

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042955**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.04.07

(21) Номер заявки
201792485

(22) Дата подачи заявки
2013.07.10

(51) Int. Cl. **A61K 38/37** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

(54) **СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ ИЛИ СОСТОЯНИЯ, СВЯЗАННОГО С КРОВОТЕЧЕНИЯМИ, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЛЕКСА ФАКТОРА VIII С ХТЕН И БЕЛКОМ ФАКТОРА ФОН ВИЛЛЕБРАНДА И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **61/670,401; 61/759,819; 61/801,504; 61/801,544; 61/827,158; 61/840,811**

(32) **2012.07.11; 2013.02.01; 2013.03.15; 2013.03.15; 2013.05.24; 2013.06.28**

(33) **US**

(43) **2018.08.31**

(62) **201590198; 2013.07.10**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БИОВЕРАТИВ ТЕРАПЬЮТИКС
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:
Чхабра Экта Сет, Лю Тоняо, Чан Пэй-Юнь, Петерс Роберт Т., Кулман Джон (US)

(74) Представитель:
Строкова О.В. (RU)

(56) WO-A2-2011060242
VOLKER SCHELLENBERGER et al.: "A recombinant polypeptide extends the in vivo half-life of peptides and proteins in a tunable manner", Nature Biotechnology, 2009, vol. 27, № 12, p. 1186-1192, реферат, фиг. 1, с. 1189, кол. 2, абзац 2
US-A1-20030212253
WO-A1-2011101242
WO-A1-2011028229

(57) Предложены варианты способов лечения заболевания или состояния, связанного с кровотечениями, у субъекта, нуждающегося в этом, включающие введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей (а) химерный белок, содержащий (i) фрагмент фактора фон Виллебранда (VWF), содержащий домен D' и домен D3 фактора фон Виллебранда, (ii) первую удлиненную полипептидную последовательность ХТЕН и (iii) белок фактора VIII (FVIII); и (b) фармацевтически приемлемый носитель; при этом VWF фрагмент и первая последовательность ХТЕН связаны, причем VWF фрагмент или первая последовательность ХТЕН связаны с белком FVIII; VWF фрагмент, белок FVIII и первая последовательность ХТЕН содержат такие аминокислотные последовательности, как указано в формуле изобретения. Полипептидная цепь, содержащая VWF фрагмент фактора фон Виллебранда, согласно настоящему изобретению связывается с полипептидной цепью, содержащей белок FVIII, связанный с последовательностью ХТЕН, и указанная полипептидная цепь, содержащая VWF фрагмент фактора, может предотвращать или ингибировать связывание VWF эндогенного фактора фон Виллебранда с белком FVIII, связанным с последовательностью ХТЕН. Путем предотвращения или ингибирования связывания VWF эндогенного фактора фон Виллебранда с белком FVIII, который является фактором, ограничивающим период полувыведения FVIII, VWF фрагмент может индуцировать увеличение периода полувыведения химерного белка, содержащего белок FVIII.

042955 B1

042955 B1

Уровень техники

Гемофилия А представляет собой нарушение, связанное с кровотечением, вызываемое дефектами гена, кодирующего фактор свертывания крови VIII (FVIII), она поражает 1-2 из 10000 рожденных мальчиков. Graw et al., *Nat. Rev. Genet.*, 6(6):488-501 (2005). Пациентов, страдающих гемофилией А, можно лечить инфузиями очищенного или полученного рекомбинантным способом FVIII. Однако известно, что все коммерчески доступные продукты FVIII имеют период полувыведения, составляющий примерно 8-12 ч, что требует частого внутривенного введения пациентам. См. Weiner, M.A. and Cairo, M.S., *Pediatric Hematology Secrets*, Lee, M.T., 12, *Disorders of Coagulation*, Elsevier Health Sciences, 2001; Lillicrap, D., *Thromb. Res.*, 122 Suppl, 4:S2-8 (2008). Кроме того, был испробован ряд подходов для увеличения периода полувыведения FVIII. Например, разрабатываемые в настоящее время подходы к увеличению периода полувыведения факторов свертывания крови включают пегилирование, гликопегилирование и конъюгацию с альбумином. См. Dumont et al., *Blood*, 119(13):3024-3030 (опубл. в интернете 13 января 2012 г.). Однако существуют данные о том, что независимо от используемой белковой инженерии длительно действующие продукты FVIII, разрабатываемые в настоящее время, имеют ограниченные периоды полувыведения - лишь примерно 1,5-2 ч в доклинических моделях у животных. См. указанный выше документ. Согласно результатам были продемонстрированы у людей, например, сообщали, что rFVIII_{Fc} увеличивает период полувыведения до ~1,7 раз по сравнению с АДВЕЙТ® у пациентов с гемофилией А. См. выше. Таким образом, данное увеличение периода полувыведения несмотря на небольшие улучшения может указывать на наличие других ограничивающих T_{1/2} факторов. См. Liu, T. et al., 2007, ISTH meeting, abstract #P-M-035; Henrik, A. et al., 2011, ISTH meeting, abstract #P=MO-181; Liu, T. et al., 2011, ISTH meeting abstract #P-WE-131.

Плазматический фактор фон Виллебранда (VWF) имеет период полувыведения, составляющий приблизительно 12 ч (в диапазоне от 9 до 15 ч) (http://www.nhlbi.nih.gov/guidelines/vwd/2_scientificoverview.htm (последнее посещение 22 октября 2011 г.)). На период полувыведения VWF может влиять ряд факторов: профиль гликозилирования, ADAMTS-13 (дезинтегрин и металлопротеаза с мотивом-13 тромбоспондина) и различные мутации в VWF.

В плазме крови 95-98% FVIII циркулирует в виде устойчивого нековалентного комплекса с полно-размерным VWF. Образование данного комплекса имеет важное значение для поддержания соответствующих уровней FVIII в плазме крови *in vivo*. Lenting et al., *Blood*, 92(11):3983-96 (1998); Lenting et al., *J. Thromb. Haemost.*, 5(7):1353-60 (2007). Полноразмерный FVIII дикого типа в основном присутствует в виде гетеродимера, содержащего тяжелую цепь (ММ 200 кДа) и легкую цепь (ММ 73 кДа). Когда FVIII активируется в результате протеолиза в положениях 372 и 740 в тяжелой цепи и в положении 1689 в легкой цепи, VWF, связанный с FVIII, освобождается от активированного FVIII. Активированный FVIII вместе с активированным фактором IX, кальцием и фосфолипидом ("теназный комплекс") индуцирует активацию фактора X, в результате чего вырабатываются большие количества тромбина. Затем тромбин, в свою очередь, расщепляет фибриноген с образованием растворимых мономеров фибрина, которые затем спонтанно полимеризуются с образованием растворимого полимера фибрина. Тромбин также активирует фактор XIII, который вместе с кальцием служит для перекрестного сшивания и стабилизации растворимого полимера фибрина, образуя перекрестно сшитый (нерастворимый) фибрин. Активированный FVIII быстро выводится из кровообращения вследствие протеолиза.

Из-за частого дозирования и неудобства, вызываемого режимом дозирования, по-прежнему существует необходимость в разработке продуктов FVIII, требующих менее частого введения, т.е. продукта FVIII, имеющего период полувыведения, который больше 1,5-2-кратного предела периода полувыведения.

Краткое описание изобретения

В одном аспекте изобретения предложен способ лечения заболевания или состояния, связанного с кровотечениями, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей

(a) химерный белок, содержащий

(i) фрагмент фактора фон Виллебранда (VWF), содержащий домен D' и домен D3 фактора фон Виллебранда,

(ii) первую удлиненную полипептидную последовательность XTEN, и

(iii) белок фактора VIII (FVIII); и

(b) фармацевтически приемлемый носитель;

при этом VWF фрагмент и первая последовательность XTEN связаны, причем VWF фрагмент или первая последовательность XTEN связана с белком FVIII; и причем

(a) VWF фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 100;

(b) белок FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 или 6; или белок FVIII содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь белка FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 1-745 последовательности SEQ ID NO: 4, и лег-

кая цепь белка FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 1649-2332 последовательности SEQ ID NO: 4; и

(c) первая последовательность XTEN содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136 или SEQ ID NO: 137.

В некоторых вариантах осуществления химерный белок содержит

(a) единственную полипептидную цепь, содержащую VWF фрагмент, последовательность XTEN и белок FVIII; или

(b) две полипептидные цепи, содержащие первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где первая полипептидная цепь содержит белок FVIII, а вторая полипептидная цепь содержит VWF фрагмент и последовательность XTEN.

В некоторых вариантах осуществления химерный белок дополнительно содержит (iv) константную область иммуноглобулина (Ig) или ее часть, связанную либо с VWF фрагментом, первой последовательностью XTEN, либо с белком FVIII или их любой комбинацией.

В другом аспекте изобретения предложен способ лечения заболевания или состояния, связанного с кровотечениями, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок и фармацевтически приемлемый носитель, причем химерный белок содержит формулу, включающую

- (a) V-X-FVIII;
- (b) FVIII-X-V;
- (c) V-X:FVIII;
- (d) X-V:FVIII;
- (e) FVIII:V-X;
- (f) FVIII:X-V;
- (g) V-L2-X-L1-F1:FVIII-L3-F2;
- (h) V-L2-X-L1-F1:F2-L3-FVIII;
- (i) F1-L1-X-L2-V:FVIII-L3-F2;
- (j) F1-L1-X-L2-V:F2-L3-FVIII;
- (k) V-L2-X-L1-F1-L4-FVIII-L3-F2;
- (l) F2-L3-FVIII-L4-F1-L1-X-L2-V;
- (m) FVIII-L3-F2-L4-V-L2-X-L1-F1; и
- (n) F1-L1-X-L2-V-L4-F2-L3-FVIII,

где V содержит VWF фрагмент,
каждый из L1, L2 и L3 содержит линкер,

L4 представляет собой линкер,

FVIII содержит белок FVIII,

X содержит одну или более последовательностей XTEN,

F1 содержит константную область Ig или ее часть,

F2 содержит дополнительную константную область Ig или ее часть,

(-) представляет собой пептидную связь или одну или более аминокислот, и

(:) представляет собой ковалентную связь или нековалентную связь.

В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или ее часть содержит первую область Fc, которая связана с последовательностью XTEN или VWF фрагментом.

В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или ее часть связана с последовательностью XTEN линкером.

В некоторых вариантах осуществления указанный линкер включает расщепляемый линкер.

В некоторых вариантах осуществления химерный белок содержит также дополнительную константную область Ig или ее часть.

В некоторых вариантах осуществления дополнительная константная область Ig или ее часть содержит вторую область Fc.

В некоторых вариантах осуществления дополнительная константная область Ig или ее часть связана с белком FVIII.

В некоторых вариантах осуществления вторая область Fc дополнительно связана с VWF фрагментом линкером.

В некоторых вариантах осуществления дополнительная константная область Ig или ее часть связана

с константной областью Ig или ее частью.

В некоторых вариантах осуществления дополнительная константная область Ig или ее часть связана с константной областью Ig или ее частью ковалентной связью.

В некоторых вариантах осуществления указанная ковалентная связь представляет собой дисульфидную связь.

В некоторых вариантах осуществления VWF фрагмент связан с белком FVIII нековалентной связью.

В некоторых вариантах осуществления способ содержит вторую последовательность XTEN, соединенную с белком FVIII линкером на N-конце или C-конце белка FVIII, или встроенную непосредственно ниже от одного или более сайтов встраивания в белке FVIII.

