соответствии с описанными выше методами. Как показано на фиг. 22, как хромогенная активность FVIII, так и уровни антигена FVIII были как минимум в 3 раза выше для AD2CD2-19M_SC по сравнению с bgs-Ref. Интересно, что хромогенную активность и уровни антигена FVIII в случае AD2CD2-19M_SC были лучше чем у AD2CD2_SC (хромогенная активность: 2,64 против 1,90 ЕД/мл и антиген FVIII: 2,00 против 1,40 ЕД/мл, соответственно). Удельная хромогенная активность bgs-Ref составила 113%, а AD2CD2_SC и AD2CD2-19M_SC - 136% и 133% соответственно.

Первые фармакокинетические эксперименты *in vivo* выполняли на мышах с гемофилией А (B6, 129S4-F8<tm1Kaz>/J) с материалом FVIII, очищенным аффинной хроматографией, для изучения эффекта продления периода полувыведения AD2CD2-19M_SC. Использовали 12 мышей на каждый тестируемый элемент, по 3 на каждый момент времени. AD2CD2-19M_SC и ReFacto AF (контроль) вводили в разовой дозе 200 ЕД/кг массы тела (7,14 мл/кг) в хвостовую вену самкам мышей в виде однократной внутривенной инъекцией. Образцы крови брали через 0,5, 4, 8, 12 и 20 ч после инъекции, а цитратную плазму экстрагировали центрифугированием. Образцы плазмы хранили при -80°C и анализировали на антиген FVIII и хромогенную активность, как описано. Для фармакокинетической оценки выполняли некомпартментный анализ с помощью Phoenix WinNonlin (Certara USA Inc., США). Средние значения уровней антигена FVIII в зависимости от времени показаны на фиг. 23. Конечные периоды полувыведения 12,45 ч и 11,58 ч для AD2CD2-19M_SC, определенные по хромогенной активности и антигену FVIII, соответственно, основаны на среднем значении отдельных животных. Для сравнения, период полувыведения Reacto AF, измеренный по хромогенной активности, составил 6,48 ч и 6,08 ч, измеренный по антигену FVIII. Таким образом, на этой модели было показано увеличение периода полувыведения примерно в 2 раза. Дополнительная оценка с использованием медианы вместо среднего дала увеличению периода полувыведения примерно в три раза.

Фармакокинетическое изучение молекулы AD2CD2-19M_SC также выполняли на геттингенских мини-свиньях. Трем животным в группе вводили либо (I) ReFacto AF+1% человеческий сывороточный альбумин (HSA), (II) ReFacto AF+10% HSA, (III) AD2CD2_SC+1% HSA, (IV) AD2CD2_SC+10% HSA, (V) AD2CD2-19M_SC+1% HSA, (VI) AD2CD2-19M_SC+10% HSA в количестве 30 ЕД антигена FVIII/кг массы тела через ушную вену. Образцы крови брали до введения дозы, через 4, 12, 36, 48 и 120 ч после введения и сразу выделяли цитратную плазму центрифугированием. Биоаналитическое измерение образца выполняли с помощью адаптированного ELISA с антигеном FVIII, как описано выше. Оценка с помощью некомпартментного анализа (фиг. 24, для ясности показаны только группы II, IV и VI) показала периоды полувыведения для (I) ReFacto AF+1% HSA - 7,1 ч, (II) ReFacto AF+10% HSA - 6,4 ч, (III) AD2CD2_SC+1% HSA - 18,6 ч, (IV) AD2CD2_SC+10% HSA - 20,7 ч, (V) AD2CD2 19M_SC+1% HSA - 19,2 ч и (VI)

AD2CD2-19M_SC+10% HSA - 21,0 ч. Таким образом, помимо увеличения периода полувыведения AD2CD2_SC приблизительно в три раза по сравнению с ReFacto AF, аналогичное или даже более сильное увеличение периода полувыведения наблюдали для AD2CD2-19M_SC.

Дополнительно тестировали функциональность AD2CD2-19M_SC *in vivo* с помощью анализа с надрезом хвостовой вены, как описано для фармакодинамических исследований. Мышам с гемофилией А (Jackson № B6; 129S4-F8<tm1Kaz>/J) внутривенно вводили разные дозы AD2CD2-19M_SC, включающие 200 ЕД/кг (группа 1), 70 ЕД/кг (группа 2), 20 ЕД/кг (группа 3), 7 ЕД/кг (группа 4) и 2 ЕД/кг (группа 5) (все основаны на хромогенной активности FVIII) или буферный состав (группа 6) (n=10 мышей в группе). В качестве контроля использовали мышей C57BL/6NCrl без гемофилии (группа 7). Анализ с надрезом хвостовой вены выполняли через 30 минут после введения испытуемого образца. Потерю веса за счет кровотечения, время кровотечения и количество гемоглобина по OD550 анализированы по полученным результатам. Для анализа активности FVIII брали дополнительные образцы плазмы (0,25 ч п.а. при ретроорбитальном отборе и после эксперимента). Как показано на фиг. 25, AD2CD2-19M_SC уменьшал общее время кровотечения по сравнению с таковым у контрольных мышей дозозависимым образом, что ясно указывает на его функциональность *in vivo*.

Для оценки, сохраняют ли деиммунизированные слитые белки FVIII-ABD определенную активность FVIII в присутствии ингибирующих анти-FVIII антител, первоначально выработанных против дикого типа или FVIII с укороченным В-доменом (в обход активности), выполняли модифицированный анализ Неймегена-Бетесда (Nijmegen-Bethesda). Анализ Бетесда широко используется для количественного определения концентрации ингибитора фактора VIII (ингибирующего антитела). 1 единица Бетесда (BU) определяется как количество ингибитора, которое нейтрализует 50% 1 единицы активности FVIII в нормальной плазме после 120 минутной инкубации при 37°C. Таким образом, пять различных анти-FVIII антител (ESH-8, GMA-8009, GMA-8015, GMA-8026 и CL20035AP), все из которых могли иметь ингибирующую активность в отношении человеческого FVIII, добавляли в отношении 1:100 в имидазольный буфер (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия, #OQAA33) и использовали в качестве маточных растворов. Рекомбинантные варианты FVIII ReFacto AF, AD2CD2_SC и AD2CD2-19M_SC добавляли до конечной концентрации 1 ЕД/мл в обедненную FVIII плазму (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия, #OTXW17). Стандартную человеческую сыворотку (Siemens Healthcare Diagnostics, Германия, #ORKL17) восстанавливали в имидазольном буфере с получением активности FVIII, равной 1 ЕД/мл, что служило дополнительным контролем. Маточные растворы анти-FVIII антител разводили от 1:2 до 1:1024 (серийные разведения 1:2) в плазме, обедненной FVIII, содержащей продукты FVIII. Кроме того, каждый продукт FVIII, разбавленный 1:2 обедненной по фактору VIII плазмой, определяли как исходную активность фактора VIII (должно получиться примерно 0,5 ед/мл). Стандарт плазмы с ингибитором FVIII (Technoclone, Австрия, № 5159008, 16,0

БЕ/мл), разведенный от 1:2 до 1:128 (ряд серийных разведений 1:2) плазмой, обедненной FVIII, использовали в качестве положительного контроля. Все образцы инкубировали в течение 2 часов при 37°C и определяли активность путем измерения хромогенной активности FVIII. Оставшуюся активность FVIII в каждом образце вычисляли по следующей формуле:

Хромогенная активность FVIII образца [Ед/мл]/исходная хромогенная активность FVIII [Ед/мл] * 100.

Затем вычисляли единицы Бетесда в диапазонах оставшейся активности от 25 до 75% по следующей формуле:

$(2 \text{ Log(оставшаяся активность FVIII)}/0,30103) \times \text{коэффициент разбавления}$.

После этого единицы Бетесда каждого образца делили на единицы Бетесда положительного контроля каждой серии для более строгого сравнения.

Результаты активности AD2CD2_SC и AD2CD2-19M_SC в обход FVIII по сравнению со стандартной человеческой плазмой (SHP) и ReFacto AF в отношении пяти ингибирующих анти-FVIII антител ESH-8, GMA-8009, GMA-8015, GMA-8026 и CL20035AP показаны на фиг. 26. В целом, самая высокая инактивация FVIII наблюдалась для SHP, за которым следовал ReFacto AF. Напротив, влияние всех анти-FVIII ингибиторов на FVIII-активность у AD2CD2_SC и AD2CD2-19M_SC было гораздо ниже. Интересно, что ингибирующая эффективность анти-FVIII антитела GMA-8009 было высоким в отношении SHP и ReFacto AF, средним в отношении AD2CD2_SC и совсем незначительным в отношении AD2CD2-19M_SC, что указывает на удаление В-клеточного эпитопа одной из введенных деиммунизирующих мутаций.

Идентификация пептидов, презентированных на HLA-DR на поверхности антигенпрезентирующих клеток

ReFacto AF, AC-19M_sc и AD2CD2-19M_sc анализировали с помощью технологии пептидной протеомики, ассоциированной с главным комплексом гистосовместимости (MAPP), для идентификации пептидов, презентированных MoDC через HLA-DR (как описано в Webster, CI et al., 2016. mAbs, v.8, No.2, pp.253-63). Вкратце, MoDC получали из когорты из 10 здоровых доноров и инкубировали с тестируемыми образцами. Затем клетки лизировали, осуществляли иммунозахват комплексов HLA-DR/пептид, пептиды элюировали и секвенировали с помощью масс-спектрометрии (МС). Анализ данных МС выявил пептиды, уникальные для отдельных доноров и общие для нескольких доноров. Затем для предсказания 9-мерных последовательностей, связывающих ядро, в представленных пептидных кластерах использовали анализ iTopeTM.

Частоту каждого кластера в когорте рассчитывали в соответствии с приведенным ниже уравнением:

Частота кластеров в когорте = (количество доноров, общих для кластера) / (общее количество доноров) x 100

Как и ожидалось, все пептиды, идентифицированные для ReFacto AF, были из FVIII дикого типа, т.е. аутологичными у здоровых доноров, но у пациентов с гемофилией

А они могут запускать образование ингибитора, поскольку пептиды FVIII распознаются как чужеродные. Всего для ReFacto AF наблюдали 40 пептидных кластеров с частотой появления у 10-80% доноров. Для AC-19M_SC общее количество кластеров было меньше - 37, хотя возникали новые кластеры. Частота появления у доноров 15 из этих 37 кластеров была ниже, чем в случае ReFacto AF, а 6 из этих 15 кластеров вовсе отсутствовали в AC-19M_SC по сравнению с ReFacto AF (см. фиг. 27). Напротив, 8 из указанных 37 кластеров, идентифицированных в AC-19M_SC, имели более высокую частоту по сравнению с ReFacto AF, причем 3 из этих 8 кластеров были неоэпитопами. Интересно, что общее количество кластеров, обнаруженное для AD2CD2-19M_SC, было еще меньше и составляло 31. 24 из этих 31 кластеров продемонстрировали снижение частоты встречаемости у доноров по сравнению с ReFacto AF, а 11 из этих 24 кластеров полностью отсутствовали. Количество кластеров с повышенной частотой по сравнению с ReFacto AF составило всего 3, из них 2 были неоэпитопами.

Интересно, что некоторые из введенных деиммунизирующих мутаций устраняли или по меньшей мере снижали частоту встречаемости у доноров. Однако анализ также показывает, что мутации L160S, F555H и S2315T могут приводить к презентации соответствующих эпитопов FVIII. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретение относится к белкам FVIII-ABD по изобретению, содержащим 16 деиммунизирующих мутаций, а именно 19 предпочтительных мутаций (19M), за исключением мутаций L160S, F555H и S2315T. Предпочтительно, таким образом, указанный белок включает L160, F555 и S2315. Эта комбинация мутаций обозначена как 16M.

6. Деиммунизация областей стыков между FVIII, линкерами и альбуминсвязывающими доменами

Для дальнейшей деиммунизации областей стыков, образованных слияниями последовательностей FVIII, линкера и ABD, выполняли оценку *in silico* с применением двух различных подходов.

Первый подход заключался в использовании инструментов EpiMatrix, как описано в разделе 4 выше. Таким образом, *in silico* были идентифицированы последовательности AD2CD2-19M_SC, не относящиеся к FVIII, с перекрытием, составляющим 8 аминокислот, с последовательностью FVIII, а потенциально иммуногенные кластеры были идентифицированы с помощью инструментов EpiMatrix. Этот подход также включал исследование гомологии с эндогенными белками с помощью JanusMatrix (см. выше).

Индивидуально отобранные и наиболее многообещающие деиммунизирующие мутации из оценки *in silico* были включены с помощью VectorNTI (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США) в ДНК-последовательности AD2CD2_SC и AD2CD2-19M_SC, в результате чего были получены варианты D01-D11 и E01-E11, соответственно, несущие мутации, как указано в Таблице 10. Полные последовательности FVIII были синтезированы и клонированы в целевой вектор. Размножение соответствующих плазмид выполняли в трансфицированной *E. coli* K12 с последующим выделением плазмиды.

Таблица 10: Мутации, идентифицированные с помощью анализа EpiMatrix и использованные для деиммунизации областей стыков между FVIII, ABD и линкерными участками для AD2CD2_SC (SEQ ID NO: 48) и AD2CD2-19M_SC (SEQ ID NO: 114). Положения в этой таблице относятся к SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 114 (в случае идентичного обозначения). Соответствующие замены также могут быть введены в другие белки AD2CD2_SC, например AD2CD2-16M_SC с SEQ ID NO: 114, содержащим L160, F555 и S2315 (эти три положения относятся к положениям относительно SEQ ID NO: 1).

Вариант\Кластер	758-778	776-791 1629-1644	855-869 1708-1722	910-935	933-948	1614-1632
D1/E1	F761G	F779G F1632G	F858G F1711G		F936G	
D2/E2	P766Q+N 772D					
D3/E3		R784Q+S7 87G R1637Q+S 1640G	R863Q+S8 66G R1716Q+S 1719G		R941Q+S 944G	
D4/E4				S926G		
D5/E5						N1625D
D6/E6						N1625Y
D7/E7	F761G	F779G F1632G	F858G F1711G	S926G	F936G	
D8/E8	F761G	F779G F1632G	F858G F1711G	S926G	F936G	N1625D
D9/E9	P766Q+N 772D	R784Q+S7 87G R1637Q+S 1640G	R863Q+S8 66G R1716Q+S 1719G		R941Q+S 944G	
D10/E10	P766Q+N 772D	R784Q+S7 87G R1637Q+S 1640G	R863Q+S8 66G R1716Q+S 1719G	S926G	R941Q+S 944G	
D11/E11	P766Q+N 772D	R784Q+S7 87G R1637Q+S 1640G	R863Q+S8 66G R1716Q+S 1719G	S926G	R941Q+S 944G	N1625D

Культивирование клеток CAP-T и экспрессию плазмид, кодирующих FVIII, путем временной трансфекции выполняли, как описано в других разделах настоящего документа. Для проверки уровней экспрессии и функциональности указанного стыка деиммунизированных белков FVIII, слитых с альбумин-связывающими доменами, соответствующие плазмиды подвергали нуклеофекции в клетки CAP-T. 4-дневные супернатанты клеточных культур тестировали на хромогенную активность FVIII и уровни антигена FVIII в соответствии с описанными выше методами. Результаты представлены

на фиг. 28. Все деиммунизированные по стыкам варианты AD2CD2_SC D01, D02, D03, D04, D05, D07, D08, D09, D10 и D11 были способны индуцировать процессинг субстрата в хромогенном анализе, демонстрируя экспрессию и секрецию каждого варианта, а также функциональность *in vitro* (фиг. 28A). Удельная хромогенная активность (соотношение хромогенной активности к уровню антигена FVIII) находилась в диапазоне от 132 до 190% (фиг. 28B). В этой оценке *in vitro* все варианты AD2CD2_SC, деиммунизированные по стыкам, имели такую же или даже более высокую эффективность, чем исходная молекула AD2CD2_SC. Было обнаружено, что все протестированные супернатанты деиммунизированных по стыкам вариантов AD2CD2-19M_SC E01, E02, E04, E05, E06, E07, E08, E10 и E11 обеспечивают хромогенную активность FVIII, демонстрирующую экспрессию, секрецию и общую функциональность белка. Наблюдаемые диапазоны хромогенности FVIII находились между 1,15 ед/мл для E04_AD2CD2-19M_SC и 3,99 ед/мл для E11_AD2CD2-19M_SC. Для варианта с остовом AD2CD2-19M_SC концентрация составила 1,98 ЕД/мл. Удельная хромогенная активность FVIII находилась в диапазоне от 113 до 187%, что указывает на благоприятное качество белка для всех вариантов FVIII на основе AD2CD2-19M_SC.

Несмотря на то, что все протестированные варианты на основе AD2CD2_SC и AD2CD2-19M_SC, деиммунизированные по стыкам, были функциональными *in vitro*, варианты D08 и D11, а также E08 и E11 могут быть предпочтительными с точки зрения иммунологических аспектов, поскольку в этих вариантах отсутствует наибольшее количество потенциально иммуногенных кластеров. Таким образом, для дальнейших исследований варианты D08_AD2CD2_SC и D11_AD2CD2_SC продуцировали в больших количествах с помощью стабильно экспрессирующих пулов CAP Go, и супернатанты подвергали аффинной очистке, как описано выше.