В еще одном аспекте предложен способ лечения заболевания или состояния, связанного с кровотечениями, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок и фармацевтически приемлемый носитель, причем химерный белок содержит формулу, включающую

- (1) FVIII(X1)-L1-F1-V-L2-X2-L3-F2;
- (2) FVIII(X1)-L1-F1:F2-L3-X2-L2-V;
- (3) F1-L1-FVIII(X1):V-L2-X2-L3-F2;
- (4) F1-L1-FVIII(X1);F2-L3-X2-L2-V;
- (5) FVIII(X1)-L1-F1-L4-V-L2-X2-L3-F2;
- (6) FVIII(X1)-L1-F1-L4-F2-L3-X2-L2-V;
- (7) F1-L1-FVIII(X1)-L4-V-L2-X2-L3-F2 или
- (8) F1-L1-FVIII(X1)-L4-F2-L3-X2-L2-V,

где FVIII(X1) содержит белок FVIII и последовательность XTEN, при этом указанная последовательность XTEN связана с N-концом или C-концом белка FVIII или встроена непосредственно ниже одной или более аминокислот ("один или более сайтов встраивания") в белке FVIII,

каждый из L1, L2 и L3 представляет собой линкер,

L4 представляет собой линкер,

X2 содержит одну или более последовательностей XTEN,

F1 содержит константную область Ig или ее часть,

F2 содержит дополнительную константную область Ig или ее часть, и

V содержит VWF фрагмент;

(-) представляет собой пептидную связь или одну или более аминокислот, и

(:) содержит ковалентную связь или нековалентную связь.

В некоторых вариантах осуществления константная область Ig или ее часть и дополнительная константная область Ig или ее часть являются одинаковыми или разными.

В еще одном аспекте предложен способ лечения заболевания или состояния, связанного с кровотечениями, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок и фармацевтически приемлемый носитель, причем химерный белок содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, при этом указанная первая полипептидная цепь содержит белок FVIII и первую константную область Ig или ее часть, и указанная вторая полипептидная цепь содержит VWF фрагмент, первую последовательность XTEN и вторую константную область Ig или ее часть; и причем

(a) VWF фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 100;

(b) белок FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 или 6; или белок FVIII содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь белка FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 1-740 последовательности SEQ ID NO: 4, и легкая цепь белка FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 1649-2332 последовательности SEQ ID NO: 4; и

(c) первая последовательность XTEN содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155 или SEQ ID NO: 156.

В другом аспекте изобретения предложен способ лечения заболевания или состояния, связанного с кровотечениями, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок и фармацевтически приемлемый носитель, причем химерный белок содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, при этом указанная первая полипептидная цепь содержит фрагмент VWF, первую последовательность XTEN, первую константную область Ig или ее часть, и указанная вторая полипептидная цепь содержит белок FVIII,

вторую последовательность XTEN и вторую константную область Ig или ее часть; и причем

(a) VWF фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 100;

(b) белок FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 или 6; или белок FVIII содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь белка FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 1-740 последовательности SEQ ID NO: 4, и легкая цепь белка FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 1649-2332 последовательности SEQ ID NO: 4; и

(c) первая последовательность XTEN содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155 или SEQ ID NO: 156.

В некоторых вариантах осуществления вторая последовательность XTEN встроена в один или более сайтов встраивания в белке FVIII, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков в табл. 7, 8, 9 и 10. В некоторых вариантах осуществления белок FVIII содержит домен В или его часть. В некоторых вариантах осуществления белок FVIII представляет собой FVIII с делецией домена SQ В.

В некоторых вариантах осуществления белок FVIII

(i) содержит домен В или его часть; или

(ii) представляет собой FVIII с делецией домена SQ В, и

причем вторая последовательность XTEN встроена в домен В или его часть.

В некоторых вариантах осуществления белок FVIII содержит одноцепочечный FVIII, и указанный одноцепочечный FVIII содержит по меньшей мере одну замену аминокислоты в остатке, соответствующем остатку 1648, остатку 1645 или обоим в полноразмерном зрелом полипептиде FVIII (SEQ ID NO: 4) или остатку 754, остатку 751 или обоим в SQ BDD FVIII (SEQ ID NO: 6).

В некоторых вариантах осуществления VWF фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотам с 764 по 1240 последовательности SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления VWF фрагмент по существу состоит из или состоит из аминокислот с 764 по 1240 последовательности SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления VWF фрагмент содержит замену остатка, соответствующего остатку 1099, остатку 1142 или как остатку 1099, так и остатку 1142 последовательности SEQ ID NO: 2, аминокислотой, отличной от цистеина. В некоторых вариантах осуществления VWF фрагмент по существу состоит из или состоит из домена D' и домена D3 фактора фон Виллебранда или их фрагментов. В некоторых вариантах осуществления VWF фрагмент не содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

(1) аминокислот 1241-2813 последовательности SEQ ID NO: 2,

(2) аминокислот 1270-2813 последовательности SEQ ID NO: 2,

(3) аминокислот 1271-2813 последовательности SEQ ID NO: 2,

(4) аминокислот 1272-2813 последовательности SEQ ID NO: 2,

(5) аминокислот 1273-2813 последовательности SEQ ID NO: 2,

(6) аминокислот 1274-2813 последовательности SEQ ID NO: 2,

и любых их комбинаций.

В некоторых вариантах осуществления VWF фрагмент не содержит аминокислоты 1274-2813 последовательности SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления первая последовательность XTEN содержит по меньшей мере один мотив, выбранный из табл. 2А.

В некоторых вариантах осуществления первая последовательность XTEN содержит AE42, AE72, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288 или AG144.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние, связанное с кровотечениями, представляет собой гемофилию А.

В другом аспекте изобретения предложен способ лечения заболевания или состояния, связанного с кровотечениями, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок и фармацевтически приемлемый носитель, причем химерный белок содержит

(a) первый полипептид, содержащий

(i) фрагмент фактора фон Виллебранда (VWF), содержащий домен D' и домен D3 VWF,

(ii) первую последовательность XTEN, и

(iii) первую область Fc; и

(b) второй полипептид, содержащий

(i) белок фактора VIII (FVIII), и

(ii) вторую область Fc;

причем VWF фрагмент и первая последовательность XTEN связаны пептидной связью,

причем VWF фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере

на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 100,

причем полипептид FVIII содержит аминокислоты 1-745 и 1649-2332 полноразмерного зрелого фактора VIII человека (SEQ ID NO: 4), и

причем первая последовательность XTEN содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 131.

В некоторых вариантах осуществления первая область Fc связана со второй областью Fc ковалентной связью.

В некоторых вариантах осуществления первая область Fc связана с первой последовательностью XTEN линкером.

В некоторых вариантах осуществления указанный линкер включает расщепляемый тромбином линкер.

В некоторых вариантах осуществления указанная ковалентная связь представляет собой дисульфидную связь.

В некоторых вариантах осуществления первая область Fc ассоциирована со второй областью Fc двумя дисульфидными связями.

В некоторых вариантах осуществления второй полипептид дополнительно содержит вторую XTEN.

В некоторых вариантах осуществления вторая XTEN встроена непосредственно ниже одного или более сайтов встраивания в белке FVIII.

В некоторых вариантах осуществления вторая XTEN встроена в белке FVIII непосредственно ниже сайта встраивания, соответствующего остатку 745 полноразмерного зрелого фактора VIII человека (SEQ ID NO: 4).

В некоторых вариантах осуществления первая последовательность XTEN связана с С-концом VWF фрагмента и первая область Fc связана с С-концом первой последовательности XTEN расщепляемым тромбином линкером, причем вторая область Fc связана с С-концом белка FVIII.

В некоторых вариантах осуществления первая область Fc и вторая область Fc являются идентичными.

В некоторых вариантах осуществления белок FVIII содержит домен В или его часть.

В некоторых вариантах осуществления VWF фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична аминокислотам с 764 по 1240 последовательности SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления VWF фрагмент содержит замену остатка, соответствующего остатку 1099, остатку 1142 или как остатку 1099, так и остатку 1142 последовательности SEQ ID NO: 2, аминокислотой, отличной от цистеина.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние, связанное с кровотечениями, представляет собой гемофилию А.

В некоторых вариантах осуществления композицию вводят путем внутривенного введения.

Краткое описание чертежей/фигур

На фиг. 1A-1D представлены схематические изображения VWFфрагментов фактора фон Виллебранда.

На фиг. 1A показаны три типичных VWFфрагмента фактора фон Виллебранда, подходящие для настоящего изобретения, например VWF-002, VWF-010 и VWF-013. VWF-002 содержит аминокислоты с 1 по 477 последовательности SEQ ID NO: 124 (аминокислоты с 764 по 1240 последовательности SEQ ID NO: 2) и синтезирован без пре/пропептидных последовательностей. VWF-010 содержит домены D1D2 в дополнение к доменам D'D3. VWF-013 содержит домены D1D2D'D3 в дополнение к остаткам аланина, заменяющим цистеины в остатках 336 и 379 последовательности SEQ ID NO: 123.

На фиг. 1B показан VWF-031, который содержит домены D1D2D'D3, слитые с константной областью Ig или ее частью, например областью Fc, с помощью расщепляемого линкера, например расщепляемого тромбином линкера из 48 аминокислот.

На фиг. 1C показан VWF-025, представляющий собой нуклеотидную последовательность, кодирующую домены D1D2D'D3, содержащуюся в векторе pLIVE, и VWF-029, представляющий собой нуклеотидную последовательность, кодирующую домены D1D2D'D3 с двумя заменами аминокислот, C336A и C379A, в векторе pLIVE.

На фиг. 1D показан полноразмерный VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, содержащий пропептид (домены D1 и D2) и зрелые субъединицы (домены D', D3, A1, A2, A3, D4, B1-3, C1-2). VWFфрагмент фактора фон Виллебранда представляет собой белок массой примерно 250 кДа и образует мультимеры (>20 МДа) путем образования дисульфидных связей. VWFфрагмент фактора фон Виллебранда ассоциирует с FVIII (95-98%) в нековалентный комплекс, а затем увеличивает период полувыведения FVIII путем защиты FVIII от расщепления протеазой/активации, стабилизации тяжелой и легкой цепи и предотвращения клиренса FVIII фагоцитарными рецепторами. VWFфрагмент фактора фон Виллебранда также может ограничивать период полувыведения FVIII путем клиренса комплекса FVIII-VWF с помощью рецепторов VWF и предотвращения пиноцитоза, и рециркуляции rFVIII-Fc.

На фиг. 2 представлены фармакокинетические характеристики rFVIII-XTEN (rFVIII-AE288 или

rFVIII-288AE) у мышей, экспрессирующих D'VWFD3 фактора фон Виллебранда, или у мышей с двойным нокаутом (DKO) FVIII и VWF.

На фиг. 2A показана временная шкала для гидродинамической инъекции (HDI) плазмидной ДНК, кодирующей домен D'D3 (VWF-025) (-5 день), внутривенного дозирования rFVIII-XTEN AE288 (0 день) и забора образцов для определения фармакокинетики (ФК) (5 день).

На фиг. 2B показана активность FVIII, измеренная путем хромогенного анализа FVIII после внутривенного дозирования rFVIII-XTEN288 у мышей D1D2D'D3 (перевернутый треугольник) и rFVIII-XTEN288 у мышей DKO (ромб).

На фиг. 2C показан уровень D'D3 в плазме крови (нг/мл) после введения VWF-025. Ось X представляет собой время в часах.

На фиг. 3 представлено схематическое изображение типичных гетеродимерных конструкций VWF:FVIII. Указанные конструкции имеют общую структуру, представленную в виде формулы FVIII-F1-L1-V-X-L2-F2, но содержат примеры разных вариабельных линкеров. Показанная конструкция (FVIII-161) содержит гетеродимерный FVIII (тяжелая цепь и легкая цепь ассоциированы металлической связью), связанный с первой областью Fc и VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, который представляет собой домены D' и VWFD3 фактора фон Виллебранда (т.е. аминокислоты с 1 по 477 последовательности SEQ ID NO: 2 с заменами аминокислот C336A и C379A), связанным с последовательностью XTEN, которая также связана с расщепляемым линкером и второй областью Fc. Последовательность XTEN, содержащаяся в FVIII-161, представляет собой последовательность XTEN AE288, а линкер представляет собой расщепляемый тромбином линкер, содержащий 35 аминокислот. В FVIII-161 белок FVIII, связанный с первой областью Fc, связан с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда процессируемым линкером. После экспрессии процессируемый линкер может быть расщеплен под действием фермента внутриклеточного процессинга, что, таким образом, приводит к ассоциации трех полипептидных цепей конструкции друг с другом.

Фиг. 4A-4E представляют собой схематические изображения примеров гетеродимера FVIII-VWF или мономеров. FVIII-168, FVIII-175, FVIII-172, FVIII-174 и FVIII170. Конструкция FVIII-168 содержит последовательность одноцепочечного FVIII (содержащую замену остатков аргинина остатками аланина в остатках 1645 и 1648), связанную с первой областью Fc, которая затем слита с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, связанным со второй областью Fc расщепляемым тромбином линкером, содержащим 48 аминокислот. AE288 XTEN встроена в домен В последовательности одноцепочечного FVIII. Связь между первой областью Fc и VWFфрагментом фактора фон Виллебранда включает линкер, который может быть расщеплен под действием фермента внутриклеточного процессинга, т.е. процессируемый линкер. Конструкция FVIII-175 содержит одноцепочечный FVIII (содержащий замену остатков аргинина остатками аланина в остатках 1645 и 1648), связанный с AE288 XTEN и первой областью Fc, которая связана со второй областью Fc линкером, например процессируемым линкером. AE288 XTEN встроена в домен В последовательности одноцепочечного FVIII. Конструкция FVIII-172 содержит две полипептидные цепи:

первую цепь, содержащую последовательность тяжелой цепи FVIII, слитую с AE288 XTEN;

вторую цепь, содержащую последовательность легкой цепи FVIII, первую область Fc, линкер (например, процессируемый линкер), VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, расщепляемый тромбином линкер (например, 48 аминокислот) и вторую область Fc.

Конструкция FVIII-174 содержит две полипептидные цепи:

первую цепь, содержащую последовательность тяжелой цепи FVIII, слитую с AE288 XTEN; и

вторую цепь, содержащую легкую цепь FVIII, первую область Fc, линкер (например, процессируемый линкер); и

вторую область Fc.

Конструкция FVIII-170 содержит VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, AE288 XTEN, линкер (например, расщепляемый тромбином линкер длиной в 35 аминокислот) и последовательность одноцепочечного FVIII.

На фиг. 5 представлены фармакокинетические характеристики гетеродимеров FVIII/VWF, содержащих последовательность XTEN в комбинации с областью Fc. Конструкции FVIII-161, FVIII-168 и FVIII-172 вводили мышам с двойным нокаутом (DKO) FVIII/VWF путем гидродинамической инъекции (FIDI) в дозе 100 мкг/мышь. Конструкцию FVIII-170 вводили мышам DKO FVIII/VWF путем HDI в дозе 50 мкг/мышь. Активность FVIII в плазме крови после HDI анализировали путем хромогенного анализа FVIII в течение 24 ч после HDI. Активность FVIII гетеродимеров FVIII/VWF, содержащих последовательность XTEN и домены Fc, сравнивали с активностью FVIII BDD-FVIII без VWFфрагмента фактора фон Виллебранда, последовательности XTEN и доменов Fc.

На фиг. 6 представлены схематические изображения системы котрансфекции примеров гетеродимера FVIII/VWF.

На фиг. 6A представлена конструкция FVIII-169, содержащая полноразмерную последовательность FVIII (с остатком аланина, заменяющим остатки аргинина в 1645 и 1648, и с последовательностью XTEN, встроеной в последовательность одноцепочечного FVIII), связанную с областью Fc. VWF-031

содержит фрагмент D1D2D'D3 (с остатком аланина, заменяющим остатки цистеина в 336 и 379), связанный с другой областью Fc расщепляемым тромбином линкером 48. После внутриклеточного процессинга конструкция FVIII-169 образует полноразмерный одноцепочечный FVIII (SCFVIII), слитый с одним фрагментом Fc и последовательностью XTEN, и конструкция VWF-031 образует фрагмент D'D3 из 477 аминокислот, связанный с другим фрагментом Fc. Две ковалентные связи могут образовываться между фрагментами Fc, связанными с SC FVIII или фрагментом D'D3, это, в свою очередь, обеспечивает нековалентную ассоциацию FVIII и D'D3.

На фиг. 6B представлена конструкция FVIII-173, содержащая гетеродимерную последовательность FVIII, последовательность тяжелой цепи FVIII, связанную с последовательностью XTEN, и последовательность легкой цепи FVIII, связанную с областью Fc. VWF-031 описан выше. После внутриклеточного процессинга конструкция FVIII-173 образует гетеродимерный белок, тяжелую цепь FVIII, слитую с последовательностью XTEN, легкую цепь FVIII, слитую с одним фрагментом Fc, и конструкция VWF-031 образует фрагмент D'D3 из 477 аминокислот, связанный с другим фрагментом Fc. Две ковалентные связи могут образовываться между фрагментами Fc, связанными с легкой цепью FVIII или фрагментом D'D3, это, в свою очередь, обеспечивает нековалентную ассоциацию FVIII и D'D3.

На фиг. 7 представлена аффинность связывания типичного FVIII/VWF, содержащего последовательность XTEN и домены Fc, в отношении иммобилизованного VWF человека (hVWF) в анализе Octet. Аффинность связывания для FVIII-169/VWF-031 и FVIII-057 (rFVIII/Fc), слитого с иммобилизованным hVWF, тестировали с использованием измерений на основе биослойной интерферометрии (анализ Octet).

На фиг. 7A показан ответ в наномолях лекарственного вещества FVIII169 и FVIII/Fc (положительный контроль) на иммобилизованный hVWF в виде связывания.

На фиг. 7B показан ответ IgG1 человека (отрицательный контроль) на иммобилизованный VWF человека в виде связывания.

На фиг. 8 представлены фармакокинетические (ФК) характеристики FVIII-169 у мышей HemA и мышей с двойным нокаутом (DKO) FVIII/VWF.

На фиг. 8A показаны ФК характеристики FVIII-169/VWF-031 и FVIII/Fc у мышей HemA. Мышей HemA лечили однократной внутривенной дозой FVIII-169/VWF-031 в количестве 200 МЕ/кг. Образцы плазмы крови, полученные от мышей, тестировали путем хромогенного анализа FVIII. Период полувыведения FVIII-169/VWF-031 рассчитывали с использованием программы WinNonlin.

На фиг. 8B показаны ФК характеристики FVIII-169/VWF-031, FVIII-169/Fc и FVIII/Fc у мышей DKO FVIII/VWF.

На фиг. 9 представлены ФК характеристики вариантов FVIII-XTEN у мышей DKO FVIII/VWF, экспрессирующих D'D3.

На фиг. 9A показано сравнение ФК характеристик вариантов FVIII-XTEN, FVIII с одной XTEN, FVIII с двумя XTEN и FVIII с тремя XTEN. Одну, две или три XTEN встраивали в различные части FVIII, включая С-конец и В-домен. СТ означает, что XTEN связана с С-концом FVIII. Сайт встраивания В/СТ означает, что одна XTEN встроена между аминокислотным остатком 745 и аминокислотным остатком 746 белка FVIII, а другая XTEN связана с С-концом белка FVIII. Нумерация аминокислотных остатков соответствует последовательности белка SQ BDD FVIII. Сайт встраивания 1900/В/СТ означает, что первая XTEN встроена между аминокислотным остатком 1900 и аминокислотным остатком 1901 в FVIII, вторая XTEN встроена между аминокислотным остатком 745 и аминокислотным остатком 746 в FVIII и третья XTEN связана с С-концом FVIII. Линия мышей, используемая для введения вариантов FVIII-XTEN, представляет собой линию мышей DKO, экспрессирующих домены D'D3.

На фиг. 9B показаны ФК характеристики FVIII-XTEN с тремя встраиваниями XTEN. Вариант FVIII-XTEN (1900/В/СТ) вводили либо мышам DKO FVIII/VWF, либо мышам HemA. Сравнили период полувыведения FVIII-XTEN (1900/В/СТ).

На фиг. 10 показана FVIII-активность FVIII/Fc (полый треугольник), FVIII169:Fc (заштрихованный круг) и FVIII169:VWF31 (полый треугольник) в плазме крови мышей DKO, измеренная путем хромогенного анализа. FVIII/Fc содержит FVIII с двойной цепью (тяжелая цепь и легкая цепь), слитый с димером Fc (т.е. гибридом мономер-димер). FVIII169 описан выше (содержащий AE288 в домене В, непосредственно ниже аминокислоты 745, соответствующий последовательности зрелого FVIII). FVIII169:Fc содержит FVIII169, слитый с димером Fc. FVIII169:VWF31 содержит VWF31 в дополнение к димеру Fc, FVIII169, слитый с первой областью Fc, и VWF31, слитый со второй областью Fc, при этом первая область Fc и вторая область Fc образуют ковалентную связь, например одну или более дисульфидных связей.

На фиг. 11 показано влияние Fc, XTEN и VWF-фрагментов фактора фон Виллебранда-D'D3 на увеличение периода полувыведения FVIII. BDD-FVIII (РЕФАКТО®) (квадрат), FVIII/Fc (круг), FVIII169/Fc (треугольник) и FVIII169/VWF031 (перевернутый треугольник) вводили мышам с двойным нокаутом (DKO) FVIII и VWF. Активность FVIII измеряли путем хромогенного анализа и период полувыведения рассчитывали с использованием программы WinNonlin-Phoenix. Ось X показывает время, а ось Y показывает активность FVIII в плазме крови в МЕ/мл.

На фиг. 12A-12C показано влияние различных XTEN в гетеродимере rFVIII-XTEN/VWF у мышей HemA.

На фиг. 12А показана активность FVIII в плазме крови, приведенная к значению 5-минутному (%) двух XTEN, встроенных непосредственно ниже остатков 1900 и 1656, соответствующих последовательности зрелого FVIII (т.е. FVIII-195 (изоформа FVIII с двойной цепью) и FVIII-199 (изоформа FVIII с одной цепью)), по сравнению с FVIII-169, содержащим XTEN непосредственно ниже остатка 745, соответствующего последовательности зрелого FVIII. FVIII-169/VWF031 (заштрихованный круг), FVIII-199/VWF031 (заштрихованный квадрат) и FVIII-195/VWF031 (полый квадрат) вводили мышам НемА для измерения активности FVIII в плазме крови.