Функциональность *in vivo* деиммунизированных по стыкам белков FVIII-ABD

Эффективность *in vivo* предпочтительных вариантов FVIII D08_AD2CD2_SC и D11_AD2CD2_SC, деиммунизированных по стыкам, оценивали с помощью анализа с надрезом хвостовой вены у мышей с гемофилией А, как описано выше. По меньшей мере 8 животных в группе получали 20, 5 или 2 ЕД/кг (с поправкой на хромогенную активность FVIII) D08_AD2CD2_SC или D11_AD2CD2_SC. 7 мышам с гемофилией А и 5 мышам C57Bl/6 (не страдающим гемофилией) вводили буфер для состава FVIII в качестве положительного и отрицательного контроля. Хвостовую вену надрезали через 0,5 ч после введения, и результаты по общему времени кровотечения показаны на фиг. 29. У мышей с гемофилией А, получавших буфер для состава FVIII, среднее время кровотечения составляло 29 минут 22 секунды, в то время как среднее время кровотечения у мышей C57Bl/6 дикого типа составило всего 2:30 мин. Когда D08_AD2CD2_SC вводили мышам с гемофилией А, наблюдаемое время кровотечения составляло 3:03, 6:01 и 16:43 мин для вводимых доз 20, 5 и 2 ЕД/кг массы тела, соответственно. Сокращение времени кровотечения было значительным для всех доз по сравнению с мышами с гемофилией А, обработанными буфером для состава FVIII. У животных, получавших D11_AD2CD2_SC в

дозах 20, 5 и 2 ЕД/кг массы тела, наблюдаемое время кровотечения составило 6:47, 4:41 и 22:04 мин, соответственно. Значительное сокращение времени кровотечения наблюдали при дозах 20 и 5 ЕД/кг массы тела. В совокупности этот фармакодинамический анализ кровотечения демонстрирует дозозависимую эффективность *in vivo* обоих вариантов D08_AD2CD2_SC и D11_AD2CD2_SC, деиммунизированных по стыкам.

Второй подход к деиммунизации областей стыков в FVIII

Второй подход к деиммунизации областей стыков между FVIII, линкерами и ABD выполняли с помощью iTope Abzena *in silico* для анализа аминокислотной последовательности AD2CD2_SC. В соответствии с анализом идентификации пептида МНС II, описанным выше, для областей стыков, охватывающих 9-мерное ядро от F761 до S769, был идентифицирован только один эпитоп. Чтобы деиммунизировать этот эпитоп, с помощью анализа iTope выполняли оценку нескольких мутаций, которые рассматривали с точки зрения сохранения сайта расщепления тромбином в соответствии с Gallwitz et. al. (Gallwitz M, Enoksson M, Thorpe M, Hellman L. The extended cleavage specificity of human thrombin. PLoS One. 2012;7(2):e31756. doi:10.1371/journal.pone.0031756). Полученные в результате деиммунизирующие аминокислотные замены, как указано в таблице 11, ясно продемонстрировали *in silico* резко уменьшение связывания со всеми типами МНС II.

Таблица 11: Мутации, идентифицированные с помощью анализа iTope и использованные для деиммунизации областей стыков между FVIII, ABD и линкерными участками для AD2CD2_SC (SEQ ID 48). Соответствующие замены также могут быть введены в другие белки по изобретению, например, AD2CD2-16M_SC с SEQ ID NO:114, содержащей L160, F555 и S2315 (эти три положения относятся к положениям относительно SEQ ID NO:1) или AD2CD2-19M_SC (SEQ ID NO: 114).

Последовательность	Мутация	SEQ ID NO	Лиганд МНС II	Лиганды с высоким сродством
FSQNPPVLS	-	127	13	8
ASQNPPVLS	F761A	128	0	0
SSQNPPVLS	F761S	129	0	0
FSQNPEVLS	P766E	130	1	0
FSQNPPVLD	S769D	131	3	0

С помощью VectorNTI создавали *in silico* конструкции ДНК, кодирующие варианты AD2CD2_SC, содержащие одну из четырех мутаций из таблицы 11, а именно F01_AD2CD2_SC, содержащую F761A, F02_AD2CD2_SC, содержащую F761S, F03_AD2CD2_SC, содержащую P766E, и F04_AD2CD2_SC, содержащую S769D. Полные последовательности FVIII синтезировали и клонировали в целевой вектор. Размножение соответствующих плазмид осуществляли в трансфицированной E. coli K12 с последующим выделением плазмиды.

Плазмиды, кодирующие F01_AD2CD2_SC, F02_AD2CD2_SC, F03_AD2CD2_SC, F04_AD2CD2_SC и AD2CD2_SC временно трансфицировали в клетки CAP-T для оценки

экспрессии и функциональности, как описано выше. Супернатанты 4-дневной периодической культуры в масштабе 12,5 мл анализировали на хромогенную активность FVIII и уровни антигена FVIII. Результаты, нормализованные по AD2CD2_SC, показаны на фиг. 30 А и В соответственно. Существенных различий в концентрациях хромогенного FVIII обнаружено не было - все значения вариантов, деиммунизированных по стыкам, находились в диапазоне от 101 до 110% по сравнению с AD2CD2_SC. Для сравнения, уровни антигена FVIII, нормализованные относительно AD2CD2_SC, были выше для указанных вариантов и находились в пределах 109-186% по сравнению с контролем AD2CD2_SC. Это дало более низкую удельную активность вариантов FVIII F01_AD2CD2_SC, F02_AD2CD2_SC и F03_AD2CD2_SC, деиммунизированных по стыкам, которые, тем не менее, по-прежнему демонстрировали очень хорошие значения удельной активности в пределах от 240 до 313%. Для сравнения, F04_AD2CD2_SC и AD2CD2_SC показали удельную активность, равную 448 и 439%. В совокупности все четыре деиммунизированных по стыкам варианта FVIII этого второго подхода экспрессировались и оказались функциональными *in vitro*. Согласно предсказанию *in silico* с помощью анализа iTope, предпочтительными могут быть варианты F01_AD2CD2_SC и F02_AD2CD2_SC.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный белок фактора VIII, содержащий часть тяжелой цепи и часть легкой цепи фактора VIII и по меньшей мере два альбумин-связывающих домена, где по меньшей мере один альбумин-связывающий домен является С-терминальным по отношению к части тяжелой цепи, и по меньшей мере один альбумин-связывающий домен является С-терминальным по отношению к части легкой цепи,

причем, если белок является одноцепочечным белком, альбумин-связывающий(ие) домен(ы), С-терминальный(ые) по отношению к части тяжелой цепи, является/являются N-терминальным(и) по отношению к части легкой цепи.

2. Рекомбинантный белок фактора VIII по п.1, который является одноцепочечным белком, где белок предпочтительно имеет по меньшей мере частично удаленный В-домен.

3. Рекомбинантный белок фактора VIII по любому из предшествующих пунктов, где два альбумин-связывающих домена расположены С-терминально по отношению к части тяжелой цепи, и два альбумин-связывающих домена расположены С-терминально по отношению к части легкой цепи.

4. Рекомбинантный белок фактора VIII по любому из предшествующих пунктов, где альбумин-связывающие домены отделены от части тяжелой цепи и/или части легкой цепи и/или других альбумин-связывающих доменов линкером, при этом линкер выбирают из группы, содержащей

а) линкер, содержащий расщепляемый тромбином линкер, который необязательно имеет последовательность SEQ ID NO: 39, и b) линкер, содержащий глицин-сериновый линкер, который необязательно имеет последовательность SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 41, и c) линкер, содержащий расщепляемый тромбином линкер, фланкированный с каждой стороны глицин-сериновым линкером, который необязательно имеет последовательность SEQ ID NO: 42 или SEQ ID NO: 43.

5. Рекомбинантный белок фактора VIII по любому из предшествующих пунктов, где альбумин-связывающий домен содержит последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 44, где предпочтительно последовательность представляет собой SEQ ID NO: 46.

6. Рекомбинантный белок фактора VIII по любому из предшествующих пунктов, который необязательно представляет собой одноцепочечный белок, где указанный белок содержит часть тяжелой цепи, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности aa20-aa768 SEQ ID NO: 16, и часть легкой цепи, на по меньшей мере 90% идентичную последовательности aa769-aa1445 SEQ ID NO: 16.

7. Рекомбинантный белок фактора VIII по любому из предшествующих пунктов, который представляет собой одноцепочечный белок, содержащий по меньшей мере два альбумин-связывающих домена между частью тяжелой цепи и частью легкой цепи и по меньшей мере два альбумин-связывающих домена, С-терминальных по отношению к части легкой цепи, причем белок является на по меньшей мере 80% идентичным последовательности любой из SEQ ID NO: 48, 49 или 51,

при этом белок предпочтительно является на по меньшей мере 80% идентичным

последовательности SEQ ID NO: 48.

8. Рекомбинантный белок фактора VIII по любому из предшествующих пунктов, где рекомбинантный белок фактора VIII содержит по меньшей мере три аминокислотные замены в положениях, выбранных из группы, состоящей из Y748, L171, S507, N79, I80, I105, S112, L160, V184, N233, L235, V257, I265, N299, Y426, Y430, L505, F555, I610, N616, L706, N754, K1837, R1936, S2030, S2037, N2038, S2077, M2123, F2215, K2226, K2258, V2313, S2315, V2333 и Q2335;

где замены N независимо выбирают из группы, состоящей из D, H, S и E; где замены I независимо выбирают из группы, состоящей из T и V; где замены S независимо выбирают из группы, состоящей из A, N, G, T и E; где замены L независимо выбирают из группы, состоящей из N, Q, F и S; где замены V независимо выбирают из группы, состоящей из A и T; где замены Y независимо выбирают из группы, состоящей из N, H и S; где замены F независимо выбирают из группы, состоящей из H и S; где замены K независимо выбирают из группы, состоящей из N, D, E, Q, S и T; где замены R независимо выбирают из группы, состоящей из Q, H и S; где замены M выбирают из группы, состоящей из R, Q, K и T; и/или где замены Q выбирают из группы, состоящей из R, D, E, H и K;

причем положения указаны относительно полноразмерной молекулы человеческого фактора VIII с SEQ ID NO: 1;

и где рекомбинантный белок фактора VIII сохраняет по меньшей мере 50% коагулянтной активности, определенной в хромогенном анализе, по сравнению с белком фактора VIII, состоящим из SEQ ID NO: 60.

9. Рекомбинантный белок фактора VIII по п.8, в котором аминокислотные замены выбирают из группы, состоящей из Y748S, L171Q, S507E, N79S, I80T, I105V, S112T, L160S, V184A, N233D, L235F, V257A, I265T, N299D, Y426H, Y430H, L505N, F555H, I610T, N616E, L706N, N754D, K1837E, R1936Q, S2030A, S2037G, N2038D, S2077G, M2123K, F2215H, K2226Q, K2258Q, V2313A, S2315T, V2333A и Q2335H,

при этом рекомбинантный белок фактора VIII предпочтительно содержит от 3 до 25 указанных замен, причем замены расположены в разных иммуногенных кластерах.

10. Рекомбинантный белок фактора VIII по любому из п.8 или п.9, содержащий по меньшей мере три замены аминокислот в положениях, выбранных из группы, состоящей из Y748, L171, S507, N79, S112, L160, V184, N233, I265, N299, Y426, F555, N616, I632, L706, K1837, R1936, N2038, S2077, S2125, F2215, K2226, K2258, S2315 и V2333

где по меньшей мере три аминокислотные замены предпочтительно выбирают из группы, состоящей из Y748S, L171Q, S507E, N79S, S112T, L160S, V184A, N233D, I265T, N299D, Y426H, F555H, N616E, I632T, L706N, K1837E, R1936Q, N2038D, S2077G, S2125G, F2215H, K2226Q, K2258Q, S2315T и V2333A.

11. Рекомбинантный белок фактора VIII по любому из пп.8-10, содержащий по меньшей мере аминокислотные замены в положениях N79, S112, L160, L171, V184, N233, I265, N299, Y426, S507, F555, N616, L706 и Y748, где предпочтительно замены

представляют собой N79S, S112T, L160S, L171Q, V184A, N233D, I265T, N299D, Y426H, S507E, F555H, N616E, L706N и Y748S, необязательно дополнительно содержащие аминокислотную замену в положении K1837, такую как K1837E.

12. Рекомбинантный белок фактора VIII по любому из пп.8-11, содержащий по меньшей мере аминокислотные замены в положениях N79, S112, L160, L171, V184, N233, I265, N299, Y426, S507, F555, N616, L706, Y748, N2038, S2077, S2315 и V2333, где предпочтительными заменами являются N79S, S112T, L160S, L171Q, V184A, N233D, I265T, N299D, Y426H, S507E, F555H, N616E, L706N, Y748S, N2038D, S2077G, S2315T и V2333A, необязательно дополнительно содержащий аминокислотную замену в положении K1837, такую как K1837E, например, на по меньшей мере 90% идентичный последовательности белка фактора VIII SEQ ID NO: 114.

13. Рекомбинантный белок фактора VIII по любому из пп.8-10, где белок содержит по меньшей мере одну, предпочтительно все из L160, F555 и S2315,

при этом белок необязательно имеет SEQ ID NO: 114, за исключением L160, F555 и S2315.

14. Рекомбинантный белок фактора VIII по любому из пп.8-10 или п.13, содержащий по меньшей мере аминокислотные замены в положениях N79, S112, L171, V184, N233, I265, N299, Y426, S507, N616, L706, Y748, N2038, S2077 и V2333, где предпочтительными заменами являются N79S, S112T, L171Q, V184A, N233D, I265T, N299D, Y426H, S507E, N616E, L706N, Y748S, N2038D, S2077G, и V2333A, необязательно дополнительно содержащий аминокислотную замену в положении K1837, такую как K1837E, например, на по меньшей мере 90% идентичный последовательности белка фактора VIII SEQ ID NO: 114.

15. Рекомбинантный белок фактора VIII по любому из пп.8-14, на по меньшей мере 90% идентичный последовательности белка фактора VIII SEQ ID NO: 63, причем для определения идентичности последовательности рассматриваются только домены A1, a1, A2, a2, a3, A3, C1 и C2,

при этом белок необязательно имеет SEQ ID NO: 114.

16. Рекомбинантный белок фактора VIII по любому из предшествующих пунктов, представляющий собой одноцепочечный белок, содержащий по меньшей мере частично удаленный домен В и содержащий последовательность процессинга SEQ ID NO: 5, где X представляет собой А или S, необязательно А.

17. Рекомбинантный белок фактора VIII по любому из предшествующих пунктов, содержащий по меньшей мере одну, предпочтительно все замены F761G, F779G, F1632G, F858G, F1711G, S926G, F936G и N1625D, где указанные замены относятся к положениям относительно SEQ ID NO: 48.

18. Рекомбинантный белок фактора VIII по любому из пп.1-16, содержащий по меньшей мере одну, предпочтительно все замены P766Q, N772D, R784Q, S787G, R1637Q, S1640G, R863Q, S866G, R1716Q, S1719G, S926G, R941Q, S944G и N1625D, где указанные замены относятся к положениям относительно SEQ ID NO: 48.

19. Рекombинантный белок фактора VIII по любому из предшествующих пунктов, где указанный белок представляет собой слитый белок.

20. Нуклеиновая кислота, кодирующая рекомбинантный белок фактора VIII по любому из предшествующих пунктов, где указанная нуклеиновая кислота предпочтительно представляет собой вектор экспрессии, подходящий для экспрессии указанного рекомбинантного белка фактора VIII в клетке млекопитающего, необязательно в человеческой клетке, такой как клетка САР.

21. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.20, где предпочтительно клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, содержащую вектор экспрессии, подходящий для экспрессии указанного рекомбинантного белка фактора VIII в указанной клетке.

22. Способ получения рекомбинантного белка фактора VIII, включающий культивирование клетки-хозяина по п.21 в условиях, подходящих для экспрессии белка фактора VIII, и выделение рекомбинантного белка фактора VIII, где способ необязательно включает приготовление белка фактора VIII в виде фармацевтической композиции.

23. Фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантный белок фактора VIII по любому из пп.1-19, нуклеиновую кислоту по п.20 или клетку-хозяин по п.21, необязательно дополнительно содержащая биологически приемлемый носитель и/или альбумин,

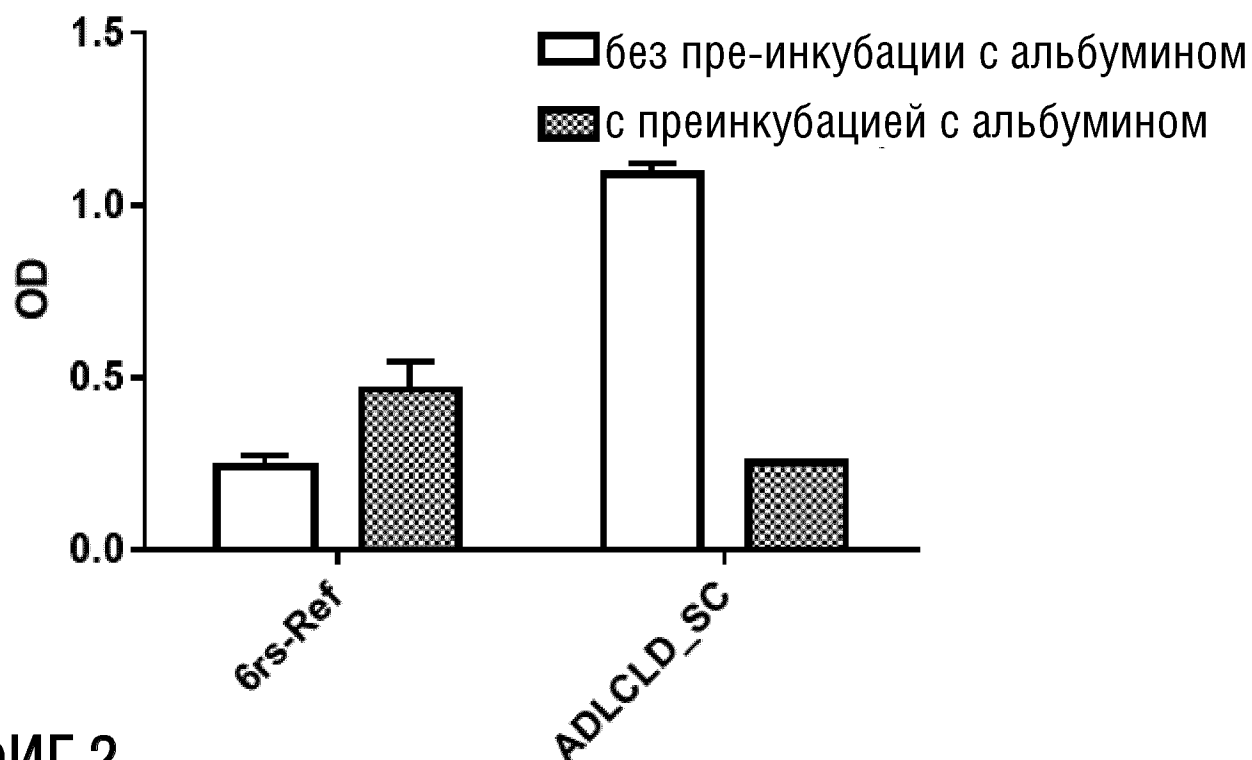
при этом фармацевтическая композиция предпочтительно предназначена для лечения гемофилии А.