На фиг. 12В показано влияние на увеличение периода полувыведения встраивания второй XTEN непосредственно ниже остатков 403 (домен А2) и 745 (домен В) (т.е. FVIII-203), и остатков 745 (домен В) и 1900 (домен А3) (FVIII-204), соответствующих последовательности зрелого FVIII, по сравнению с FVIII-169 (встраивание XTEN только в домене В). FVIII-204/VWF031 (заштрихованный треугольник), FVIII-169/VWF-031 (заштрихованный круг), FVIII-203/VWF-031 (заштрихованный квадрат) и scBDD-FVIII (полый ромб) вводили мышам НемА. Ось X показывает активность FVIII в плазме крови, приведенную к значению 5-минутному (%), а ось Y показывает время в часах.

На фиг. 12С показано влияние на увеличение периода полувыведения двух встраиваний XTEN непосредственно ниже остатков 18 (домен А1) и 745 (домен В) (т.е. FVIII-205) по сравнению с FVIII-169 (одно встраивание XTEN в домене В) и одноцепочечным FVIII без каких-либо областей Fc или каких-либо XTEN (т.е. FVIII-207). На фиг. 12С также показано влияние на увеличение периода полувыведения трех встраиваний XTEN непосредственно ниже остатков 26 (домен А1), 1656 (домен А3) и 1900 (домен А3) (т.е. FVIII-201) по сравнению с FVIII-169 (одно встраивание XTEN непосредственно ниже остатка 745). FVIII-205/VWF-031 (заштрихованный квадрат), FVIII-201/VWF-031 (перевернутый треугольник), FVIII-169/VWF-031 (заштрихованный круг) и FVIII-207 (полый ромб) вводили мышам НемА. Активность FVIII в плазме крови, приведенную к значению 5-минутному (%) (ось X), измеряли с течением времени в часах (ось Y).

На фиг. 13 представлена активность FVIII гетеродимера rFVIII-XTEN/VWF-XTEN у мышей DKO FVIII/VWF. Активность FVIII в образцах плазмы крови анализировали путем хромогенного анализа FVIII, и строили кривую регрессии активности FVIII в плазме крови (ось X) в зависимости от времени (ось Y). FVIII-155 (scFVIII_{FC} без каких-либо XTEN) экспрессировали совместно с VWF-034 (VWF-Fc с АЕ 288 XTEN плюс расщепляемый тромбином линкер из 35 остатков). Период полувыведения FVIII-155/VWF-034 сравнивали с периодом полувыведения FVIII-169/VWF-031, содержащего АЕ 288 XTEN, встроенную в место соединения с доменом В (непосредственно ниже остатка 745, соответствующего зрелому полипептиду FVIII) FVIII.

На фиг. 14А-14Н представлены схематические изображения различных конструкций rFVIII-XTEN/VWF. Данные конструкции также описаны в других разделах настоящего документа.

На фиг. 14А показан одноцепочечный белок FVIII с делецией домена В (иногда обозначаемый в настоящем описании scBDD-FVIII). Конструкции scBDD-FVIII содержат две замены Arg на Ala в остатках 1645 и 1648.

На фиг. 14В показана конструкция с двумя полипептидными цепями (FVIII155/VWF031): первая цепь содержит одноцепочечный FVIII, связанный с областью Fc без каких-либо XTEN, и вторая цепь содержит VWFфрагмент фактора фон Виллебранда D'D3, связанный с областью Fc. Данную конструкцию используют в качестве контроля.

На фиг. 14С показана конструкция с двумя полипептидными цепями (FVIII199/VWF031): первая цепь содержит одноцепочечный FVIII, связанный с областью Fc, в котором первая XTEN встроена непосредственно ниже остатка 1900, соответствующего последовательности зрелого FVIII, а вторая XTEN встроена непосредственно ниже остатка 1656, соответствующего последовательности зрелого FVIII, и вторая цепь содержит VWFфрагмент фактора фон Виллебранда D'D3, связанный с областью Fc.

На фиг. 14D показана конструкция с двумя полипептидными цепями (FVIII201/VWF031): первая цепь содержит одноцепочечный белок FVIII, связанный с областью Fc, в котором первая XTEN встроена непосредственно ниже остатка 26, соответствующего последовательности зрелого FVIII, вторая XTEN встроена непосредственно ниже остатка 1656, соответствующего последовательности зрелого FVIII, и третья XTEN встроена непосредственно ниже остатка 1900, соответствующего последовательности зрелого FVIII, и вторая цепь содержит VWFфрагмент фактора фон Виллебранда D'D3, связанный с областью Fc.

На фиг. 14Е показаны конструкции с двумя полипептидными цепями (FVIII169/VWF031): первая цепь содержит одноцепочечный белок FVIII, связанный с областью Fc, в котором XTEN встроена непосредственно ниже остатка 745 (обозначенного "В"), соответствующего последовательности зрелого FVIII, и вторая цепь содержит VWFфрагмент фактора фон Виллебранда D'D3, связанный с областью Fc.

На фиг. 14F показана конструкция с двумя полипептидными цепями (FVIII203/VWF031): первая цепь содержит одноцепочечный белок FVIII, в котором первая XTEN встроена в остатке 745 ("В"), соответствующем последовательности зрелого FVIII, а вторая XTEN встроена в остатке 1900, соответствующем последовательности зрелого FVIII, и вторая цепь содержит VWFфрагмент фактора фон Виллебранда D'D3, связанный с областью Fc.

На фиг. 14G показана конструкция с двумя полипептидными цепями (FVIII204/VWF031): первая цепь содержит одноцепочечный белок FVIII, связанный с областью Fc, в котором первая XTEN встроена непосредственно ниже остатка 403, соответствующего последовательности зрелого FVIII, а вторая XTEN встроена непосредственно ниже остатка 745 ("B"), соответствующего последовательности зрелого FVIII, и вторая цепь содержит VWFфрагмент фактора фон Виллебранда D'D3, связанный с областью Fc.

На фиг. 14H показана конструкция с двумя полипептидными цепями (FVIII205/VWF031): первая цепь содержит одноцепочечный FVIII, в котором первая XTEN встроена непосредственно ниже остатка 18, соответствующего последовательности зрелого FVIII, а вторая XTEN встроена непосредственно ниже остатка 745 ("B"), соответствующего последовательности зрелого FVIII, и вторая цепь содержит VWFфрагмент фактора фон Виллебранда D'D3, связанный с областью Fc.

На фиг. 15 представлена FVIII-активность rFVIII-XTEN/VWF и BDD-FVIII у мышей DKO FVIII/VWF. Активность FVIII в образцах плазмы крови анализировали путем хромогенного анализа FVIII, и строили кривую регрессии активности FVIII в плазме крови (ось X) в зависимости от времени (ось Y). Период полувыведения rFVIII-XTEN/VWF (FVIII-205/VWF-031) сравнивали с периодом полувыведения BDD-FVIII и rFVIII-Fc.

На фиг. 16 представлена эффективность гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc у мышей Nema с использованием модели кровотечения при надрезе хвоста. Модель кровотечения при надрезе хвоста у мышей Nema использовали для сравнения эффективности FVIII169/VWF034, FVIII205/VWF031 и BDD-FVIII. Среднюю потерю крови в мл для 200 МЕ/кг FVIII169/VWF034 и FVIII205/VWF031 сравнивали с 200 МЕ/кг BDD-FVIII, 65 МЕ/кг BDD-FVIII, 20 МЕ/кг BDD-FVIII и носителем.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к химерному белку, содержащему

(i) фрагмент фактора фон Виллебранда (VWF), содержащий домен D' и домен VWF_{D3} фактора фон Виллебранда,

(ii) последовательность XTEN, и

(iii) белок FVIII,

при этом VWFфрагмент фактора фон Виллебранда и последовательность XTEN связаны необязательным линкером,

при этом VWFфрагмент фактора фон Виллебранда или последовательность XTEN связана или ассоциирована с белком FVIII.

Указанный химерный белок может содержать одну полипептидную цепь, содержащую VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, последовательность XTEN и белок FVIII, или две полипептидные цепи:

первую цепь, содержащую VWFфрагмент фактора фон Виллебранда; и

вторую цепь, содержащую белок FVIII, при этом полипептид XTEN связан либо с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, либо с белком FVIII.

В одном из вариантов реализации химерный белок согласно настоящему изобретению имеет форму, включающую

(a) V-X-FVIII,

(b) FVIII-X-V,

(c) V-X:FVIII,

(d) X-V:FVIII,

(e) FVIII:V-X или

(f) FVIII:X-V,

где V содержит VWFфрагмент фактора фон Виллебранда,

X содержит одну или более последовательностей XTEN, и

FVIII содержит белок FVIII.

Соединительная черточка (-) может представлять собой пептидную связь или линкер, например расщепляемый линкер, тогда как двоеточие (:) представляет собой химическую ассоциацию или физическую ассоциацию между полипептидами, например ковалентную или нековалентную связь.

В другом варианте реализации химерный белок содержит также (iv) константную область иммуноглобулина (Ig) или ее часть (называемая также F1 или первой константной областью Ig или ее частью), связанную с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, последовательностью XTEN, белком FVIII или их любыми комбинациями. В других вариантах реализации химерный белок также содержит дополнительную константную область Ig или ее часть (называемая также F2 или второй константной областью Ig или ее частью). Первая константная область Ig или ее часть может быть связана с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда или последовательностью XTEN, а вторая константная область Ig может быть связана с белком FVIII. Первая константная область Ig, вторая константная область Ig или ее часть или обе могут увеличивать период полувыведения белка FVIII. В некоторых вариантах реализации вторая константная область Ig или ее часть (F2) связана с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда линкером,

например процессируемым линкером. В других вариантах реализации вторая константная область Ig или ее часть (F2) ассоциирована с (первой) константной областью Ig или ее частью (F1). Вторая константная область Ig или ее часть (F2) и первая константная область Ig или ее часть (F1) могут быть одинаковыми или разными. Вторая константная область Ig или ее часть может быть ассоциирована с константной областью Ig или ее частью ковалентной связью, например дисульфидной связью. VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, связанный с первой константной областью Ig или ее частью, также может быть ассоциирован с белком FVIII, связанным со второй областью Fc, нековалентной связью. В некоторых вариантах реализации белок FVIII может также содержать одну или более дополнительных последовательностей XTEN, которые связаны с С-концом или N-концом белка FVIII или встроены непосредственно ниже (downstream) одной или более аминокислот в белке FVIII (например, один или более сайтов встраивания XTEN). В некоторых вариантах реализации период полувыведения белка FVIII увеличен по сравнению с белком FVIII дикого типа или белком FVIII, не содержащим VWFфрагмент фактора фон Виллебранда.

В некоторых вариантах реализации химерный белок имеет формулу, включающую

- (g) V-L2-X-L1-F1:FVIII-L3-F2;
- (h) V-L2-X-L1-F1:F2-L3-FVIII;
- (i) F1-L1-X-L2-V:FVIII-L3-F2;
- (j) F1-L1-X-L2-V:F2-L3-FVIII;
- (k) V-L2-X-L1-F1-L4-FVIII-L3-F2;
- (l) F2-L3-FVIII-L4-F1-L1-X-L2-V;
- (m) FVIII-L3-F2-L4-V-L2-X-L1-F1; или
- (n) F1-L1-X-L2-V-L4-F2-L3-FVIII,

где V содержит VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, каждый из L1, L2 и L3 содержит необязательный линкер, например расщепляемый линкер, L4 представляет собой необязательный линкер, например процессируемый линкер, FVIII содержит белок FVIII,

X содержит одну или более последовательностей XTEN,

F1 содержит необязательную первую константную область Ig или ее часть,

F2 содержит необязательную вторую константную область Ig или ее часть, и

(:) представляет собой ковалентную связь или нековалентную связь.

Настоящее изобретение также относится к химерному белку, содержащему

(i) белок FVIII,

(ii) последовательность XTEN, и

(iii) константную область Ig или ее часть,

при этом последовательность XTEN связана с белком FVIII необязательным линкером на N-конце или С-конце белка FVIII или встроена непосредственно ниже одной или более аминокислот в белке FVIII (например, один или более сайтов встраивания), и

при этом константная область Ig или ее часть связана или ассоциирована с белком FVIII или последовательностью XTEN.

В одном из вариантов реализации константная область Ig или ее часть, подходящая для химерного белка, содержит первую область Fc. В другом варианте реализации химерный белок также содержит дополнительную константную область Ig или ее часть. Указанная дополнительная константная область Ig или ее часть, подходящая для настоящего изобретения, может содержать вторую область Fc, которая связана или ассоциирована с первой областью Fc, например ковалентной связью. В других вариантах реализации первая область Fc связана со второй областью Fc линкером, например процессируемым линкером.

В соответствии с другими аспектами химерный белок содержит

(i) белок FVIII,

(ii) последовательность XTEN,

(iii) VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, и

(iv) константную область Ig или ее часть,

при этом содержит домен D' и домен VWFD3 фактора фон Виллебранда,

при этом последовательность XTEN связана с белком FVIII необязательным линкером на N-конце или С-конце белка FVIII или встроена непосредственно ниже одной или более аминокислот в белке FVIII (например, один или более сайтов встраивания), VWFфрагмент фактора фон Виллебранда связан или ассоциирован с белком FVIII или последовательностью XTEN, и константная область Ig или ее часть связана с белком FVIII, последовательностью XTEN, VWFфрагментом фактора фон Виллебранда или их любыми комбинациями.

Неограничивающие примеры химерных белков могут иметь формулу, включающую

- (1) FVIII(X1)-L1-F1:V-L2-X2-L3-F2;
- (2) FVIII(X1)-L1-F1:F2-L3-X2-L2-V;
- (3) F1-L1-FVIII(X1):V-L2-X2-L3-F2;
- (4) F1-L1-FVIII(X1):F2-L3-X2-L2-V;
- (5) FVIII(X1)-L1-F1-L4-V-L2-X2-L3-F2;
- (6) FVIII(X1)-L1-F1-L4-F2-L3-X2-L2-V;
- (7) F1-L1-FVIII(X1)-L4-V-L2-X2-L3-F2 или
- (8) F1-L1-FVIII(X1)-L4-F2-L3-X2-L2-V,

где FVIII(X1) содержит белок FVIII и одну или более последовательностей XTEN, при этом одна или более последовательностей XTEN связаны с N-концом или C-концом белка FVIII или встроены непосредственно ниже одной или более аминокислот в белке FVIII (например, один или более сайтов встраивания),

каждый из L1, L2 и L3 содержит необязательный линкер, например расщепляемый линкер,

L4 представляет собой линкер, процессируемый линкер,

X2 содержит одну или более последовательностей XTEN,

F1 содержит константную область Ig или ее часть,

F2 содержит необязательную дополнительную константную область Ig или ее часть, и

V содержит VWFфрагмент фактора фон Виллебранда,

(-) представляет собой пептидную связь или одну или более аминокислот, и

(:) содержит ковалентную связь или нековалентную связь.

Один из аспектов настоящего изобретения состоит в том, что VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, подходящий для химерного белка, не связывается с рецептором, ответственным за клиренс VWF, который предотвращает или ингибирует взаимодействие белка FVIII с VWFэндогенным фактором фон Виллебранда. Таким образом, химерный белок, содержащий VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, имеет пониженный клиренс или не выводится по пути клиренса VWF. Другой аспект настоящего изобретения состоит в том, что VWFфрагмент фактора фон Виллебранда способен защищать белок FVIII от расщепления одной или более протеазами, защищать белок FVIII от активации, стабилизировать тяжелую цепь и/или легкую цепь белка FVIII или предотвращать клиренс белка FVIII с участием одного или более рецепторов макрофагов.

Благодаря способности VWFфрагмента фактора фон Виллебранда предотвращать или ингибировать взаимодействие между белком FVIII и VWFэндогенным фактором фон Виллебранда, период полувыведения белка FVIII увеличивается по сравнению с белком FVIII, не содержащим VWFфрагмента фактора фон Виллебранда. В одном из вариантов реализации период полувыведения белка FVIII по меньшей мере примерно в 1,5 раза, по меньшей мере примерно в 2 раза, по меньшей мере примерно в 2,5 раза, по меньшей мере примерно в 3 раза, по меньшей мере примерно в 4 раза, по меньшей мере примерно в 5 раз, по меньшей мере примерно в 6 раз, по меньшей мере примерно в 7 раз, по меньшей мере примерно в 8 раз, по меньшей мере примерно в 9 раз, по меньшей мере примерно в 10 раз, по меньшей мере примерно в 11 раз или по меньшей мере примерно в 12 раз больше чем у FVIII дикого типа. В другом варианте реализации период полувыведения белка FVIII составляет по меньшей мере примерно 10 ч, по меньшей мере примерно 11 ч, по меньшей мере примерно 12 ч, по меньшей мере примерно 13 ч, по меньшей мере примерно 14 ч, по меньшей мере примерно 15 ч, по меньшей мере примерно 16 ч, по меньшей мере примерно 17 ч, по меньшей мере примерно 18 ч, по меньшей мере примерно 19 ч, по меньшей мере примерно 20 ч, по меньшей мере примерно 21 ч, по меньшей мере примерно 22 ч, по меньшей мере примерно 23 ч, по меньшей мере примерно 24 ч, по меньшей мере примерно 36 ч, по меньшей мере примерно 48 ч, по меньшей мере примерно 60 ч, по меньшей мере примерно 72 ч, по меньшей мере примерно 84 ч, по меньшей мере примерно 96 ч или по меньшей мере примерно 108 ч.

Константная область Ig или ее часть, подходящая для химерного белка, содержит первую область Fc, которая связана с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда необязательным линкером, например расщепляемым линкером. Химерный белок также может содержать дополнительную константную область Ig или ее часть, которая связана с белком FVIII или последовательностью XTEN, константной областью Ig или ее частью, VWFфрагментом фактора фон Виллебранда или их любыми комбинациями необязательным линкером. В одном из вариантов реализации дополнительная константная область Ig или ее часть связана с белком FVIII необязательным линкером. Дополнительная константная область Ig или ее часть может содержать вторую область Fc. Константная область Ig или ее часть, подходящая для настоящего изобретения, и дополнительная константная область Ig или ее часть, подходящая для настоящего изобретения, являются одинаковыми или разными.

В соответствии с некоторыми аспектами белок FVIII связан с последовательностью XTEN на C-конце или N-конце белка FVIII или встроены непосредственно ниже одной или более аминокислот в

зрелом нативном FVIII человека (например, один или более сайтов встраивания) или их любые комбинации. Один или более сайтов встраивания в белке FVIII могут располагаться в пределах одного или более доменов белка FVIII, выбранных из группы, состоящей из домена A1, кислотной области a1, домена A2, кислотной области a2, домена A3, домена B, домена C1, домена C2 и их любых комбинаций, или между одним или более доменами белка FVIII, выбранными из группы, состоящей из домена A1 и кислотной области a1, кислотной области a1 и домена A2, домена A2 и кислотной области a2, кислотной области a2 и домена B, домена B и домена A3, домена A3 и домена C1, домена C1, домена C2 и их любых комбинаций, или между двумя доменами белка FVIII, выбранными из группы, состоящий из домена A1 и кислотной области a1, кислотной области a1 и домена A2, домена A2 и кислотной области a2, кислотной области a2 и домена B, домена B и домена A3, домена A3 и домена C1, домена C1 и домена C2 и их любых комбинаций.

В одном из вариантов реализации один или более сайтов встраивания расположены непосредственно ниже одной или более аминокислот в зрелом нативном FVIII человека (например, SEQ ID NO: 4 [последовательность зрелого FVIII-полноразмерная]), выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков из табл. 7, 8, 9, 10, 11 или их любых комбинаций.

В другом варианте реализации один или более сайтов встраивания расположены в одной или более пермиссивных петлях зрелого нативного FVIII человека. В других вариантах реализации один или более сайтов встраивания расположены в области a3 зрелого нативного FVIII человека. Например, последовательность XTEN может быть встроена непосредственно ниже аминокислоты 1656, соответствующей SEQ ID NO: 4 (полноразмерный зрелый FVIII). В других вариантах реализации белок FVIII связан по меньшей мере с двумя последовательностями XTEN: первой последовательностью XTEN, встроенной в пределах области a3, и второй последовательностью XTEN, встроенной в пределах пермиссивной петли в белке FVIII (например, A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 или A3-2). В других вариантах реализации белок FVIII связан по меньшей мере с тремя последовательностями XTEN: первой последовательностью XTEN, встроенной в пределах области a3, второй последовательностью XTEN и третьей последовательностью XTEN, встроенными в пределах одной или двух пермиссивных петель в белке FVIII (например, A1-1, A1-2, A2-1, A2-2, A3-1 или A3-2).

В некоторых вариантах реализации один или более сайтов встраивания для одного или более XTEN расположены непосредственно ниже одной или более аминокислот (пронумерованы относительно последовательности зрелого FVIII), выбранных из группы, состоящей из

- (1) аминокислоты 3,
- (2) аминокислоты 18,
- (3) аминокислоты 22,
- (4) аминокислоты 26,
- (5) аминокислоты 32,
- (6) аминокислоты 40,
- (7) аминокислоты 60,
- (8) аминокислоты 65,
- (9) аминокислоты 81,
- (10) аминокислоты 116,
- (11) аминокислоты 119,
- (12) аминокислоты 130,
- (13) аминокислоты 188,
- (14) аминокислоты 211,
- (15) аминокислоты 216,
- (16) аминокислоты 220,
- (17) аминокислоты 224,
- (18) аминокислоты 230,
- (19) аминокислоты 333,
- (20) аминокислоты 336,
- (21) аминокислоты 339,
- (22) аминокислоты 375,
- (23) аминокислоты 399,
- (24) аминокислоты 403,
- (25) аминокислоты 409,
- (26) аминокислоты 416,
- (26) аминокислоты 442,
- (28) аминокислоты 487,
- (29) аминокислоты 490,
- (30) аминокислоты 494,
- (31) аминокислоты 500,
- (32) аминокислоты 518,

- (33) аминокислоты 599,
- (34) аминокислоты 603,
- (35) аминокислоты 713,
- (36) аминокислоты 745,
- (37) аминокислоты 1656,
- (38) аминокислоты 1711,
- (39) аминокислоты 1720,
- (40) аминокислоты 1725,
- (41) аминокислоты 1749,
- (42) аминокислоты 1796,
- (43) аминокислоты 1802,
- (44) аминокислоты 1827,
- (45) аминокислоты 1861,
- (46) аминокислоты 1896,
- (47) аминокислоты 1900,
- (48) аминокислоты 1904,
- (49) аминокислоты 1905,
- (50) аминокислоты 1910,
- (51) аминокислоты 1937,
- (52) аминокислоты 2019,
- (53) аминокислоты 2068,
- (54) аминокислоты 2111,
- (55) аминокислоты 2120,
- (56) аминокислоты 2171,
- (57) аминокислоты 2188,
- (58) аминокислоты 2221,
- (59) аминокислоты 2277, и
- (60) двух или более комбинаций указанных аминокислот.

В некоторых вариантах реализации одна ХТЕН встроена в белок FVIII. В некоторых вариантах реализации две ХТЕН встроены в белок FVIII. В некоторых вариантах реализации 3 ХТЕН встроены в белок FVIII.