24. Способ лечения гемофилии А, включающий введение эффективного количества композиции по п.23 нуждающемуся в этом субъекту.

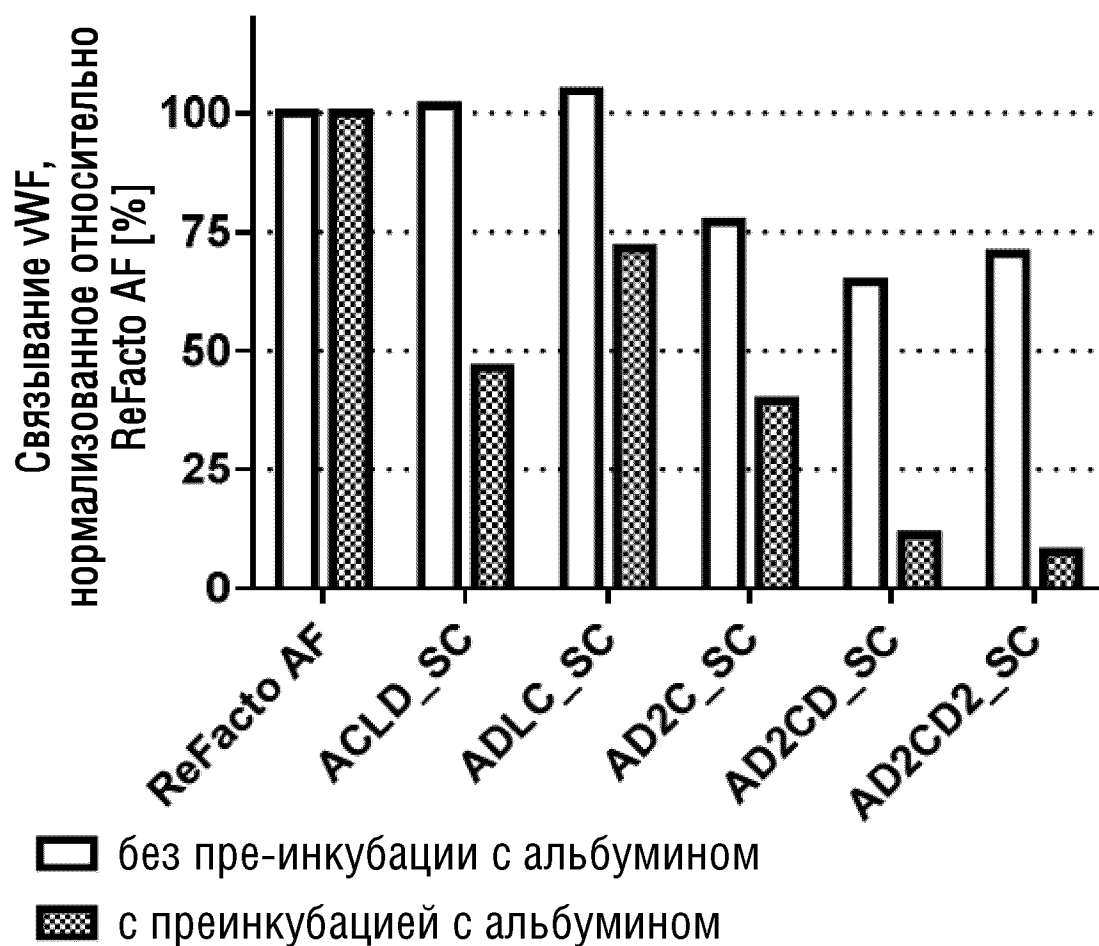
1/25

ФИГ.1

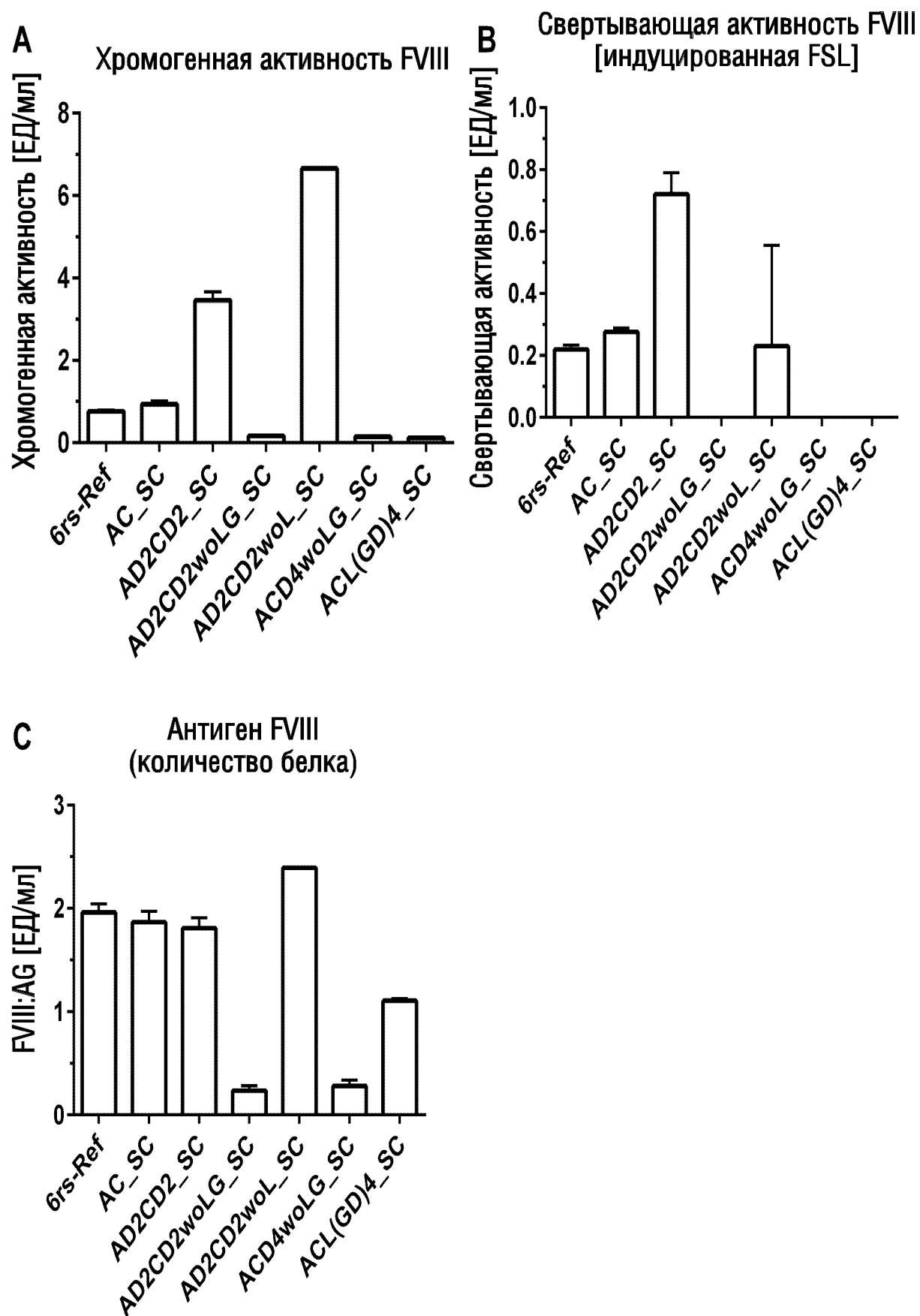
Связывание слитого белка FVIII-ABD с альбумином