В конкретном примере первая ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 26, соответствующей SEQ ID NO: 4, а вторая ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 1720, соответствующей SEQ ID NO: 4 (полноразмерный зрелый FVIII). В другом примере первая ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 403, соответствующей SEQ ID NO: 4, а вторая ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 1720, соответствующей SEQ ID NO: 4. В некоторых примерах первая ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 1656, соответствующей SEQ ID NO: 4, а вторая ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 1720, соответствующей SEQ ID NO: 4. В других примерах первая ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 26, соответствующей SEQ ID NO: 4, вторая ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 1656, соответствующей SEQ ID NO: 4, и третья ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 1720, соответствующей SEQ ID NO: 4. В других вариантах реализации первая ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 403, соответствующей SEQ ID NO: 4, вторая ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 1656, соответствующей SEQ ID NO: 4, и третья ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 1720, соответствующей SEQ ID NO: 4. В других вариантах реализации первая ХТЕН встроена между аминокислотами 403 и 404, соответствующими SEQ ID NO: 4, вторая ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 1656, соответствующей SEQ ID NO: 4, и третья ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 1720, соответствующей SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах реализации первая ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 26, соответствующей SEQ ID NO: 4 (полноразмерный зрелый FVIII), вторая ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 1720, соответствующей SEQ ID NO: 4, и третья ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 1900, соответствующей SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах реализации первая ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 26, соответствующей SEQ ID NO: 4, вторая ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 1656, соответствующей SEQ ID NO: 2, третья ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 1720, соответствующей SEQ ID NO: 4, и четвертая ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 1900, соответствующей SEQ ID NO: 4. В другом примере ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 745, соответствующей SEQ ID NO: 4. В дополнительном примере первая ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 1656, соответствующей SEQ ID NO: 4, а вторая ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 1900, соответствующей SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах реализации первая ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 26, соответствующей SEQ ID NO: 4, вторая ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 1656, соответствующей SEQ ID NO: 4, и третья ХТЕН встроена непосредственно ниже аминокислоты 1900, соответствующей SEQ ID NO: 4. В другом примере первая

XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 403, соответствующей SEQ ID NO: 4, а вторая XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 745, соответствующей SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах реализации первая XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 745, соответствующей SEQ ID NO: 4, а вторая XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1900, соответствующей SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах реализации первая XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 18, соответствующей SEQ ID NO: 4, а вторая XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 745, соответствующей SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах реализации белок FVIII представляет собой изоформу FVIII с двойной цепью. В некоторых вариантах реализации белок FVIII представляет собой изоформу FVIII с одной цепью.

В некоторых вариантах реализации XTEN, которая встроена, представляет собой SEQ ID NO: 39 (AE288). В некоторых примерах XTEN, которые встроены, представляют собой SEQ ID NO: 38 и 37 (AG144 и AE144). В некоторых примерах XTEN, которые встроены, представляют собой SEQ ID NO: 37, 38 и 37 (AE144, AG144 и AE144). В некоторых вариантах реализации XTEN, которые встроены, представляют собой SEQ ID NO: 37 и 40 (AE144 и AE288). В некоторых вариантах реализации XTEN, которые встроены, представляют собой

AE42 (SEQ ID NO: 36), AE72 (SEQ ID NO: 127), AE144_2A (SEQ ID NO: 128), AE144_3B (SEQ ID NO: 129), AE144_4A (SEQ ID NO: 130), AE144_5A (SEQ ID NO: 131), AE144_6B (SEQ ID NO: 132), AG144_A (SEQ ID NO: 133), AG144_B (SEQ ID NO: 134), AG144_C (SEQ ID NO: 135), AG144_F (SEQ ID NO: 136), AE864 (SEQ ID NO: 43), AE576 (SEQ ID NO: 41), AE288 (SEQ ID NO: 39), AE288_2 (SEQ ID NO: 137), AE144 (SEQ ID NO: 37), AG864 (SEQ ID NO: 44), AG576 (SEQ ID NO: 42), AG288 (SEQ ID NO: 40), AG144 (SEQ ID NO: 38)

и их любые комбинации.

Белок FVIII, подходящий для настоящего изобретения, может содержать домен В или его часть, например FVIII с делецией домена SQ В. В одном из вариантов реализации белок FVIII содержит одноцепочечный FVIII. В другом варианте реализации одноцепочечный FVIII содержит по меньшей мере одну замену аминокислоты в остатке, соответствующем остатку 1648, остатку 1645 или обоим в полноразмерном зрелом полипептиде FVIII (SEQ ID NO: 4) или остатку 754, остатку 751 или обоим в SQ BDD факторе VIII (SEQ ID NO: 6). В других вариантах реализации заменяющей аминокислотой является аминокислота, отличная от аргинина. В некоторых вариантах реализации белок FVIII содержит тяжелую цепь FVIII и легкую цепь FVIII, при этом указанная тяжелая цепь и легкая цепь ассоциированы друг с другом металлической связью.

Белок FVIII может обладать низкой аффинностью или не связывается с родственным рецептором липопротеинов низкой плотности белком (LRP), например, за счет содержания по меньшей мере одной замены аминокислоты, которая уменьшает аффинность или устраняет связывание с LRP. Такая по меньшей мере одна замена аминокислоты может быть локализована в остатке, соответствующем остатку 471, остатку 484, остатку 487, остатку 490, остатку 497, остатку 2092, остатку 2093 или двум или более комбинациям указанных остатков в полноразмерном зрелом FVIII. В конкретном варианте реализации заменяющей аминокислотой в остатке 471, 484 или 497 является аминокислота, отличная от аргинина, заменяющей аминокислотой в остатке 487 является аминокислота, отличная от тирозина, заменяющей аминокислотой в остатке 2092 является аминокислота, отличная от лизина, или заменяющей аминокислотой в остатке 2093 является аминокислота, отличная от фенилаланина.

В некоторых вариантах реализации белок FVIII содержит по меньшей мере одну замену аминокислоты, которая индуцирует увеличенную стабильность белка FVIII по сравнению с белком FVIII, не содержащим указанную замену. Такие замены могут располагаться в домене А2 и домене А3 белка FVIII, например, в остатке, соответствующем остатку 664, остатку 1826, остатку 662, остатку 1828 или двум или более комбинациям указанных остатков в полноразмерном зрелом FVIII.

VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, подходящий для настоящего изобретения, содержит домен D' и домен D3, которые вместе способны связываться с FVIII. VWFфрагмент фактора фон Виллебранда может содержать аминокислотную последовательность домена D', которая является по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной аминокислотам с 764 по 866 последовательности SEQ ID NO: 2, и/или аминокислотную последовательность домена D3, которая является по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичной аминокислотам с 867 по 1240 последовательности SEQ ID NO: 2. В одном из вариантов реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда представляет собой мономер. В другом варианте реализации VWFфрагмента фактора фон Виллебранда содержит по меньшей мере два VWFфрагмента фактора фон Виллебранда, по меньшей мере три VWFфрагмента фактора фон Виллебранда, по меньшей мере четыре VWFфрагмента фактора фон Виллебранда, по меньшей мере пять VWFфрагментов фактора фон Виллебранда или по меньшей мере шесть VWFфрагментов фактора фон Виллебранда. В одном из вариантов реализации два или более VWFфрагментов фактора фон Виллебранда могут быть одинаковыми или они могут быть разными. VWFфрагмент фактора фон Вил-

лебранда может содержать аминокислоту, по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотам с 764 по 1240 последовательности SEQ ID NO: 2. VWFфрагмент фактора фон Виллебранда может по существу состоять из или состоять из аминокислот с 764 по 1240 последовательности SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда может содержать по меньшей мере одну замену аминокислоты в остатке, соответствующем остатку 1099, остатку 1142 или как остатку 1099, так и остатку 1142 последовательности SEQ ID NO: 2. В других вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда содержит также домен D1, домен D2 или домены D1 и D2 VWF. VWFфрагмент фактора фон Виллебранда может дополнительно содержать домен VWF, выбранный из группы, состоящей из домена A1, домена A2, домена A3, домена D4, домена B1, домена B2, домена B3, домена C1, домена C2, домена CK, их одного или более фрагментов и их любых комбинаций. Например, VWFфрагмент фактора фон Виллебранда может по существу состоять из или состоять из

- (1) доменов D' и VWFD3 фактора фон Виллебранда или их фрагментов,
- (2) доменов D1, D' и VWFD3 фактора фон Виллебранда или их фрагментов,
- (3) доменов D2, D' и VWFD3 фактора фон Виллебранда или их фрагментов,
- (4) доменов D1, D2, D' и VWFD3 фактора фон Виллебранда или их фрагментов, или
- (5) доменов D1, D2, D', D3 и VWFA1 фактора фон Виллебранда или их фрагментов.

В некоторых вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда содержит также сигнальный пептид VWF или FVIII, функционально связанный с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда.

Один или более линкеров, подходящих для настоящего изобретения, имеют длину, составляющую по меньшей мере примерно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 или 2000 аминокислот. В некоторых вариантах реализации один или более линкеров имеют длину, составляющую от примерно 1 до примерно 2000 аминокислот. В одном из вариантов реализации один или более линкеров имеют длину, составляющую по меньшей мере примерно 20, 35, 42, 48, 73, 75, 95, 98, 144, 288, 324, 333, 576 или 864 аминокислоты. В другом варианте реализации один или более линкеров содержат пептид gly/ser, последовательность XTEN или и то и другое. Примеры пептида gly/ser включают, но не ограничиваются перечисленными, формулу $(Gly_4Ser)_n$ (SEQ ID NO: 139) или $S(Gly_4Ser)_n$ (SEQ ID NO: 140), где n представляет собой положительное целое число, выбранное из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 и 10. Например, линкер $(Gly_4Ser)_n$ может представлять собой $(Gly_4Ser)_3$ (SEQ ID NO: 63) или $(Gly_4Ser)_4$ (SEQ ID NO: 138). В одном из вариантов реализации линкер содержит по меньшей мере один первый сайт расщепления на N-конце линкера, по меньшей мере один второй сайт расщепления на C-конце линкера или оба сайта расщепления. В другом варианте реализации линкер включает расщепляемый тромбином линкер из 20 аминокислот, 35 аминокислот, 48 аминокислот, 73 аминокислот или 95 аминокислот. Расщепляемые линкеры могут содержать один или более сайтов расщепления протеазой, выбранной из группы, состоящей из фактора XIa, фактора XIIa, калликреина, фактора VIIa, фактора IXa, фактора Xa, фактора IIa (тромбина), эластазы-2, гранзима-B, TEV, энтерокиназы, протеазы 3C, сортазы A, MMP-12, MMP-13, MMP-17 и MMP-20, например, TLDPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEEK (SEQ ID NO: 8).

Неограничивающие примеры одного или более сайтов расщепления включают аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

RRRR (SEQ ID NO: 9), RKRRKR (SEQ ID NO: 10),
 RRRRS (SEQ ID NO: 11), TQSFNDFTR (SEQ ID NO: 12), SVSQTSLKTR (SEQ ID NO: 13),
 DFLAEGGGVR (SEQ ID NO: 14), TTKIKPR (SEQ ID NO: 15), LVPRG (SEQ ID NO: 16),
 ALRPR (SEQ ID NO: 17), KLTRAET (SEQ ID NO: 18), DFTRVVG (SEQ ID NO: 19),
 TMTRIVGG (SEQ ID NO: 20), SPFRSTGG (SEQ ID NO: 21), LQVRIVGG (SEQ ID NO: 22),
 PLGRIVGG (SEQ ID NO: 23), IEGRTVGG (SEQ ID NO: 24), LTPRSLLV (SEQ ID NO: 25),
 LGPVSGVP (SEQ ID NO: 26), VAGDSLEE (SEQ ID NO: 27), GPAGLGGA (SEQ ID NO: 28),
 GPAGLRGA (SEQ ID NO: 29), APLGLRLR (SEQ ID NO: 30), PALPLVAQ (SEQ ID NO: 31),
 ENLYFQG (SEQ ID NO: 32), DDDKIVGG (SEQ ID NO: 33), LEVLFGQP (SEQ ID NO: 34) и
 LPKGTSES (SEQ ID NO: 35).

В некоторых вариантах реализации первый сайт расщепления и второй сайт расщепления являются одинаковыми или разными.

Последовательность XTEN, подходящая для настоящего изобретения, может быть выбрана из группы, состоящей из

AE42 (SEQ ID NO: 36), AE144 (SEQ ID NO: 37), AG144 (SEQ ID NO: 38), AE288 (SEQ ID NO: 39), AG288 (SEQ ID NO: 40), AE576 (SEQ ID NO: 41), AG576 (SEQ ID NO: 42), AE864 (SEQ ID NO: 43), AE72 (SEQ ID NO: 127), AE144_2A (SEQ ID NO: 128), AE144_3B (SEQ ID NO: 129), AE144_4A (SEQ ID NO: 130), AE144_5A (SEQ ID NO: 131), AE144_6B (SEQ ID NO: 132), AG144_A (SEQ ID NO: 133), AG144_B (SEQ ID NO: 134), AG144_C (SEQ ID NO: 135), AG144_F (SEQ ID NO: 136), AE288_2 (SEQ ID NO: 137) или AG864 (SEQ ID NO: 44).

В конкретном варианте реализации последовательность XTEN включает AE288 или AG288.

Химерный белок согласно настоящему изобретению может быть полисиалилирован, пегилирован или модифицирован гидроксипропилоккрахмалом. Настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду или группе полинуклеотидов, кодирующих химерный белок. Полинуклеотид может также включать полинуклеотидную цепь, кодирующую PC5 или PC7. Настоящее изобретение также относится к вектору, содержащему полинуклеотид или группу полинуклеотидов и один или более промоторов, функционально связанных с указанным полинуклеотидом или группой полинуклеотидов. Вектор может также включать дополнительный вектор, который содержит полинуклеотидную цепь, кодирующую PC5 или PC7. Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, содержащей указанный полинуклеотид или вектор. Указанная клетка-хозяин может представлять собой клетку млекопитающего, например клетку HEK293, клетку CHO или клетку ВНК. В некоторых вариантах реализации PC5 или PC7 клетки-хозяина расщепляет домены D1D2 VWF.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей химерный белок, полинуклеотид, вектор или клетку-хозяина и фармацевтически приемлемый носитель. Таким образом, композиция согласно настоящему изобретению имеет увеличенный период полувыведения по сравнению с белком FVIII дикого типа. Период полувыведения белка FVIII по меньшей мере примерно в 1,5 раза, по меньшей мере примерно в 2 раза, по меньшей мере примерно в 2,5 раза, по меньшей мере примерно в 3 раза, по меньшей мере примерно в 4 раза, по меньшей мере примерно в 5 раз, по меньшей мере примерно в 6 раз, по меньшей мере примерно в 7 раз, по меньшей мере примерно в 8 раз, по меньшей мере примерно в 9 раз, по меньшей мере примерно в 10 раз, по меньшей мере примерно в 11 раз или по меньшей мере примерно в 12 раз больше, чем у FVIII дикого типа. Период полувыведения фактора VIII составляет по меньшей мере примерно 17 ч, по меньшей мере примерно 18 ч, по меньшей мере примерно 19 ч, по меньшей мере примерно 20 ч, по меньшей мере примерно 21 ч, по меньшей мере примерно 22 ч, по меньшей мере примерно 23 ч, по меньшей мере примерно 24 ч, по меньшей мере примерно 25 ч, по меньшей мере примерно 26 ч, по меньшей мере примерно 27 ч, по меньшей мере примерно 28 ч, по меньшей мере примерно 29 ч, по меньшей мере примерно 30 ч, по меньшей мере примерно 31 ч, по меньшей мере примерно 32 ч, по меньшей мере примерно 33 ч, по меньшей мере примерно 34 ч, по меньшей мере примерно 35 ч, по меньшей мере примерно 36 ч, по меньшей мере примерно 48 ч, по меньшей мере примерно 60 ч, по меньшей мере примерно 72 ч, по меньшей мере примерно 84 ч, по меньшей мере примерно 96 ч или по меньшей мере примерно 108 ч.

Композиция согласно настоящему изобретению может быть введена путем, выбранным из группы, состоящей из топического введения, внутриглазного введения, парентерального введения, интратекального введения, субдурального введения и перорального введения. В одном из вариантов реализации композицию вводят путем парентерального введения, например внутривенного или подкожного введения. Композиция согласно настоящему изобретению подходит для лечения заболевания или состояния, связанного с кровотечениями, у нуждающегося в этом субъекта. Указанное заболевание или состояние, связанное с кровотечениями, выбрано из группы, состоящей из нарушения свертываемости крови, сопровождающегося повышенной кровоточивостью, гемартроз, мышечного кровотечения, кровотечения в ротовой полости, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в ротовой полости, травмы, травмы головы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшинного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома костей, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглочном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве, кровотечения во влагалище подвздошно-поясничной мышцы и их любых комбинаций. В одном из вариантов реализации субъекту, которого лечат химерным белком, назначено оперативное вмешательство. В другом варианте реализации лечение является профилактическим или по необходимости. Настоящее изобретение также относится к способу предотвращения или ингибирования связывания белка FVIII с VWF эндогенным фактором фон Виллебранда, включающему введение эффективного количества химерного белка, полинуклеотидного вектора, клетки-хозяина или композиции нуждающегося в этом субъекту, при этом VWF фрагмент фактора фон Виллебранда связывается с белком FVIII и таким образом предотвращает или ингибирует связывание VWF эндогенного фактора фон Виллебранда. Настоящее изобретение также относится к способу продления или увеличения периода полувыведения белка FVIII, при

этом указанный способ включает введение эффективного количества химерного белка, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или композиции нуждающемуся в этом субъекту, при этом VWFфрагмент фактора фон Виллебранда связывается с белком FVIII и таким образом продлевает или увеличивает период полувыведения белка FVIII. Также предложен способ предотвращения или ингибирования клиренса белка FVIII из клетки, при этом указанный способ включает введение эффективного количества химерного белка, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или композиции в клетку, содержащую белок FVIII или полинуклеотид, кодирующий белок FVIII, при этом белок, обладающий VWFактивностью фактора фон Виллебранда, связывается с белком FVIII. Субъект, подходящий для настоящих способов, представляет собой животное, например человека, например пациента, страдающего гемофилией А. Согласно настоящему изобретению также предложен способ лечения заболевания или нарушения, сопровождающегося повышенной кровоточивостью, у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение эффективного количества химерного белка, полинуклеотида, вектора, клетки-хозяина или композиции, при этом указанное заболевание или нарушение, сопровождающееся повышенной кровоточивостью, выбрано из группы, состоящей из нарушения свертываемости крови, сопровождающегося повышенной кровоточивостью, гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения в ротовой полости, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в ротовой полости, травмы, травмы головы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшинного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома костей, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве и кровотечения во влагалище подвздошно-поясничной мышцы. Лечение может быть профилактическим или по необходимости. В одном из вариантов реализации эффективное количество составляет от 0,1 до 500 мг/кг.

Настоящее изобретение также включает способ получения химерного белка, включающий трансфекцию одной или более клеток-хозяев полинуклеотидом или вектором, и экспрессию химерного белка в клетке-хозяине.

Определения.

Следует отметить, что термин, называющий объект в единственном числе, относится к одному или более из таких объектов; например, понятно, что "нуклеотидная последовательность" представляет собой одну или более нуклеотидных последовательностей. Таким образом, термины в единственном числе, "один или более" и "по меньшей мере один" могут являться взаимозаменяемыми в настоящем описании. Термин "полинуклеотид" или "нуклеотид" включает единичную нуклеиновую кислоту, а также множество нуклеиновых кислот, и относится к выделенной молекуле или конструкции нуклеиновой кислоты, например матричной РНК (мРНК) или плазмидной ДНК (пДНК). В некоторых вариантах реализации полинуклеотид содержит традиционную фосфодиэфирную связь или нетрадиционную связь (например, амидную связь, такую как встречающаяся в пептидных нуклеиновых кислотах (ПНК)). Термин "нуклеиновая кислота" относится к любому одному или более сегментам нуклеиновой кислоты, например фрагментам ДНК или РНК, присутствующим в полинуклеотиде. Термин "выделенная" нуклеиновая кислота или полинуклеотид означает молекулу нуклеиновой кислоты, ДНК или РНК, которую извлекли из природной окружающей среды. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий полипептид - фактор VIII, содержащийся в векторе, считается выделенным для целей настоящего изобретения. Другие примеры выделенного полинуклеотида включают рекомбинантные полинуклеотиды, содержащиеся в гетерологичных клетках-хозяевах или очищенные (частично или по существу) от других полинуклеотидов в растворе. Выделенные молекулы РНК включают РНК-транскрипты *in vivo* или *in vitro* полинуклеотидов согласно настоящему изобретению. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты согласно настоящему изобретению также включают такие молекулы, полученные путем синтеза. Кроме того, полинуклеотид или нуклеиновая кислота может включать регуляторные элементы, такие как промоторы, энхансеры, сайты связывания рибосом или сигналы терминации транскрипции. В настоящем описании "кодирующая область" или "кодирующая последовательность" представляет собой часть полинуклеотида, состоящую из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Хотя "стоп-кодон" (TAG, TGA или TAA), как правило, не транслируется в аминокислоту, его можно считать частью кодирующей области, но любые фланкирующие последовательности, например промоторы, сайты связывания рибосом, терминаторы транскрипции, интроны и т.п., не являются частью кодирующей области. Границы кодирующей области, как правило, определяются стартовым кодоном на 5'-конце, кодирующим аминоконец получаемого полипептида, и терминирующим трансляцию кодоном на 3'-конце, кодирующим карбоксильный конец получаемого полипептида. Две или более кодирующих областей согласно настоящему изобретению могут присутствовать в одной полинуклеотидной конструкции, например в одном векторе, или в отдельных полинуклеотидных конструкциях, например в отдельных (разных) векторах. Из этого следует, что один вектор может содержать только одну кодирующую область или содержать две или более кодирующих областей, например один вектор может отдельно кодировать связывающий домен-А и связывающий домен-В, как описано ниже. Кроме того, вектор, полинуклеотид или нуклеиновая кислота согласно настоящему изобретению может кодировать гетерологичные кодирующие области, либо слитые, либо не слитые с нуклеиновой кислотой, кодирующей связывающий домен согласно настоящему изобретению. Гетерологичные кодирующие области включают без ограничения специальные элементы или

мотивы, такие как секреторный сигнальный пептид или гетерологичный функциональный домен.