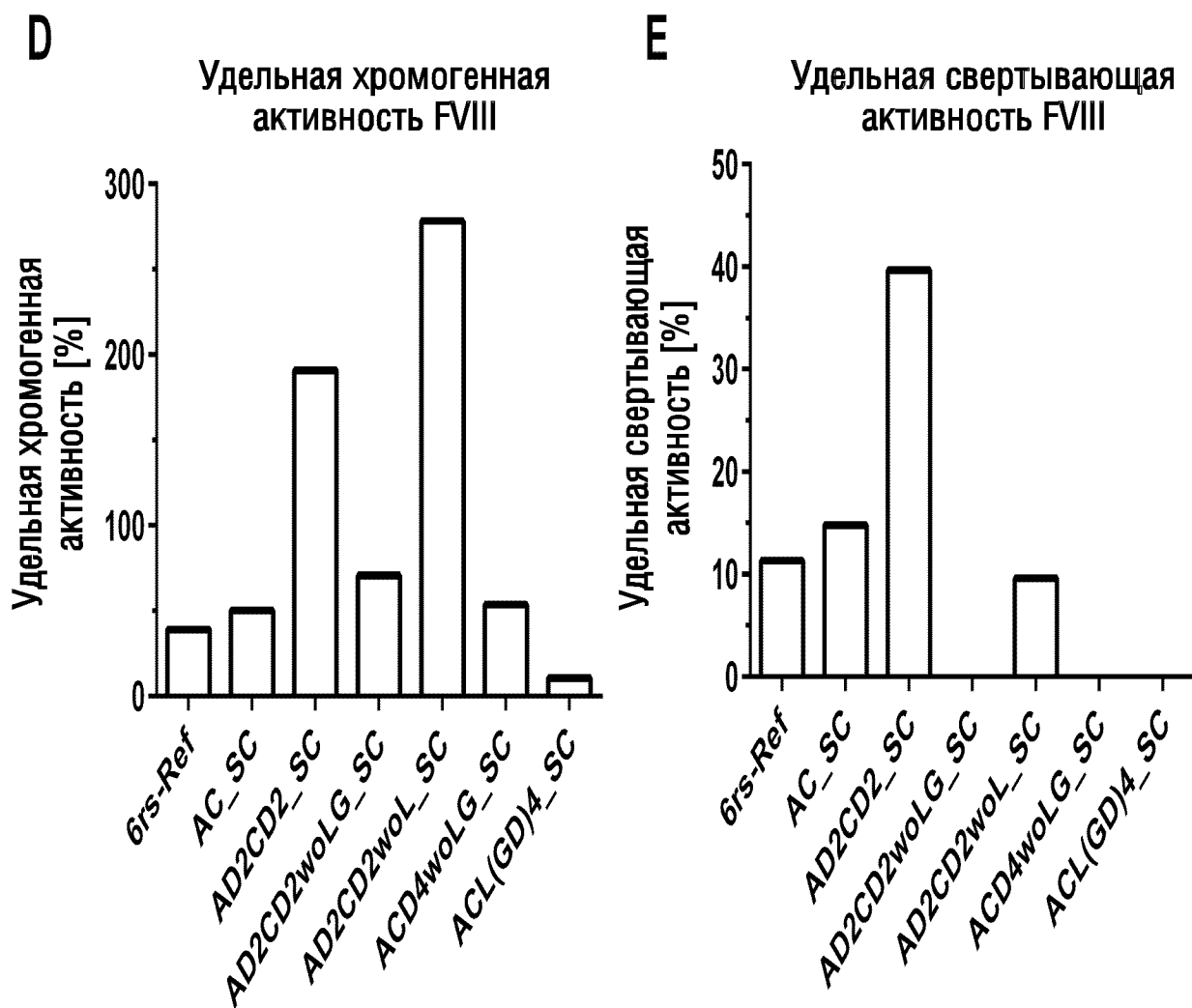
ФИГ.2



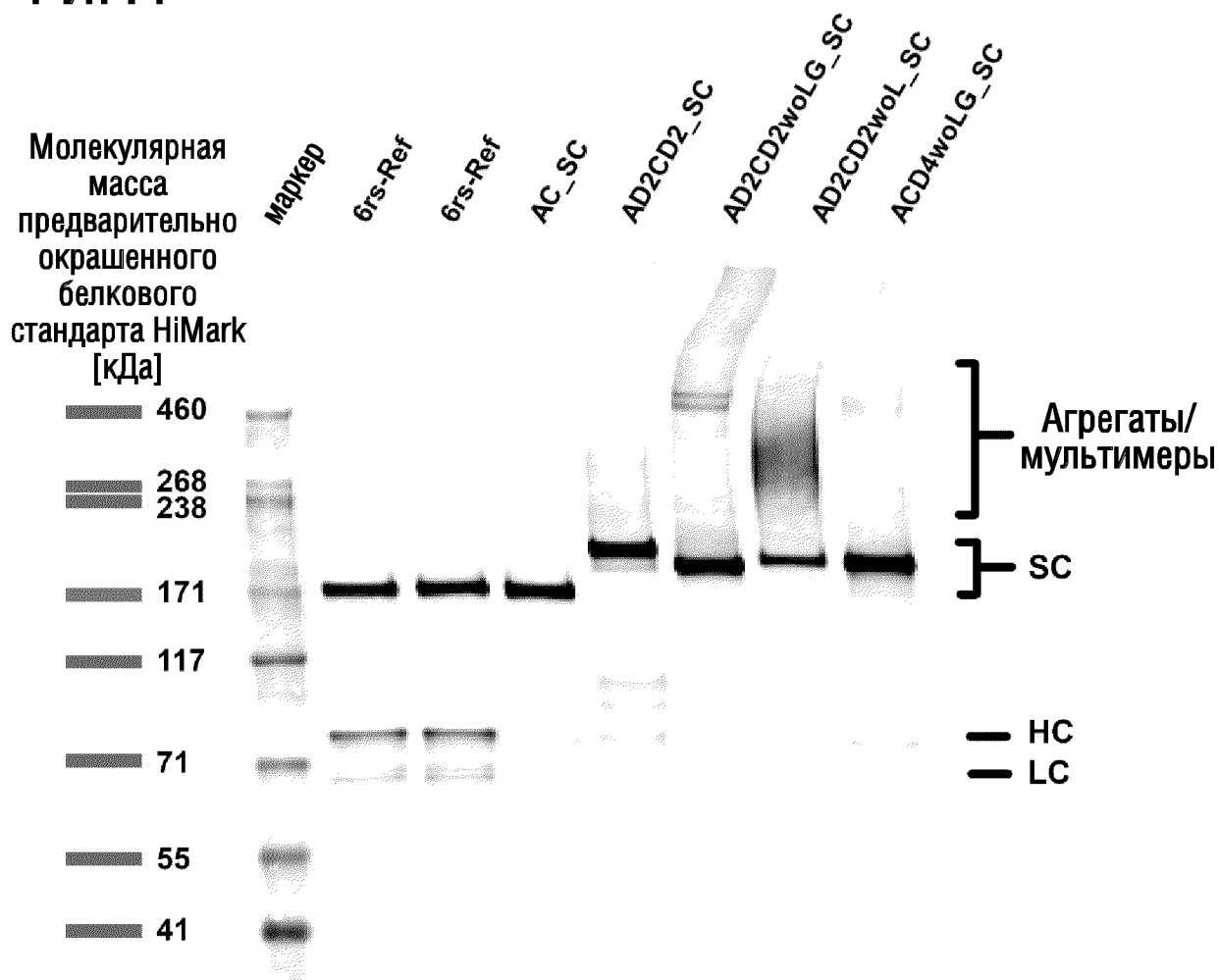
ФИГ.3



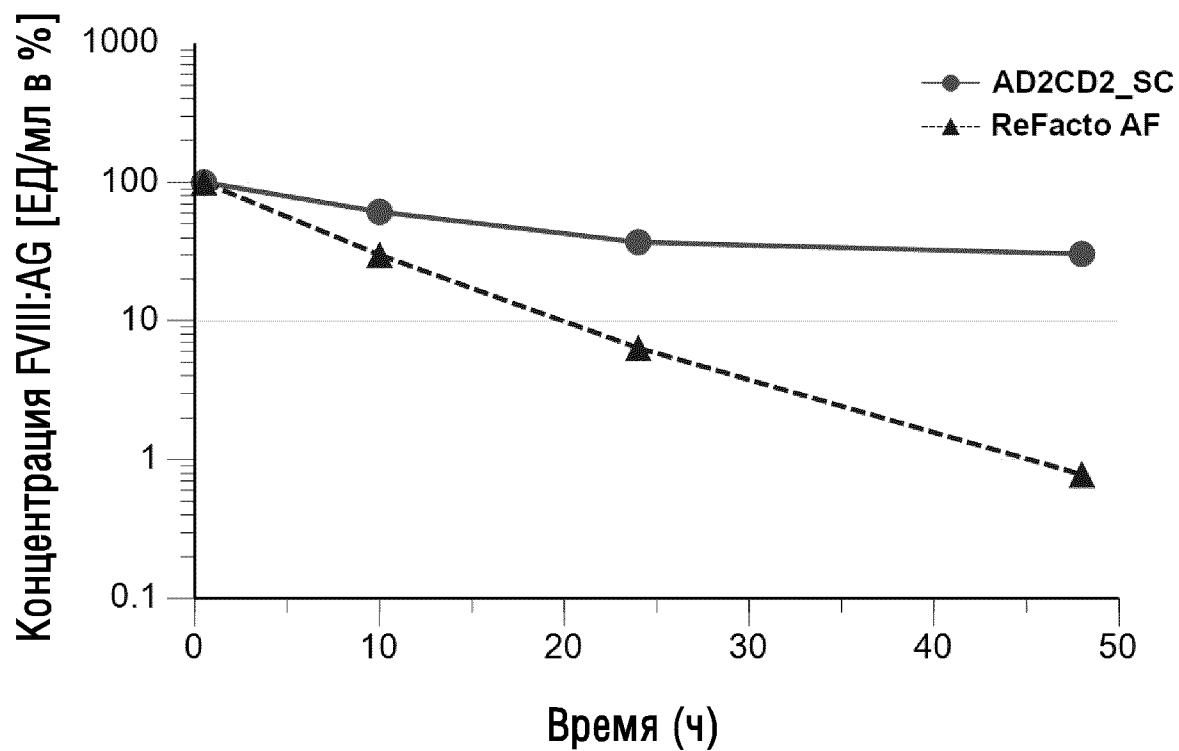
ФИГ.3, продолжение



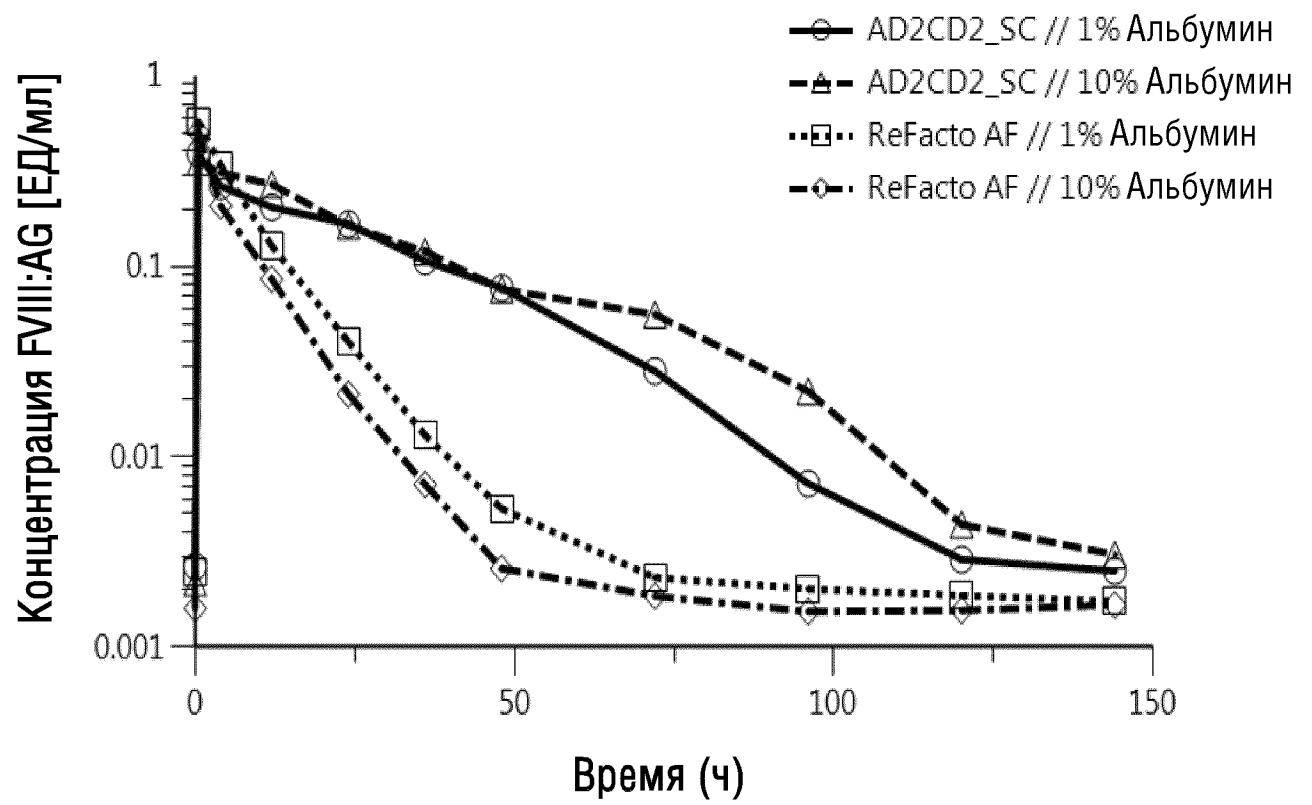
ФИГ.4



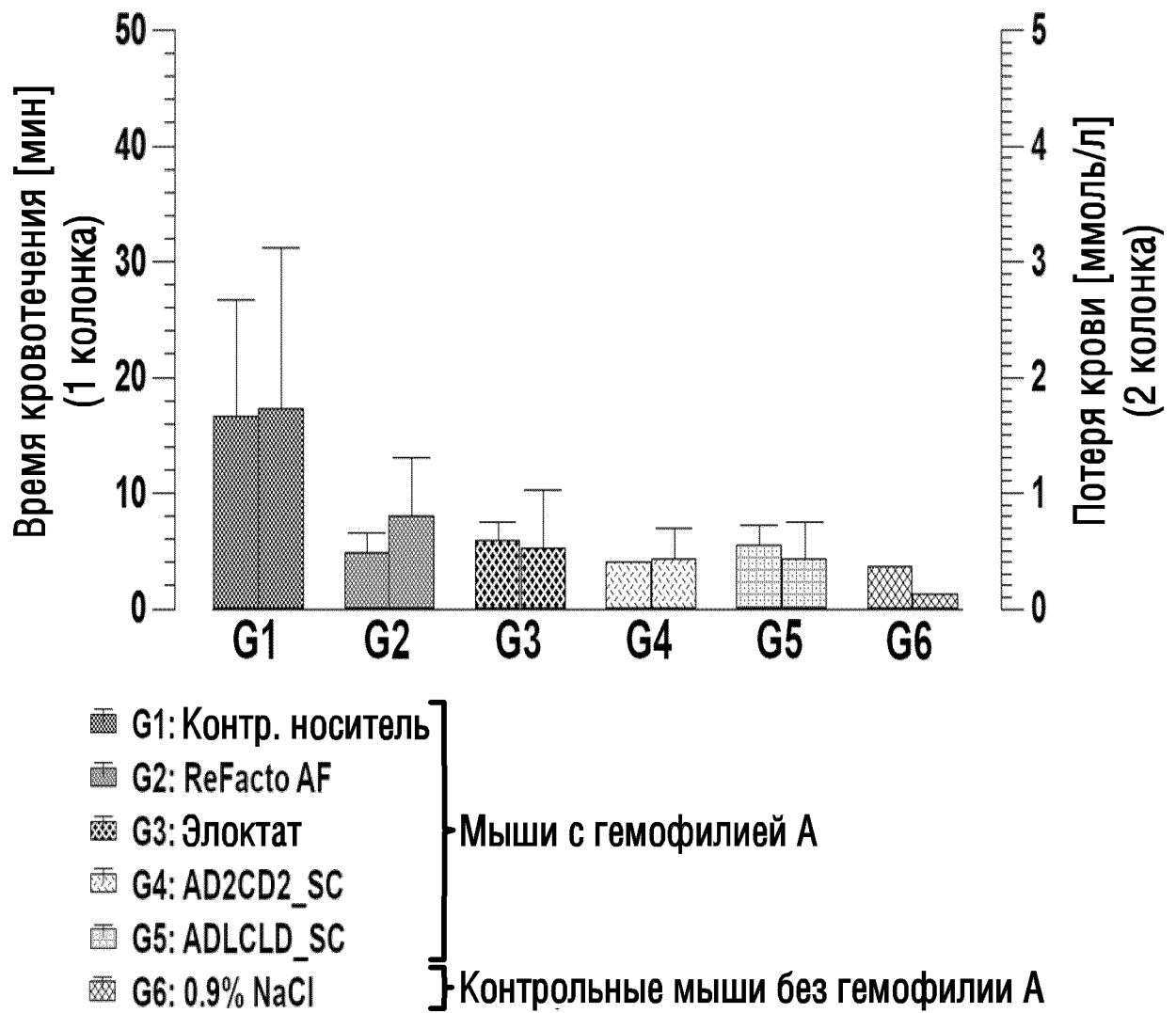
ФИГ.5



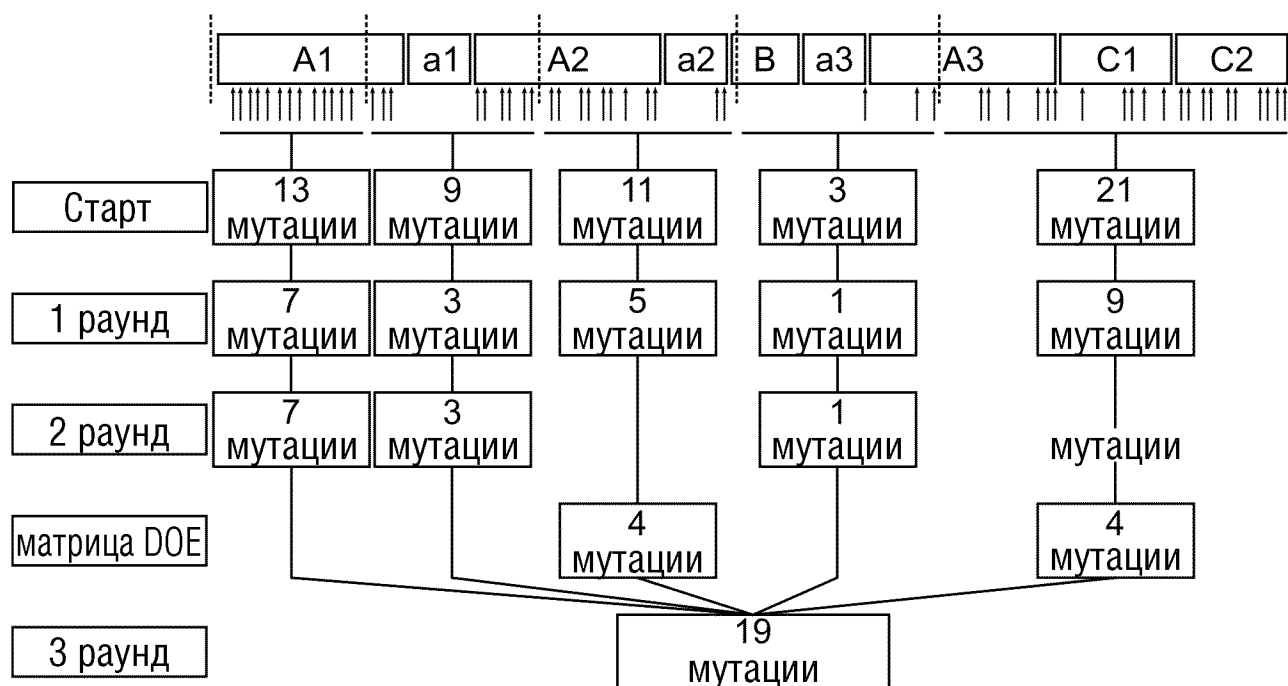
ФИГ.6



ФИГ.7

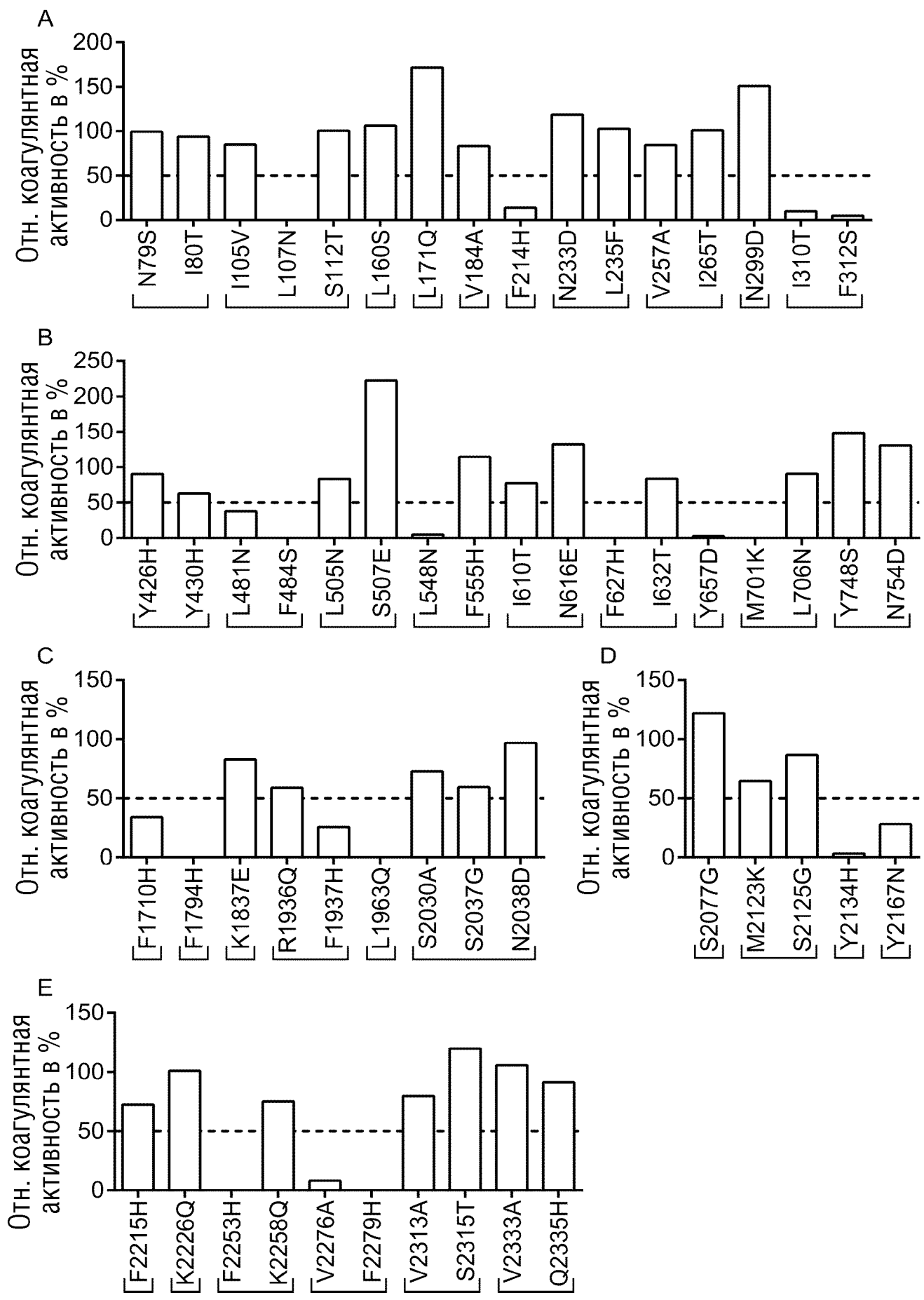


ФИГ.8А

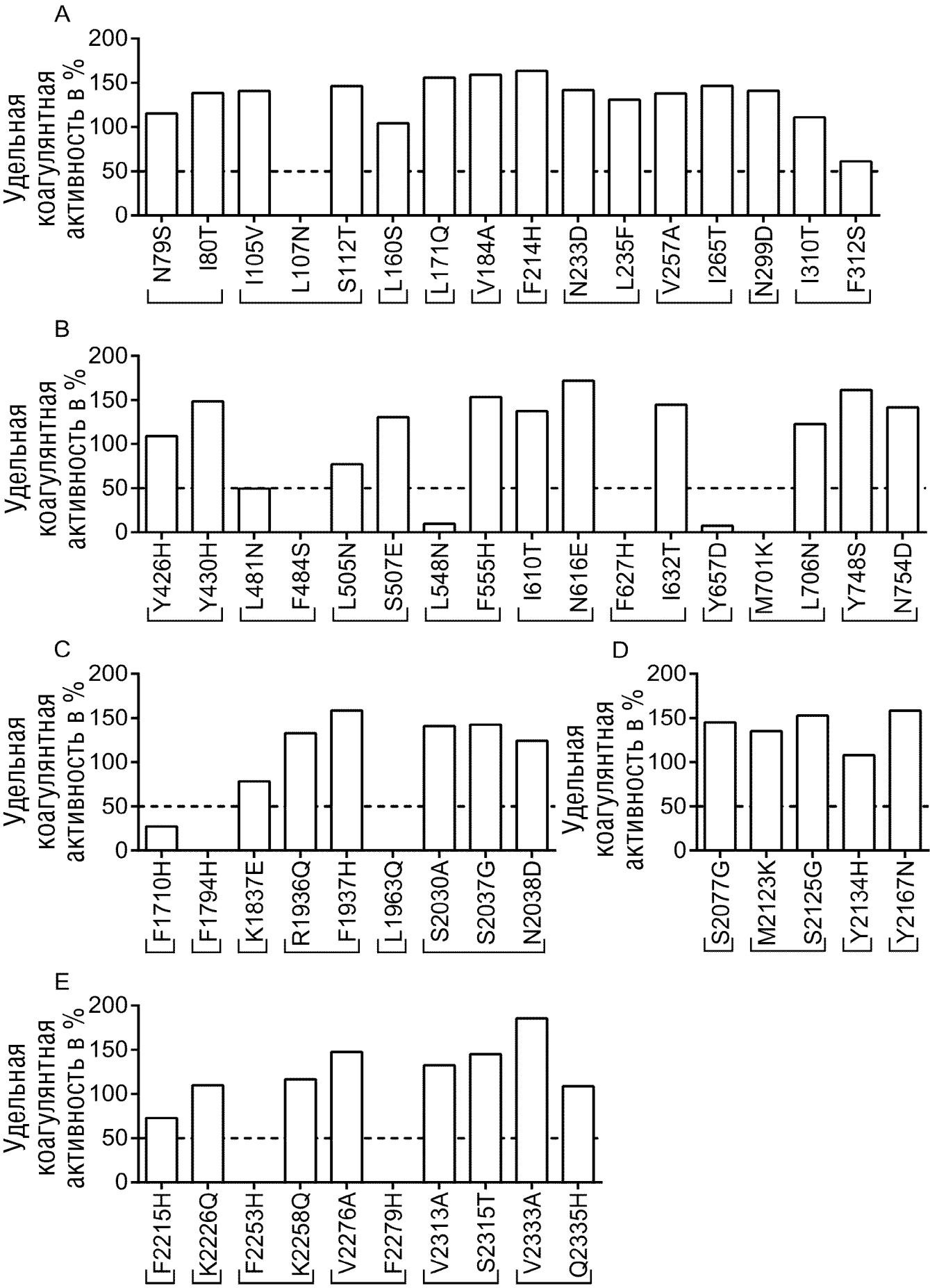
**В**

MQIELSTCFFLCLLRFCFSATTRYYLGAVELSWDYMQSDDLGPVDFARFPPRVPKSFPPNTSVVY
 KKTLFVEFTDHLF**S**IAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDVTTLKNMA**T**HPVSLHAVGVSYWKASEG
 AEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHYVWQV**S**KENGPMASDP**Q**CLTYSYLSHVDL**A**KDLNSGLIG
 ALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETK**D**SLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYV
 NRSPLGL**T**GCHRSVYWHVIGMGTTPPEVHSIFLEGHTFLVR**D**HRQASLEISPTFLTAQTLLMDLG
 QLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNDNSPSF
 IQIRSVAKKHPKTWWHYIAAEEEDWDYAPLV LAPDDRS**H**KSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTD
 ETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD TLLIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLY**E**RRLPKGVKHLKDF
 PILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSS**H**VNMRDLASGLIGPLLCYKESVDQQRGNQIM
 SDKRNVILFSVF DENRSWYLTENIQRFLP**E**PAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHE
 VAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSEMPGN**M**WILGCHNSDFR
 NRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISA**S**LLSKNNAIEPR**S**FSQDPLAWDNHYGTQIPKEEWK
 SQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHO
 REITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSS
 SPHVLNRNAQSGSVPQFKKVVFEFTDGSFTQPLRYGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQ
 ASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKKNFVKPNETKTYFW**E**VQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVD
 LEKDVHSGLIGPLL VCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQME
 DPTFKENYRFHANGYIMDTLPGLVMAQDQIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMA
 LYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTFLVYS**D**KCQTPLGMASGHIRDFQITAS
 GQYGQWAPKLARLHYSG**G**INAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGKIQGARQKFSSLYISQFIIMYSL
 DGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNFNPPIARYIRLHPHTHSIRSTLRMELMGCDLNS
 CSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNM FATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKT
 MKVTGVTQGVKSLLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVVFQGNQDSFTPVVN**T**LDPPL
 LTRYLRHPQSW**A**HQIALRMEVLGCEAQDLY

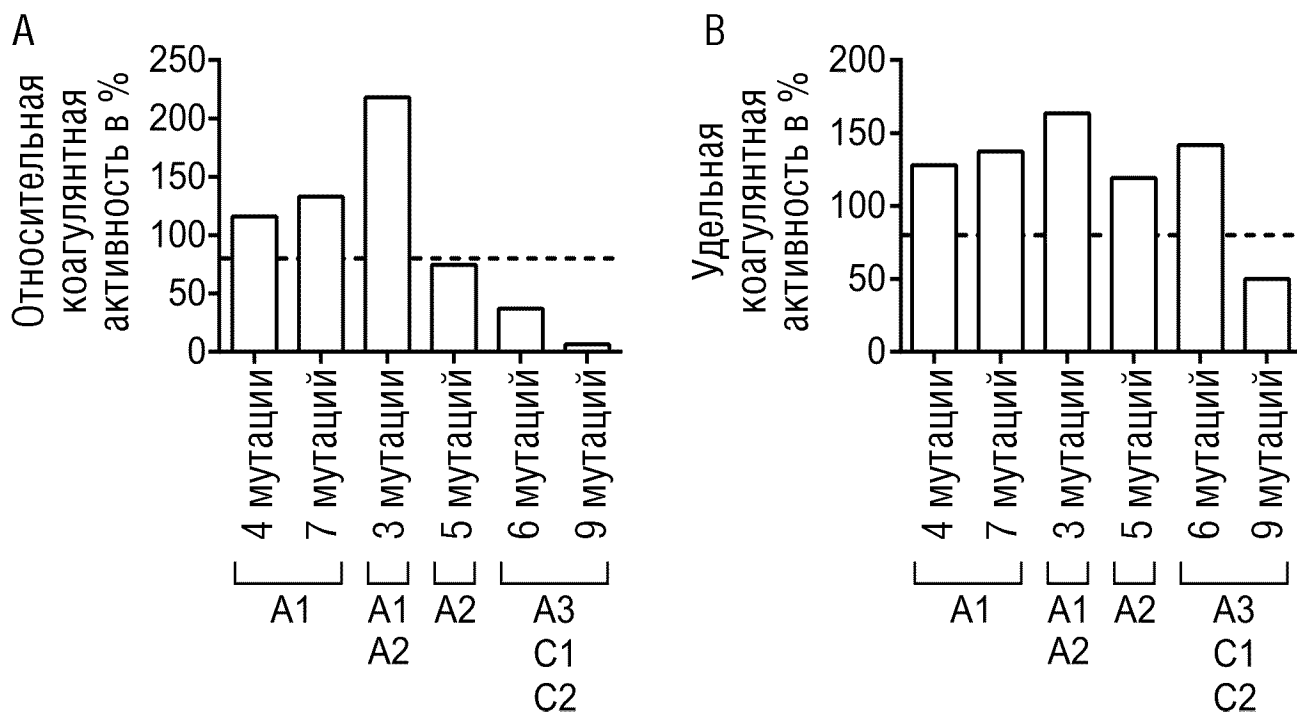
ФИГ.9



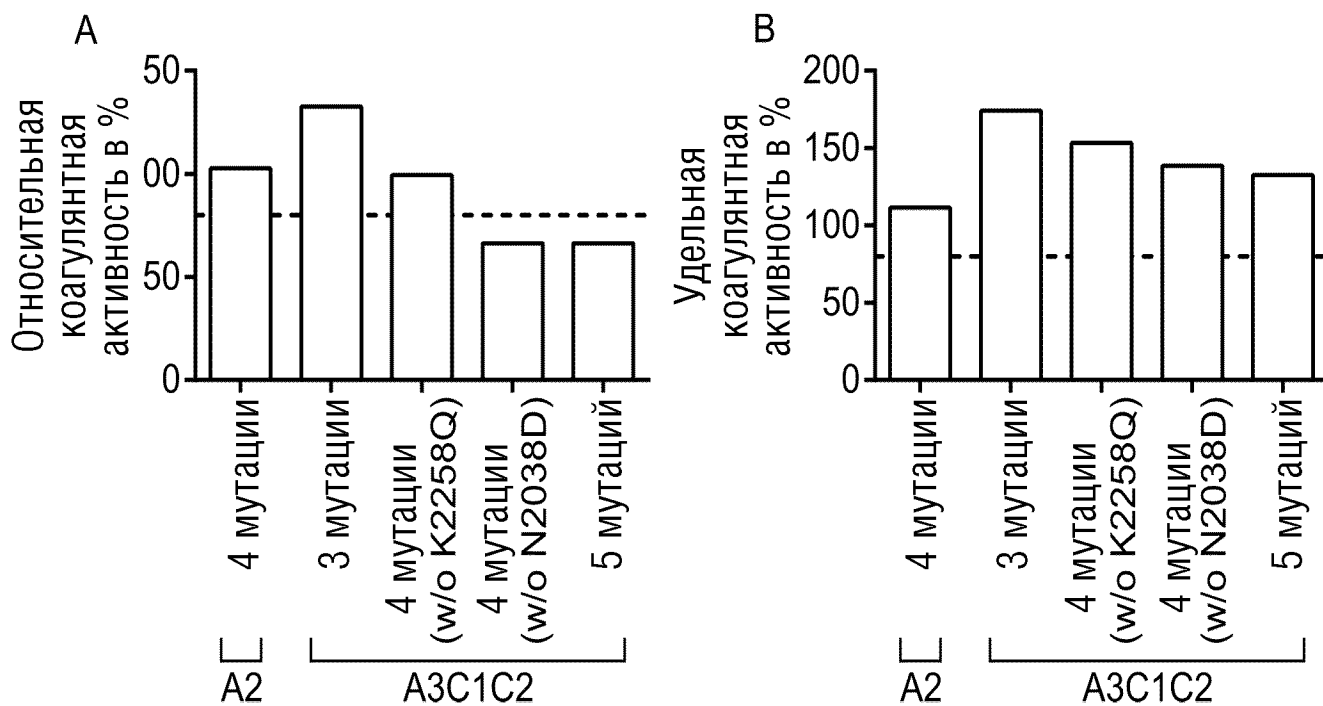
ФИГ.10



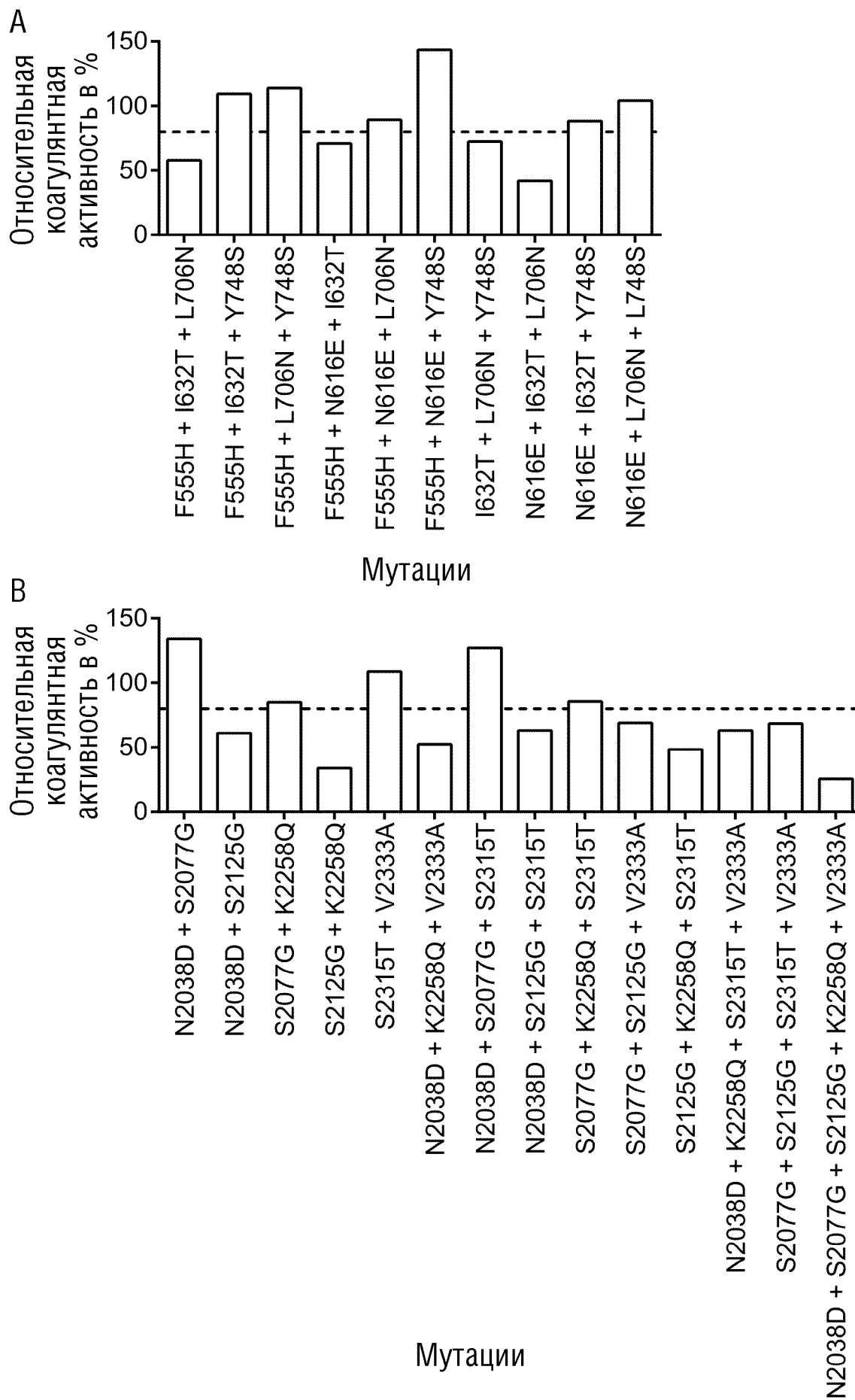
ФИГ.11



ФИГ.13



ФИГ.12



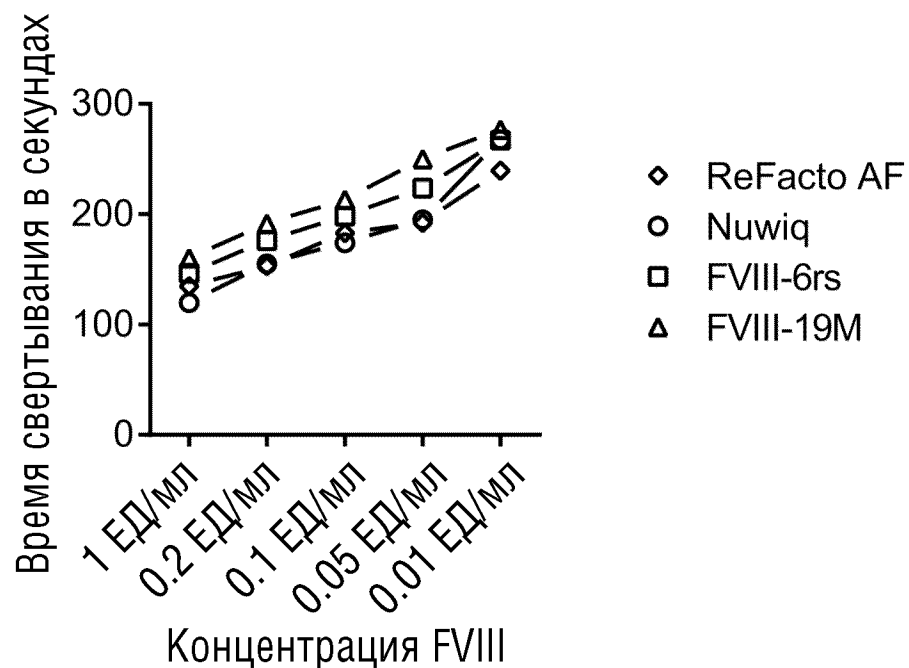
ФИГ.14А

Варианты	A1							A1A2			A2					BA3	A3C2				Коагулянтная активн., хромогенная (%)	Коагулянтная активн., свертывающая (%)	Удельная коагулянтная активность (%)
FVIII-19M	N79S	S112 T	L160 S	L171 Q	V184 A	N233 D	I265T	N299 D	Y426 H	S507 E	F555 H	N616 E	L706 N	Y748 S		K1837 E	N2038 D	S2077 G	S2315 T	V2333 A	106.2	62.5	139.4
FVIII-18M	N79S	S112 T	L160 S	L171 Q	V184 A	N233 D	I265T	N299 D	Y426 H	S507 E	F555 H	N616 E	L706 N	Y748 S			N2038 D	S2077 G	S2315 T	V2333 A	156.2	108.3	139.7
FVIII-15M	N79S	S112 T	L160 S	L171 Q	V184 A	N233 D	I265T	N299 D	Y426 H	S507 E	F555 H	N616 E	L706 N	Y748 S		K1837 E					139.2	87.5	96.3
FVIII-A1- 7M	N79S	S112 T	L160 S	L171 Q	V184 A	N233 D	I265T														133.1	105.7	137.5
FVIII- A1A2-3M								N299 D	Y426 H	S507 E											218.2	207.4	163.6
FVIII-A2- 4M											F555 H	N616 E	L706 N	Y748 S							102.7	83.2	111.6
FVIII-BA3- 1M																K1837 E					83.0	x	78.4
FVIII- A3C2-4M																	N2038 D	S2077 G	S2315 T	V2333 A	99.5	101.6	153.3
FVIII- GOF1				L171 Q						S507 E				Y748 S						V2333 A	495.0	495.1	176.4
FVIII- GOF2				L171 Q				N299 D				N616 E								V2333 A	227.6	236.1	190.7
FVIII-LS1		S112 T								S507 E				Y748 S		K1837 E	N2038 D				199.4	165.6	119.1
FVIII-LS2		S112 T							Y426 H						N754 D	K1837 E	N2038 D				71.8	104.9	92.1

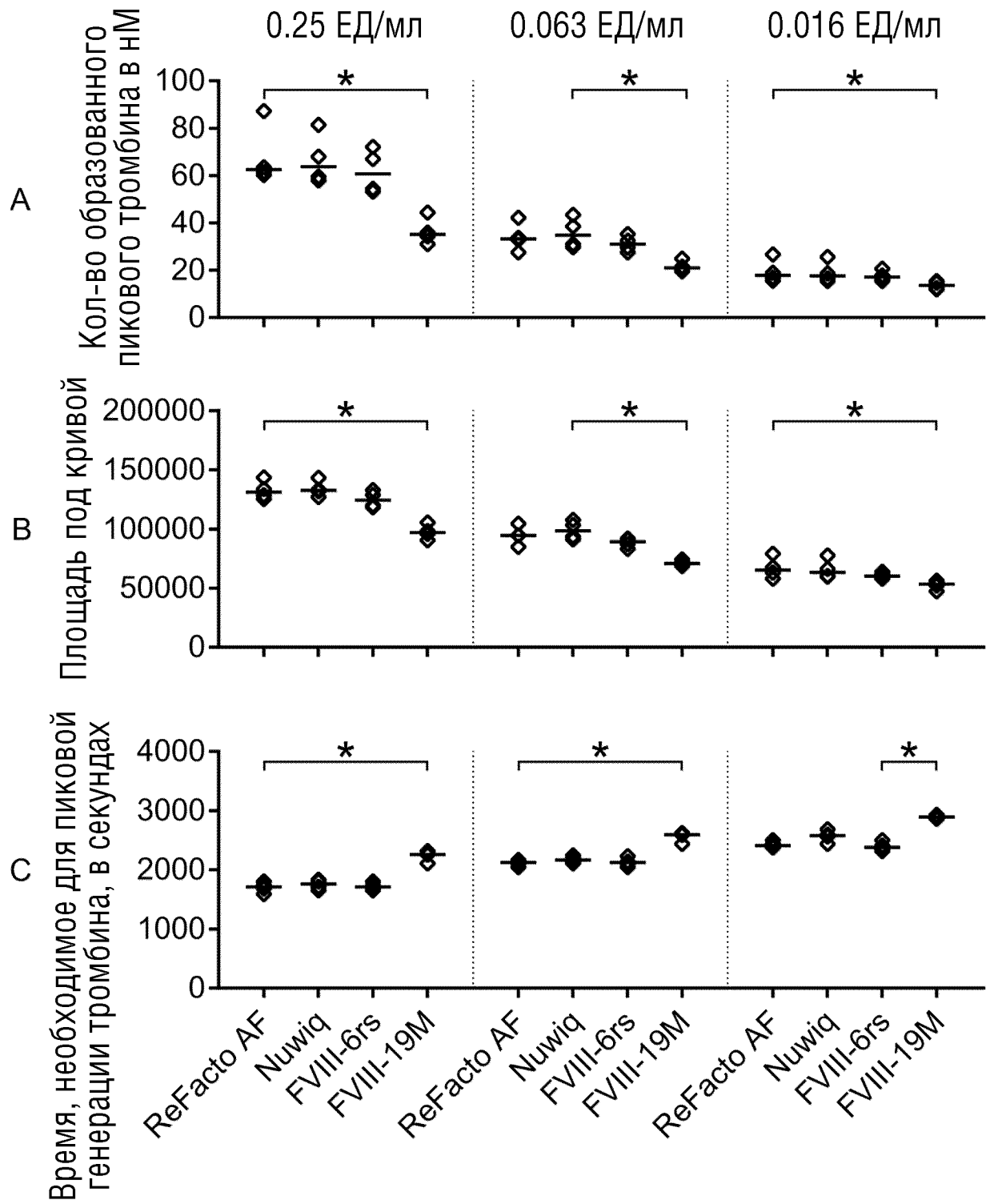
ФИГ.14В

Варианты	A2					A3C2					Коагулянтная активность, хромогенная (%)	Коагулянтная активность, свертывающая (%)	Удельная коагулянтная активность (%)
V1	F555 H		I632T		Y748 S						109.4	93.6	161.5
V2	F555 H			L706 N	Y748 S						113.8	90.6	123.9
V3	F555 H	N616 E		L706 N							89.0	104.4	100.9
V4	F555 H	N616 E			Y748 S						143.3	118.1	148.0
V5		N616 E	I632T		Y748 S						88.2	62.3	130.2
V6		N616 E		L706 N	Y748 S						103.9	98.6	146.7
V7						N2038 D	S2077 G		S2315 T		127.11	146.4	157.1
V8							S2077 G	K2258 Q	S2315 T		85.37	55.8	111.1
V9							S2077 G		S2315 T	V2333 A	132.6	119.8	174.3

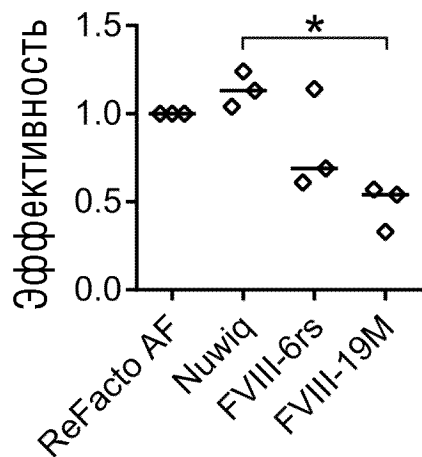
ФИГ.15



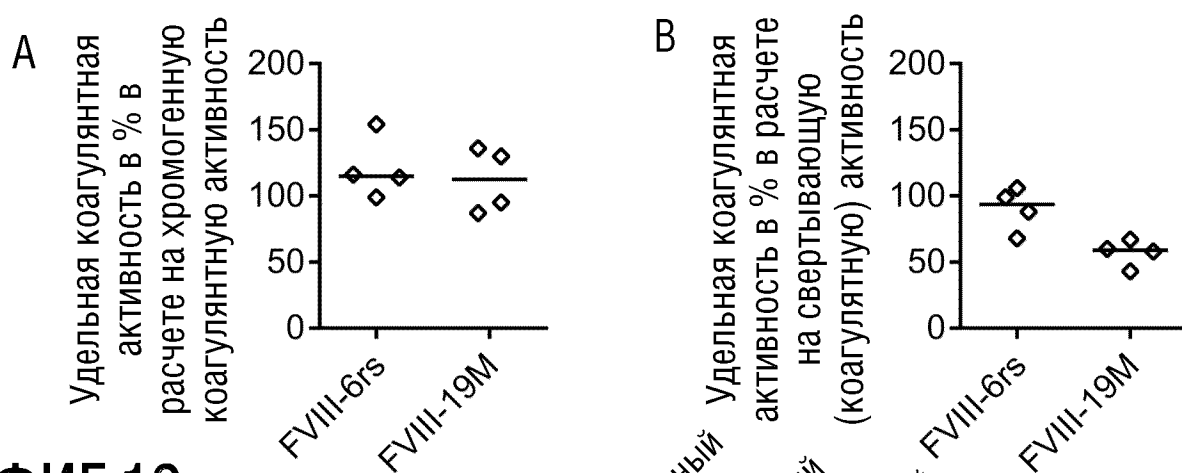
ФИГ.16



ФИГ.17

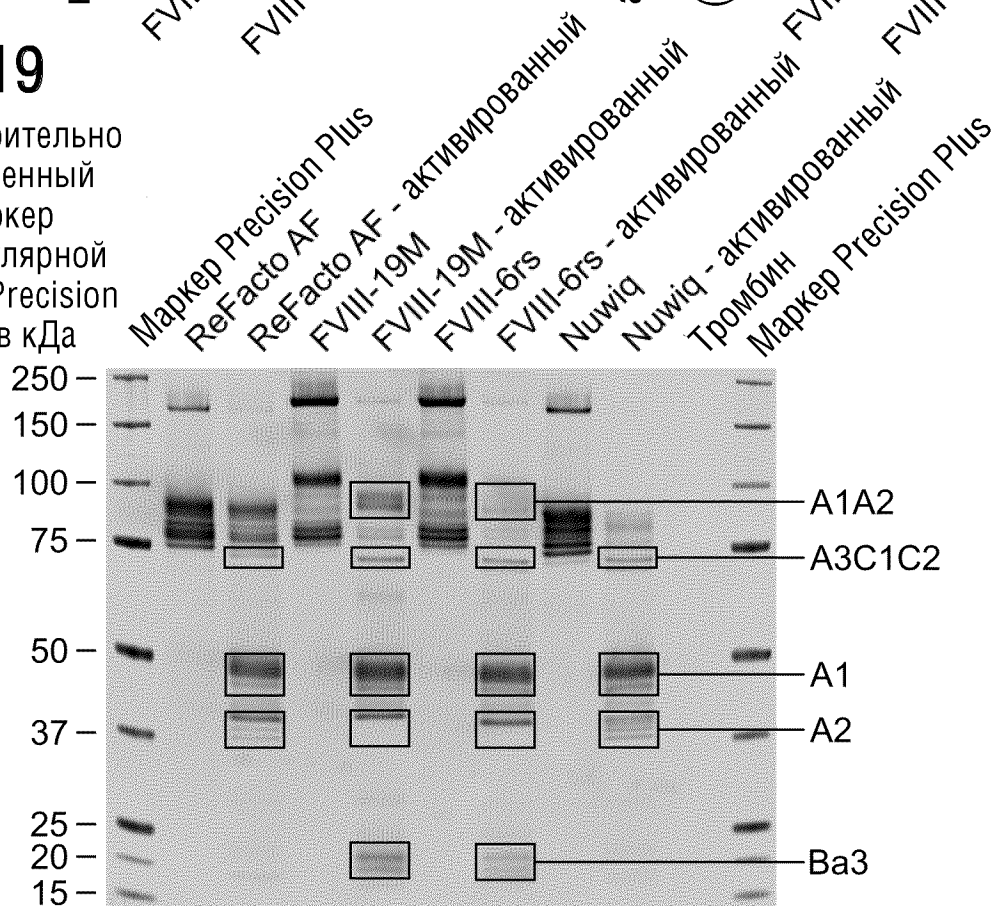


ФИГ.18

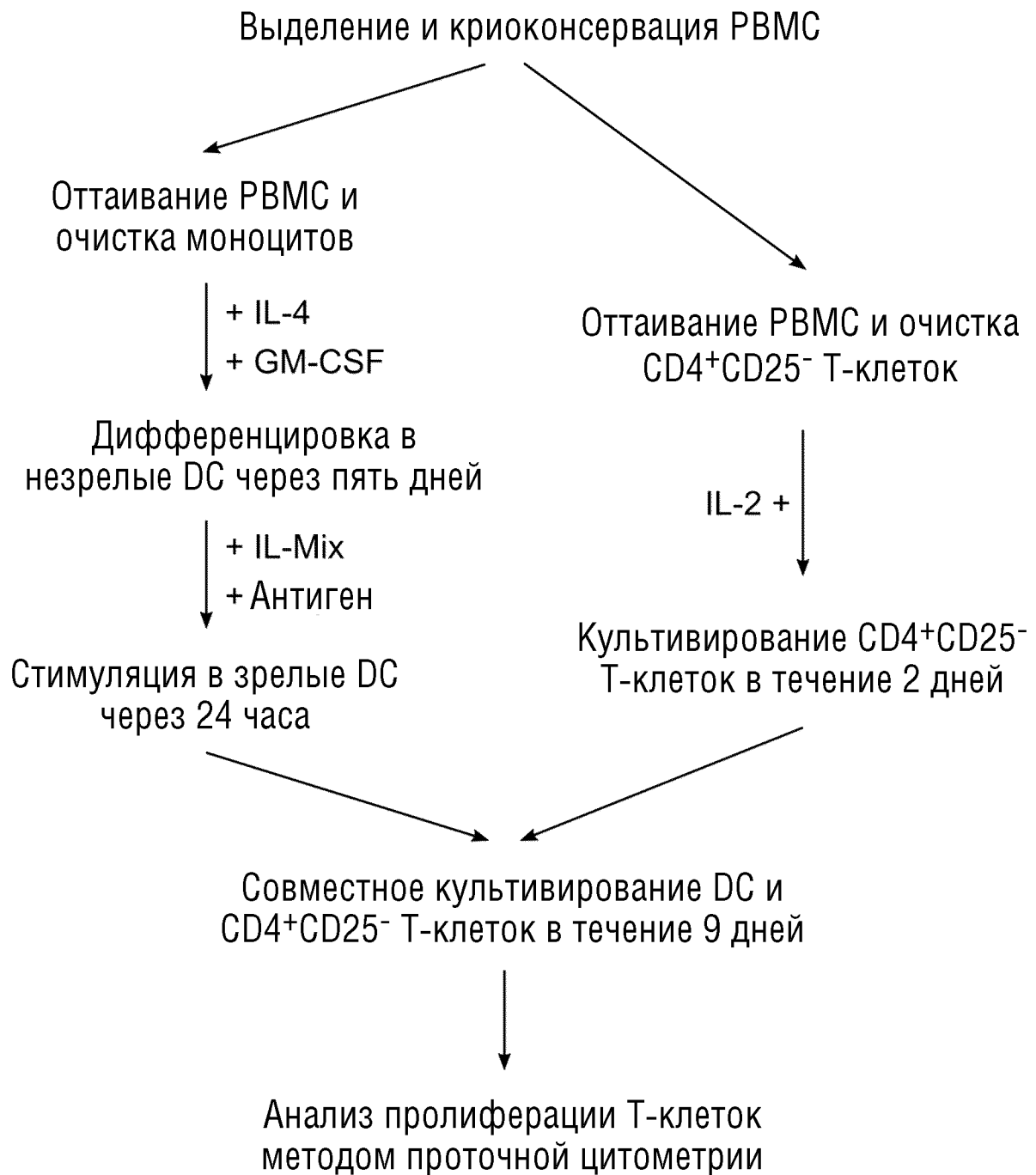


ФИГ.19

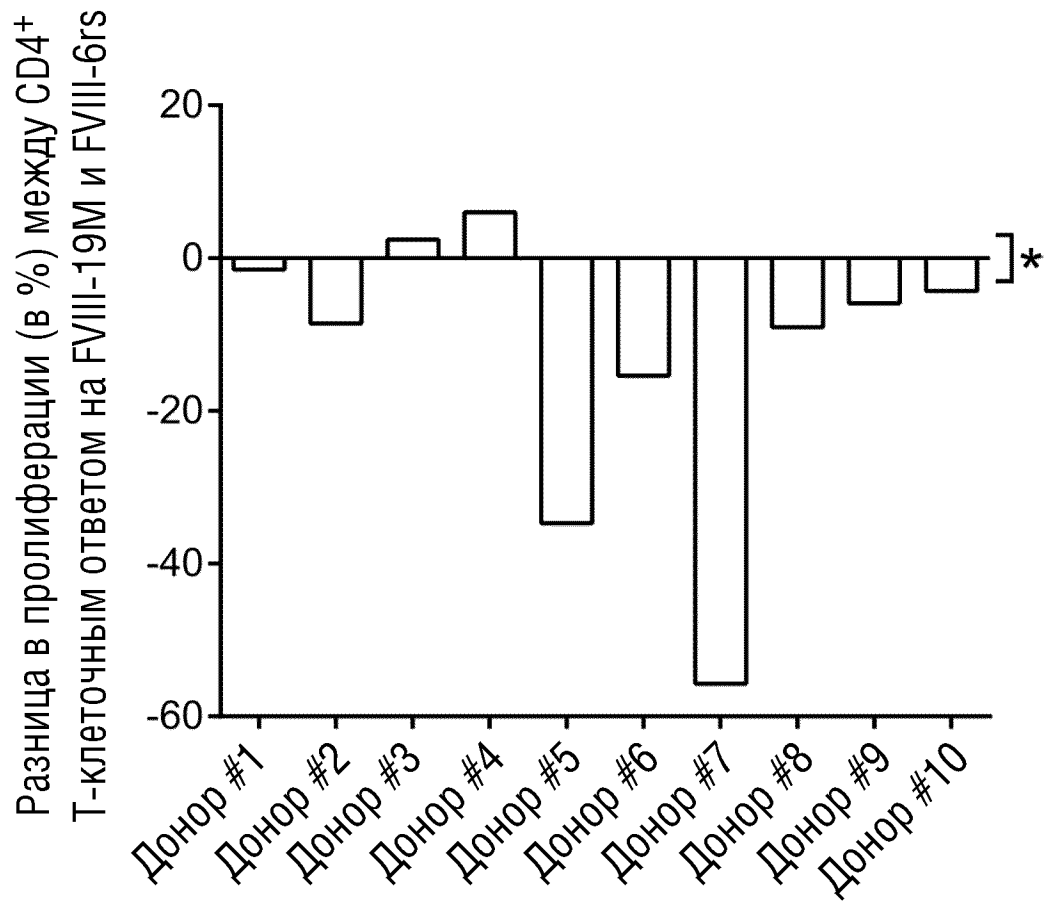
Предварительно
окрашенный
маркер
молекулярной
массы Precision
Plus в кДа



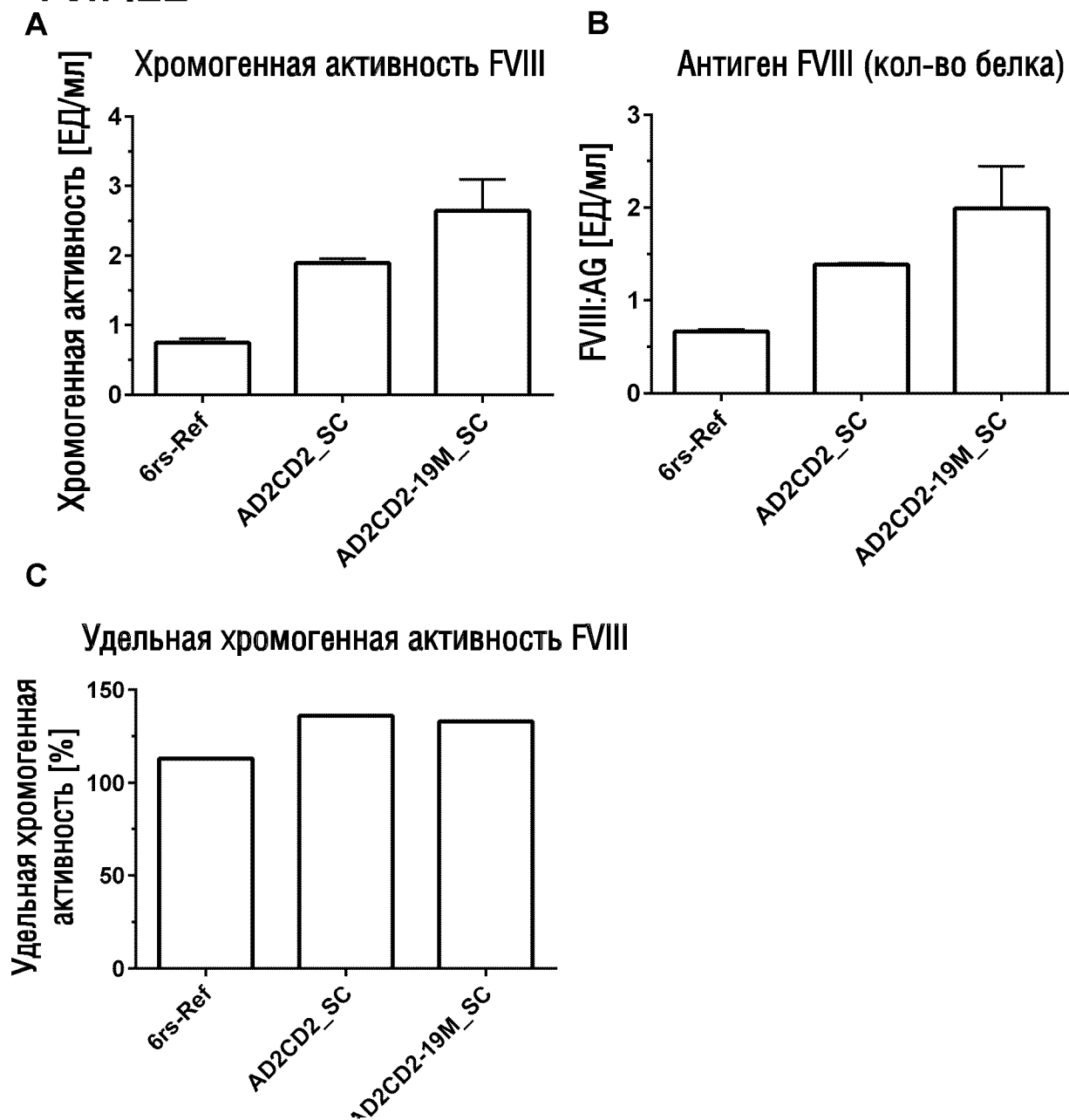
ФИГ.20



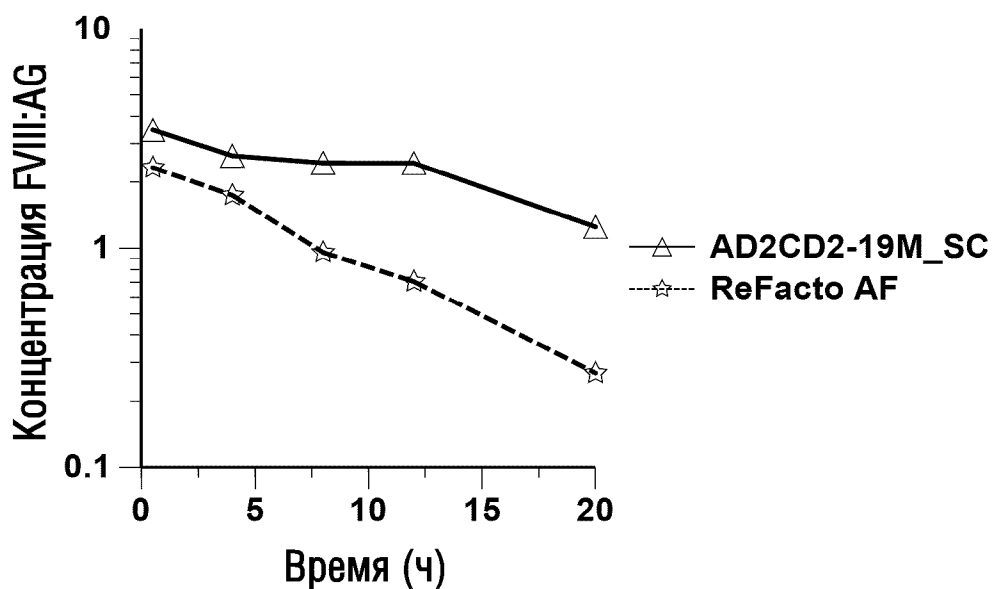
ФИГ.21



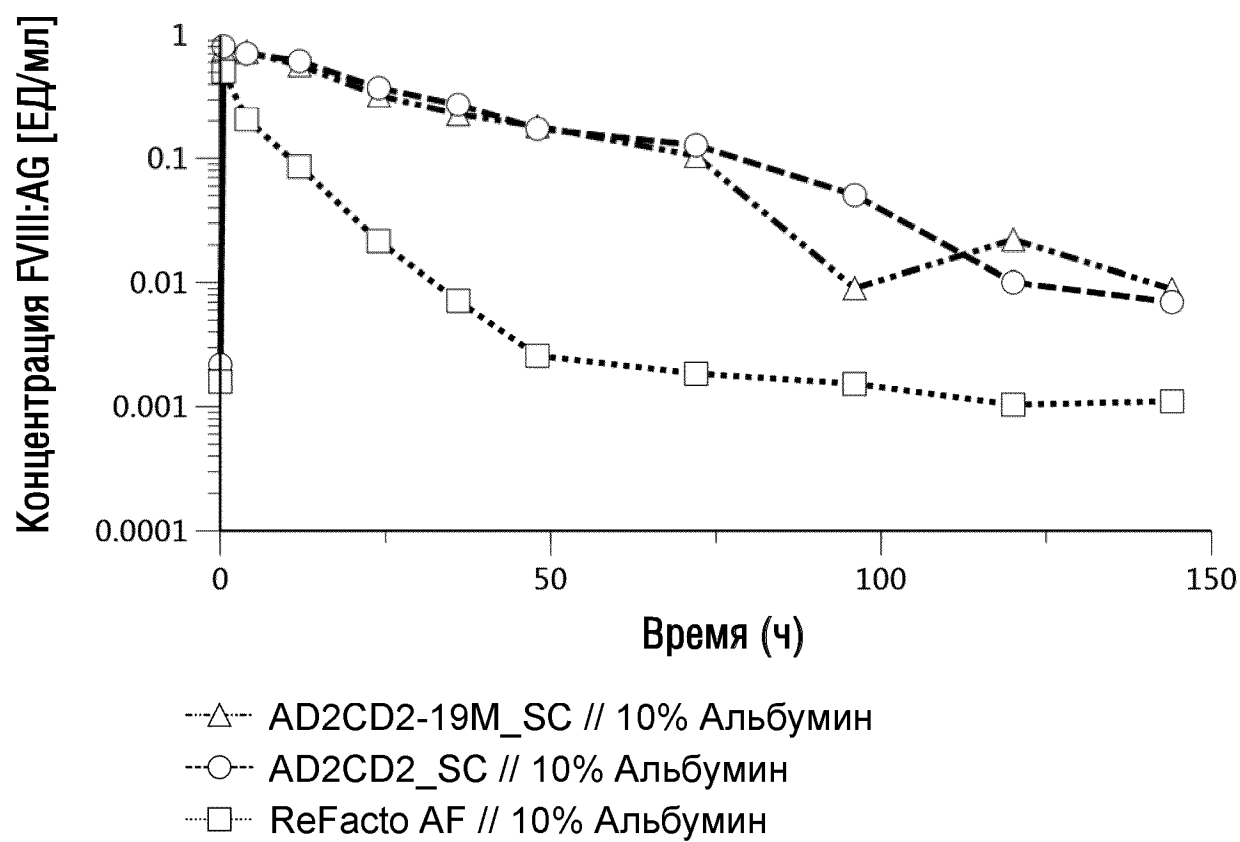
ФИГ.22



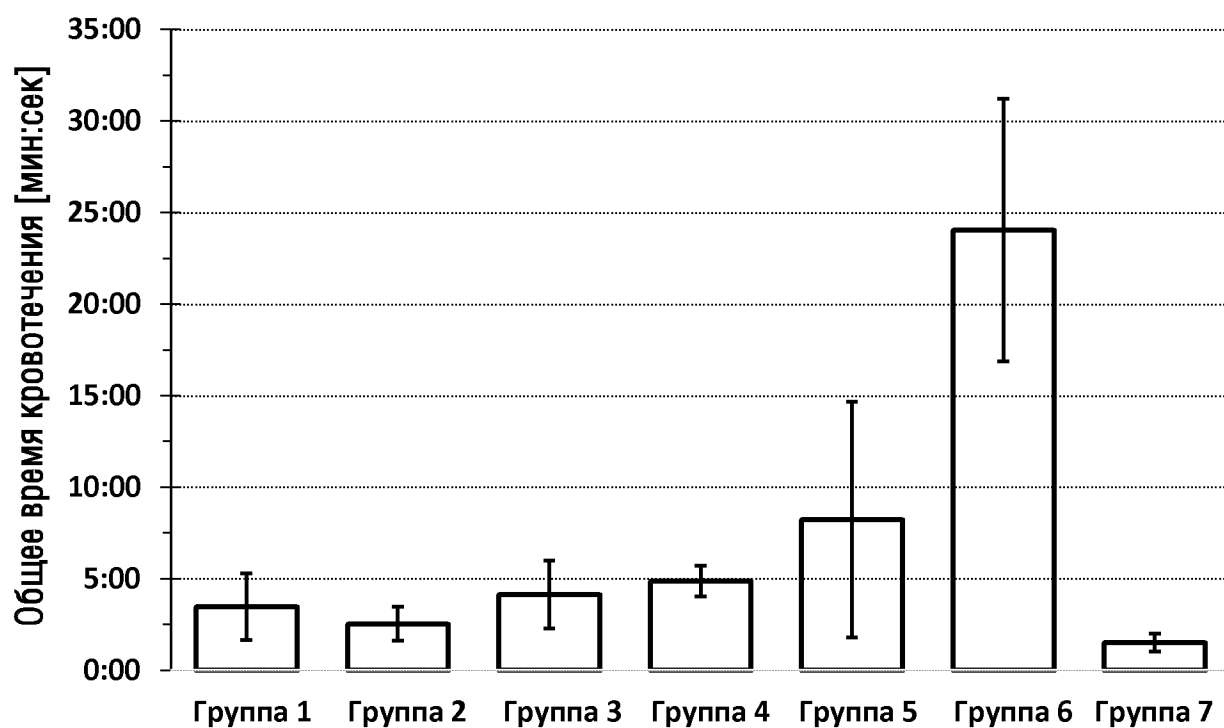
ФИГ.23



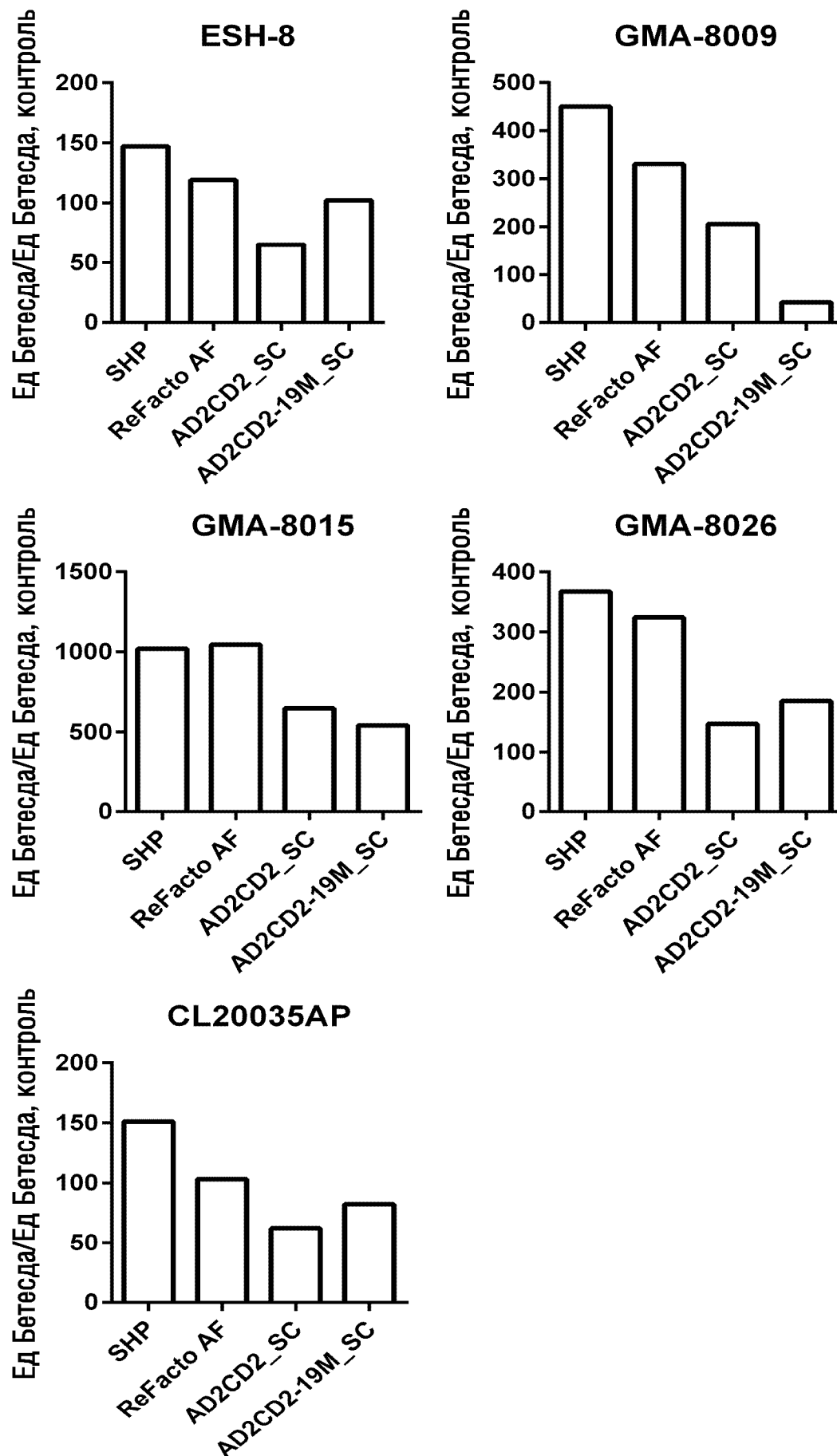
ФИГ.24



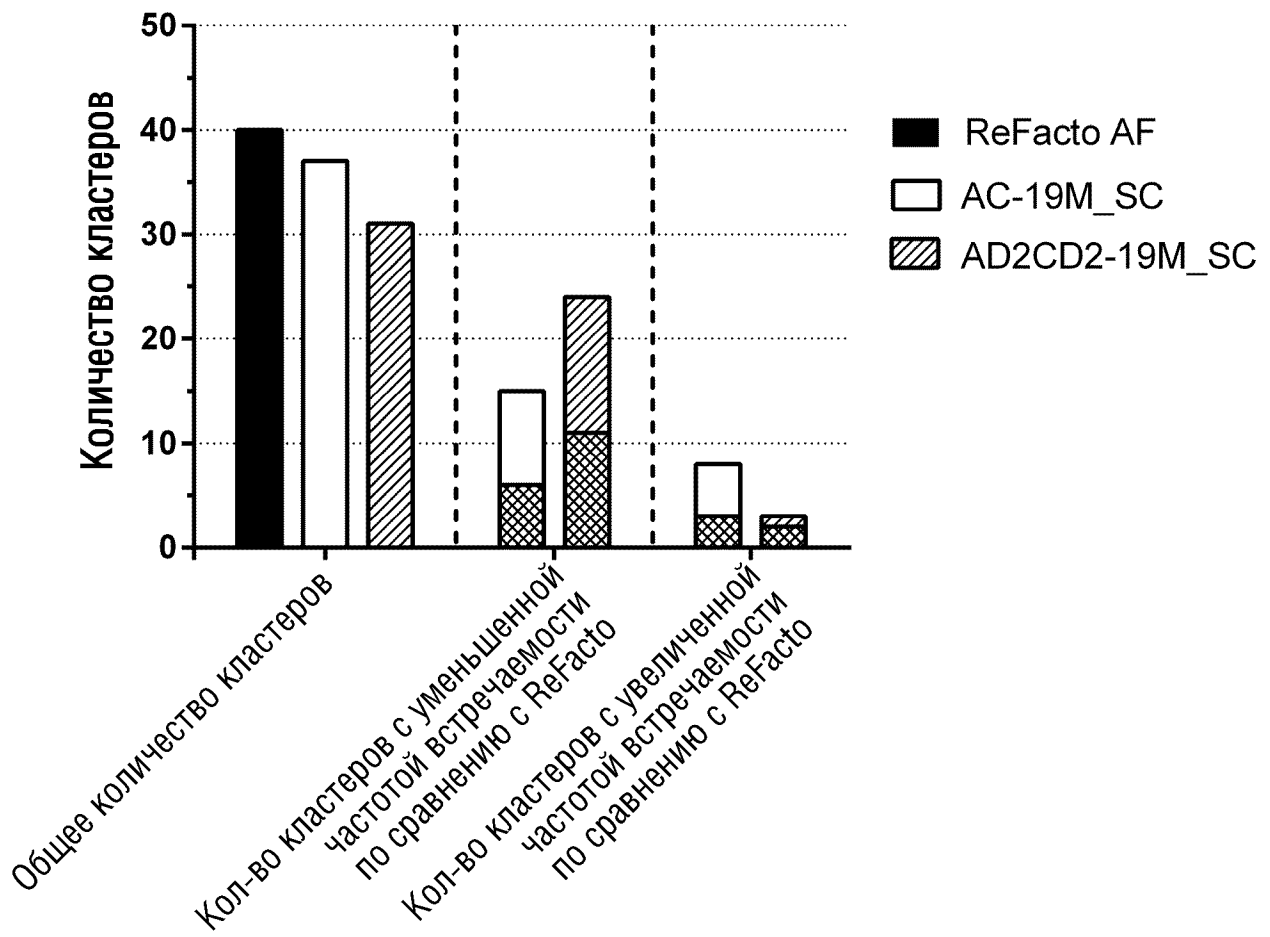
ФИГ.25



ФИГ.26



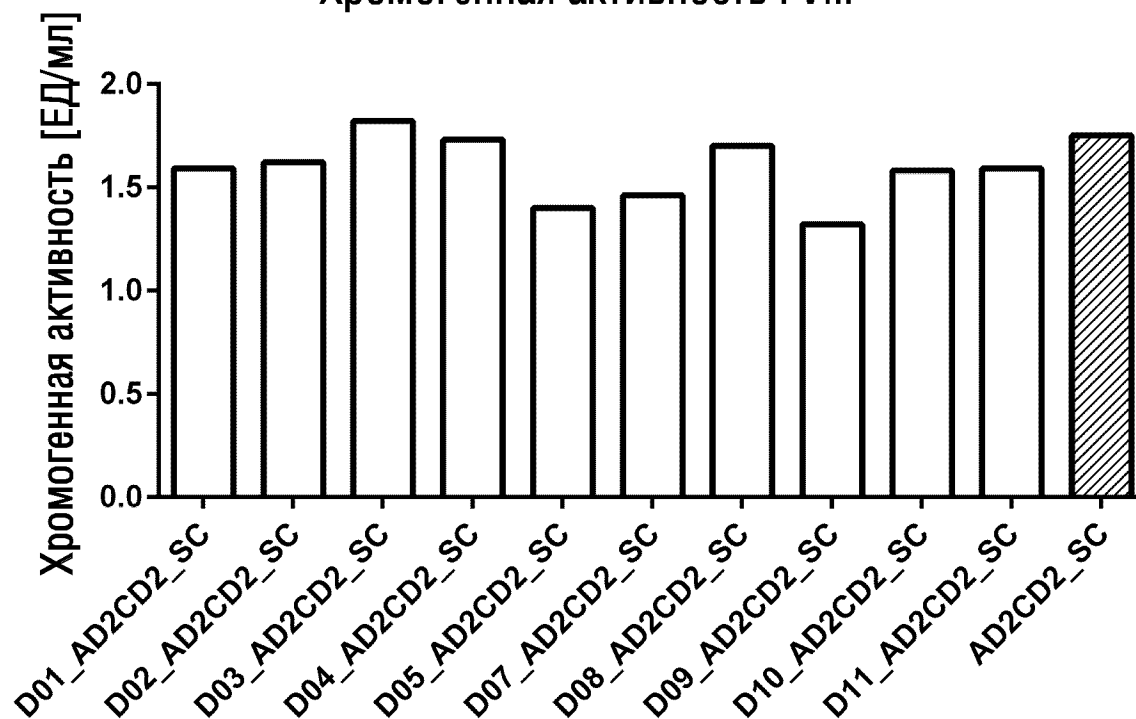
ФИГ.27



ФИГ.28

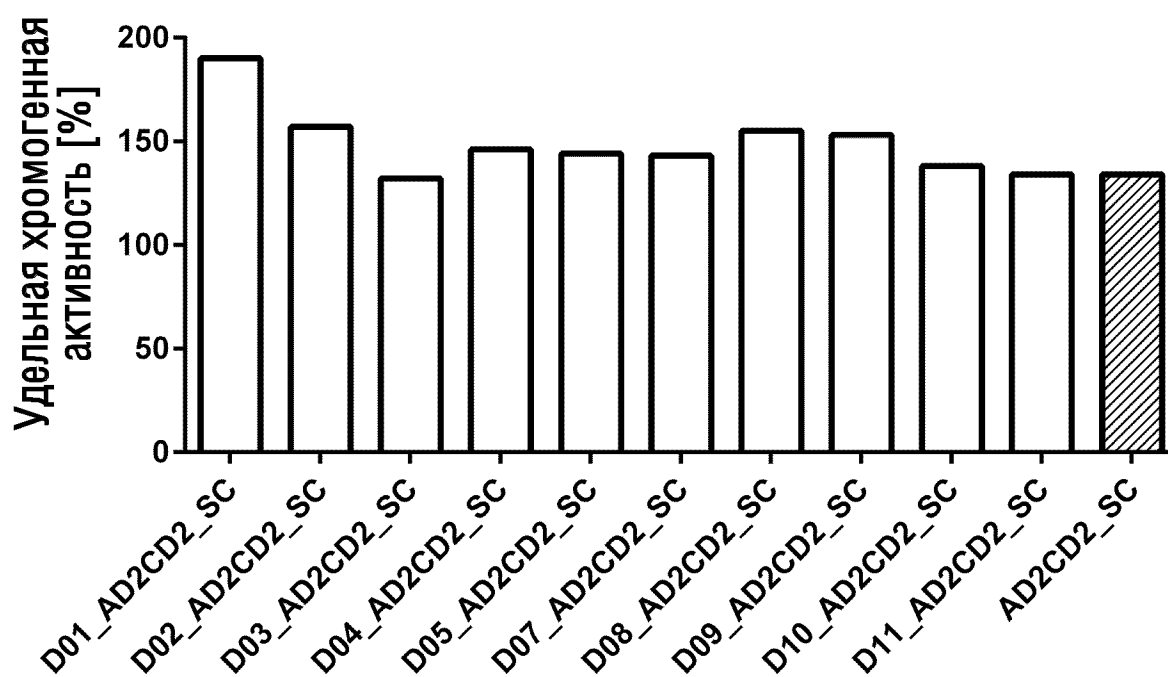
А

Хромогенная активность FVIII



В

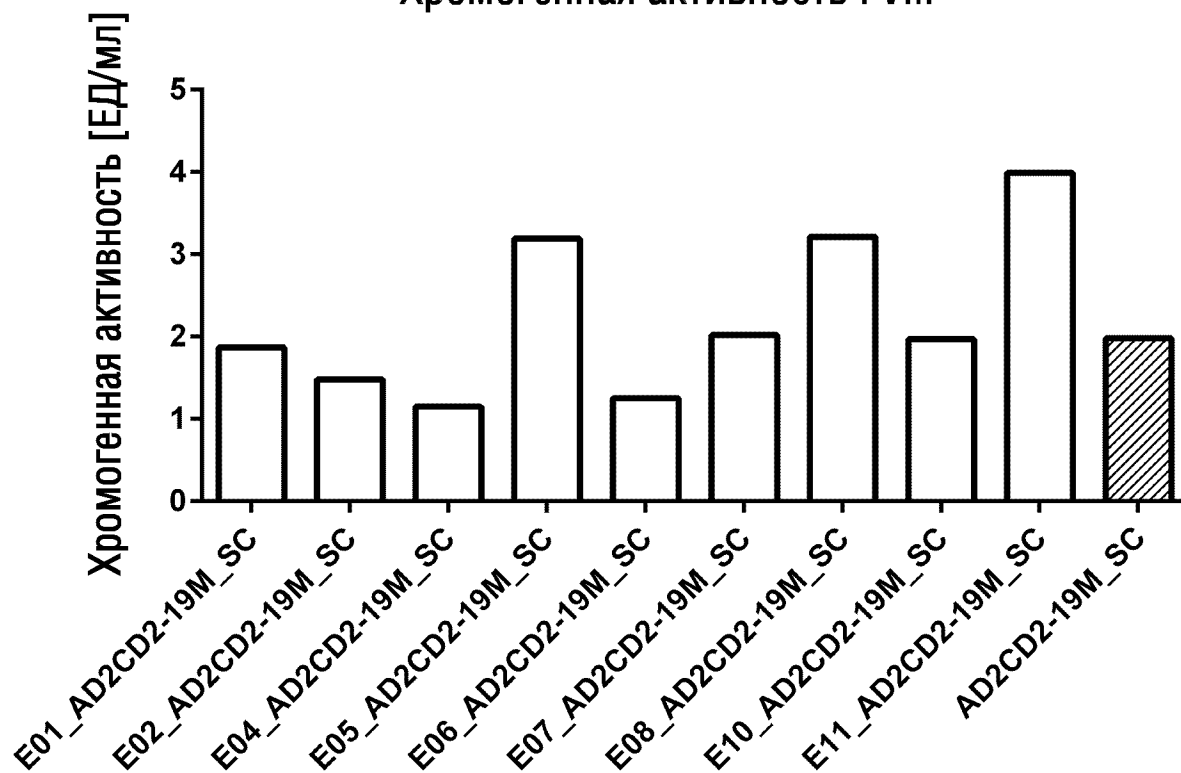
Удельная хромогенная активность FVIII



ФИГ.28, продолжение

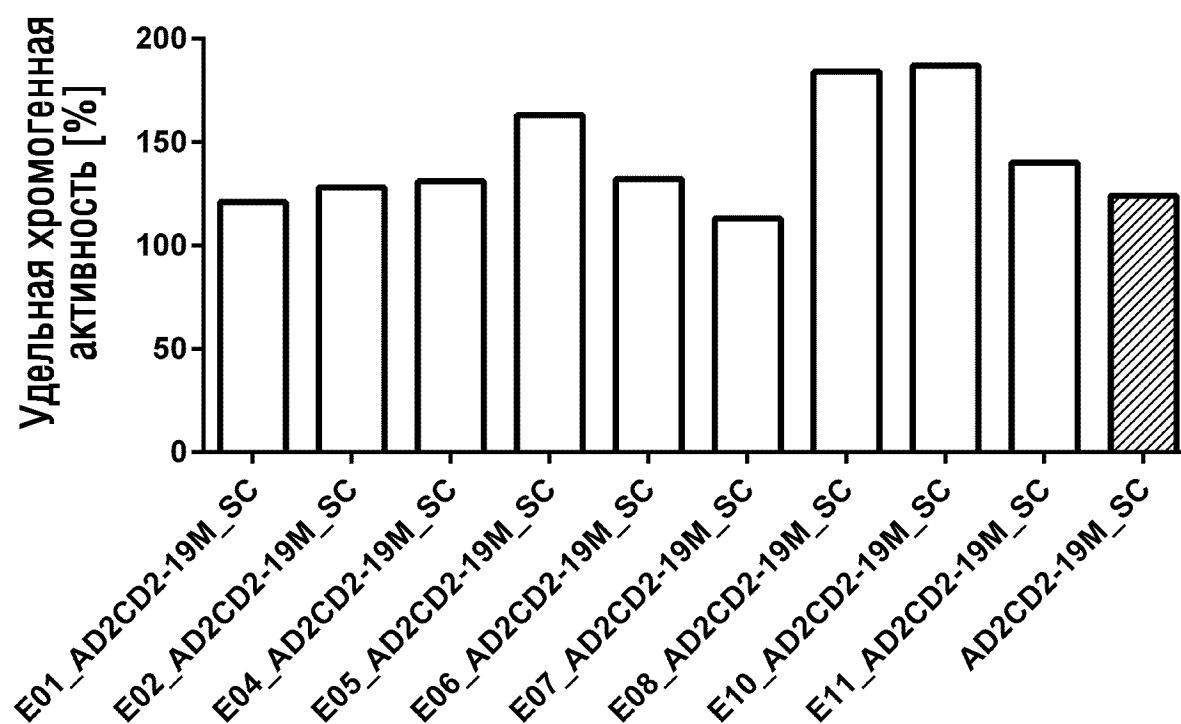
C

Хромогенная активность FVIII

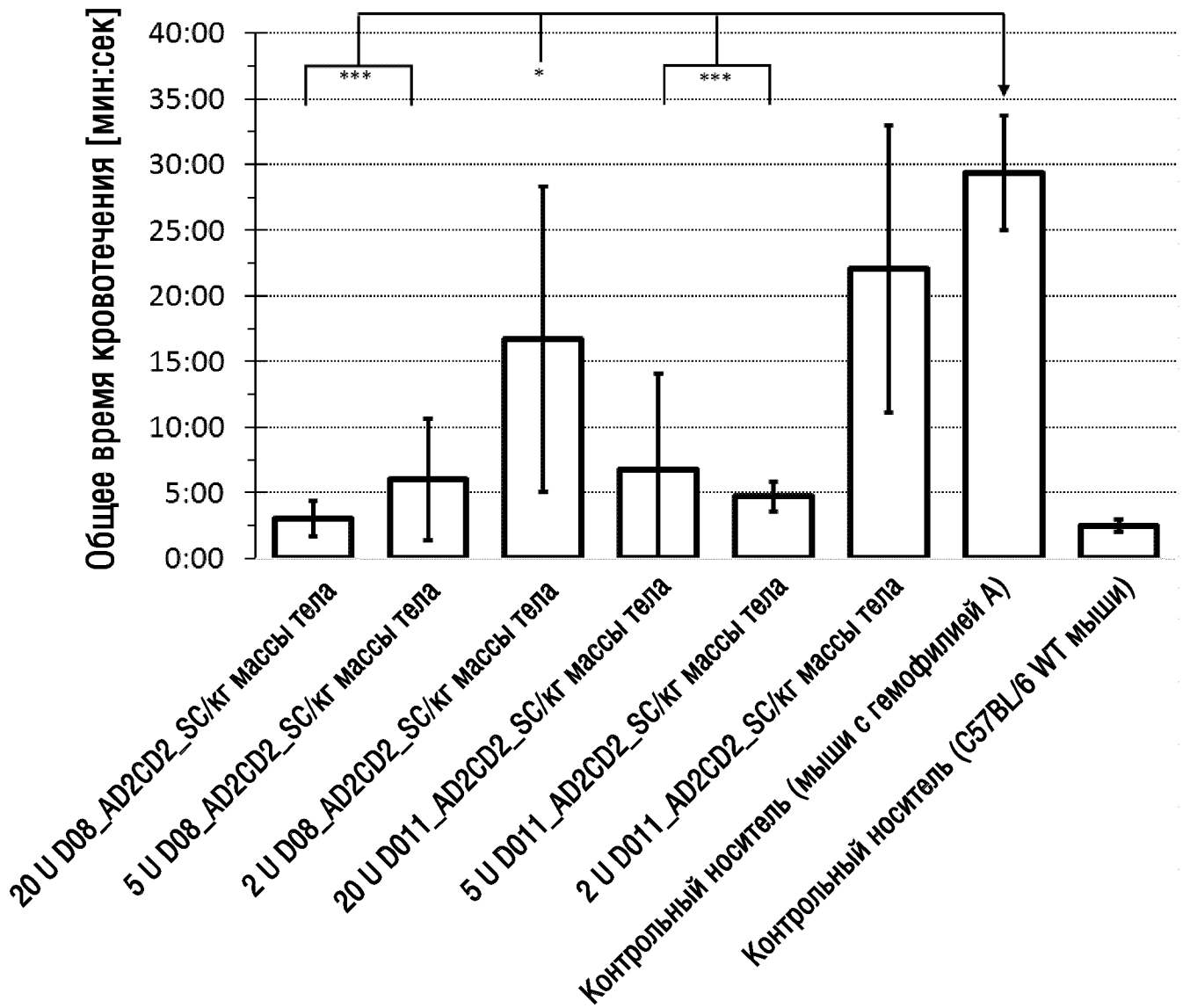


D

Удельная хромогенная активность FVIII

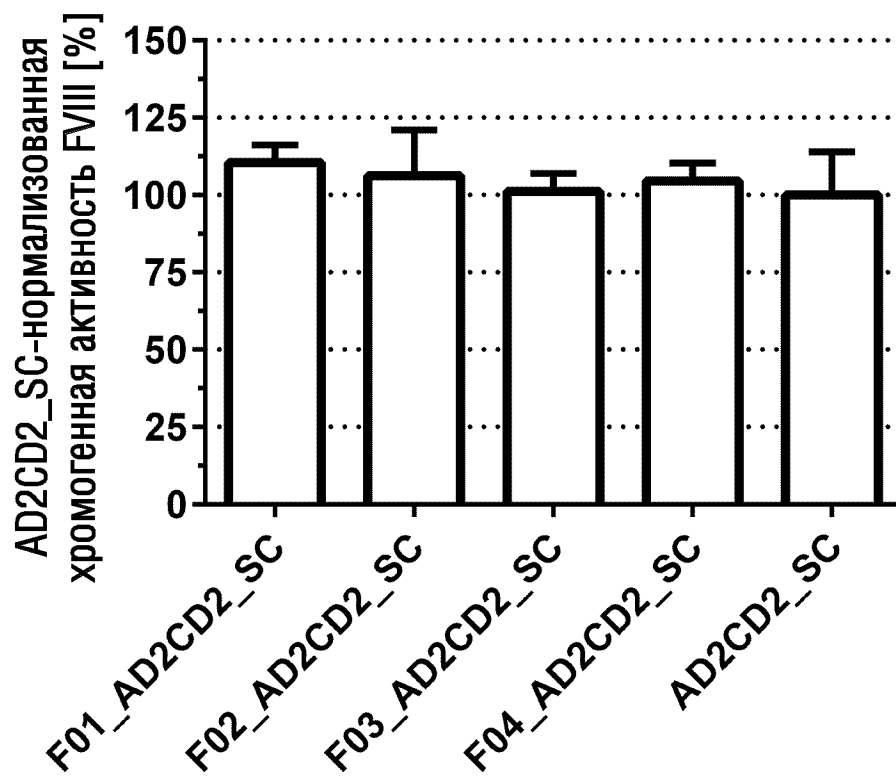


ФИГ.29



ФИГ.30

А Нормализованная хромогенная активность FVIII



В Нормализованные уровни антигена FVIII