Некоторые белки, секретируемые клетками млекопитающих, ассоциированы с секреторным сигнальным пептидом, который отщепляется от зрелого белка сразу после начала "экспорта" растущей цепи белка через шероховатый эндоплазматический ретикулум. Специалисту в данной области техники известно, что сигнальные пептиды, как правило, слиты с N-концом полипептида и отщепляются от полного или "полноразмерного" полипептида с образованием секретируемой или "зрелой" формы полипептида. В некоторых вариантах реализации нативный сигнальный пептид или функциональное производное данной последовательности, сохраняющее способность направлять секрецию полипептида, который с ним функционально ассоциирован. В качестве альтернативы может быть использован гетерологичный сигнальный пептид млекопитающего, например тканевой активатор плазминогена человека (ТРА) или сигнальный пептид β -глюкуронидазы мыши, или его функциональное производное. Термин "расположенный ниже (downstream)" относится к нуклеотидной последовательности, расположенной в направлении 3' относительно эталонной нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации расположенные ниже нуклеотидные последовательности относятся к последовательностям, которые следуют за точкой начала транскрипции. Например, иницирующий трансляцию кодон гена расположен ниже сайта инициации транскрипции.

Термин "расположенный выше (upstream)" относится к нуклеотидной последовательности, расположенной в направлении 5' относительно эталонной нуклеотидной последовательности. В некоторых вариантах реализации расположенные выше нуклеотидные последовательности относятся к последовательностям, которые расположены с 5'-стороны кодирующей области или точки начала транскрипции. Например, большинство промоторов расположены выше сайта инициации транскрипции. В настоящем описании термин "регуляторная область" относится к нуклеотидным последовательностям, расположенным выше (5'-некодирующие последовательности), в пределах или ниже (3'-некодирующие последовательности) кодирующей области, и влияющим на транскрипцию, процессинг РНК, стабильность или трансляцию соответствующей кодирующей области. Регуляторные области могут включать промоторы, лидерные последовательности трансляции, интроны, последовательности распознавания полиаденилирования, сайты процессинга РНК, сайты связывания эффектора и структуры типа "стебель-петля". Если кодирующая область предназначена для экспрессии в эукариотической клетке, сигнал полиаденилирования и терминирующая транскрипцию последовательность обычно будут расположены в направлении 3' относительно кодирующей последовательности.

Полинуклеотид, кодирующий генный продукт, например полипептид, может содержать промотор и/или другие контролирующие транскрипцию или трансляцию элементы, функционально ассоциированные с одной или более кодирующими областями. В случае функциональной ассоциации кодирующая область для генного продукта, например полипептида, ассоциирована с одной или более регуляторными областями таким образом, чтобы экспрессия генного продукта находилась под влиянием или контролем регуляторной области (областей). Например, кодирующая область и промотор являются "функционально ассоциированными", если индукция функции промотора приводит к транскрипции мРНК, кодирующей генный продукт, кодируемый кодирующей областью, и если природа связи между промотором и кодирующей областью не нарушает способность промотора направлять экспрессию генного продукта или не препятствует возможности транскрибирования ДНК-матрицы. Другие контролирующие транскрипцию элементы помимо промотора, например энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминации транскрипции, также могут быть функционально ассоциированы с кодирующей областью для направления экспрессии генного продукта.

Специалисту в данной области техники известны различные контролирующие транскрипцию области. Данные области включают без ограничения контролирующие транскрипцию области, которые функционируют в клетках позвоночных, такие как, но не ограничивающиеся ими, промоторные и энхансерные сегменты цитомегаловирусов (немедленно-ранний промотор в сочетании с интроном-А), вакуолизирующего обезьяньего вируса 40 (ранний промотор) и ретровирусов (таких как вирус саркомы Рауса). Другие контролирующие транскрипцию области включают области, полученные из генов позвоночных, такие как актин, белок теплового шока, бычий гормон роста и β -глобин кролика, а также другие последовательности, способные контролировать экспрессию генов в эукариотических клетках. Дополнительные подходящие контролирующие транскрипцию области включают тканеспецифические промоторы и энхансеры, а также лимфокин-индуцируемые промоторы (например, промоторы, индуцируемые интерферонами или интерлейкинами).

Подобным образом, различные контролирующие транскрипцию элементы известны специалисту в данной области техники. Данные области включают, но не ограничиваются перечисленными, сайты связывания рибосом, иницирующие и терминирующие трансляцию кодоны, и элементы, полученные из пикорнавирусов (в частности, участок внутренней посадки рибосомы или IRES, также называемый последовательностью СІТЕ).

В настоящем описании термин "экспрессия" относится к процессу, в результате которого полинуклеотид продуцирует генный продукт, например РНК или полипептид. Он включает без ограничения

транскрипцию полинуклеотида в матричную РНК (мРНК), транспортную РНК (тРНК), малую шпилечную РНК (shРНК), малую интерферирующую РНК (siРНК) или любой другой продукт РНК, и трансляцию мРНК в полипептид. В результате экспрессии образуется "генный продукт". В настоящем описании генный продукт может представлять собой либо нуклеиновую кислоту, например матричную РНК, полученную путем транскрипции гена, либо полипептид, транслированный с транскрипта. Генные продукты, описанные в настоящем документе, также включают нуклеиновые кислоты с посттранскрипционными модификациями, например полиаденилированием или сплайсингом, или полипептиды с посттрансляционными модификациями, например метилированием, гликозилированием, присоединением липидов, ассоциацией с другими белковыми субъединицами или протеолитическим расщеплением.

Термин "вектор" относится к любому носителю для клонирования и/или переноса нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Вектор может представлять собой репликон, к которому может быть присоединен другой сегмент нуклеиновой кислоты для осуществления репликации данного присоединенного сегмента. Термин "репликон" относится к любому генетическому элементу (например, плаزمиде, фагу, космиде, хромосома, вирус), функционирующему как автономная единица репликации *in vivo*, т.е. способная к репликации под собственным контролем. Термин "вектор" включает как вирусные, так и невирусные носители для введения нуклеиновой кислоты в клетку *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В данной области техники известно и используется большое количество векторов, включая, например, плазмиды, модифицированные эукариотические вирусы или модифицированные бактериальные вирусы. Встраивание полинуклеотида в подходящий вектор можно осуществлять посредством лигирования соответствующих фрагментов полинуклеотида в выбранный вектор, который имеет комплементарные "липкие" концы. Векторы могут быть созданы таким образом, чтобы кодировать селективируемые маркеры или гены-репортеры, которые обеспечивают отбор или идентификацию клеток, которые "включили в себя" вектор. Экспрессия селективируемых маркеров или генов-репортеров позволяет идентифицировать и/или отбирать клетки-хозяева, которые "включают в себя" и экспрессируют другие кодирующие области, содержащиеся в векторе. Примеры селективируемых маркерных генов, известных и используемых в данной области техники, включают

гены, обеспечивающие резистентность к ампициллину, стрептомицину, гентамицину, канамицину, гигромицину, гербициду биалафос, сульфонамиду и т.п.; и

гены, используемые в качестве фенотипических маркеров, т.е. регуляторные гены антоциана, ген изопентанилтрансферазы и т.п.

Примеры генов-репортеров, известных и используемых в данной области техники, включают люциферазу (Luc), зеленый флуоресцентный белок (GFP), хлорамфеникол-ацетилтрансферазу (CAT), галактозидазу (LacZ), глюкуронидазу (Gus) и т.п. Селективируемые маркеры также можно рассматривать в качестве генов-репортеров.

Термин "плазмиде" относится к экстрахромосомному элементу, часто несущему ген, который не является частью центрального метаболизма клетки и обычно находится в форме кольцевых двухцепочечных молекул ДНК. Такие элементы могут представлять собой автономно реплицирующиеся последовательности, интегрирующиеся в геном последовательности, фаговые или нуклеотидные последовательности, линейные, кольцевые или сверхспиральные, состоящие из одно- или двухцепочечной ДНК или РНК, полученные из любого источника последовательности, в которых ряд нуклеотидных последовательностей был соединен или объединен рекомбинантным путем в уникальную конструкцию, способную вводить в клетку фрагмент промотора и последовательность ДНК для определенного генного продукта наряду с соответствующей 3'-нетранслируемой последовательностью.

Эукариотические вирусные векторы, которые могут быть использованы, включают, но не ограничиваются перечисленными, аденовирусные векторы, ретровирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы и поксвирусные векторы, например векторы на основе вируса осповакцины, бакуловирусные векторы или векторы на основе вируса герпеса. Невирусные векторы включают плазмиды, липосомы, электрически заряженные липиды (цитофектины), комплексы ДНК-белок и биополимеры. Термин "клонирование" относится к "репликону", который является единицей длины нуклеиновой кислоты, которая последовательно реплицируется и который содержит точку инициации репликации, такому как плазмиде, фагу или космиде, к которой может быть присоединен другой сегмент нуклеиновой кислоты для осуществления репликации присоединенного сегмента. Некоторые клонирующие векторы способны к репликации в одном типе клеток, например бактериях, и экспрессии в другом, например эукариотических клетках. Клонирование векторы, как правило, содержат одну или более последовательностей, которые могут быть использованы для отбора клеток, содержащих указанный вектор, и/или один или более многочисленных сайтов клонирования для встраивания представляющих интерес последовательностей нуклеиновых кислот. Термин "вектор экспрессии" относится к носителю, предназначенному для обеспечения экспрессии встроенной последовательности нуклеиновой кислоты после введения в клетку-хозяина. Встраиваемую последовательность нуклеиновой кислоты размещают таким образом, чтобы она была функционально ассоциирована с регуляторными областями, описанными выше.

Векторы вводят в клетки-хозяева способами, хорошо известными в данной области техники, например, путем трансфекции, электропорации, микроинъекции, трансдукции, слияния клеток, использо-

вания диэтиламиноэтилдекстрана, осаждения фосфатом кальция, липофекции (слияние с лизосомами), использования генной пушки или транспортера ДНК-вектора.

В настоящем описании термин "культура", "культивировать" и "культивирование" означает инкубацию клеток в условиях *in vitro*, которые обеспечивают рост, или деление клеток, или поддержание клеток в живом состоянии. В настоящем описании термин "культивируемые клетки" означает клетки, размножаемые *in vitro*. В настоящем описании термин "полипептид" включает единичный "полипептид", а также множество "полипептидов" и относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (также известными как пептидные связи). Термин "полипептид" относится к любой цепи или цепям из двух или более аминокислот и не относится к конкретной длине продукта. Таким образом, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, "белок", "цепь аминокислот" или любой другой термин, употребляемый для обозначения цепи или цепей из двух или более аминокислот, включены в определение "полипептида", и термин "полипептид" может употребляться вместо любого из данных терминов или взаимозаменяемо. Термин "полипептид" также относится к продуктам постэкспрессионных модификаций полипептида, включая без ограничения гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию известными защитными/блокирующими группами, протеолитическое расщепление или модификацию не встречающимися в природе аминокислотами. Полипептид может быть получен из природного биологического источника или получен с помощью рекомбинантной технологии, но не обязательно транслируется с указанной последовательности нуклеиновой кислоты. Он может быть получен любым способом, в том числе путем химического синтеза.

Термин "выделенный" полипептид или его фрагмент, вариант или производное относится к полипептиду, который не находится в естественной среде. Не требуется конкретного уровня очистки. Например, выделенный полипептид может быть просто извлечен из природной или естественной среды. Полученные рекомбинантным способом полипептиды и белки, экспрессированные в клетках-хозяевах, считаются выделенными для цели настоящего изобретения, так же как и нативные или рекомбинантные полипептиды, которые были отделены, фракционированы или частично или по существу очищены любым подходящим способом.

В настоящее изобретение также включены фрагменты или варианты полипептидов и их любая комбинация. Термин "фрагмент" или "вариант", относящийся к полипептидным связывающим доменам или связывающим молекулам согласно настоящему изобретению, включает любые полипептиды, которые сохраняют по меньшей мере некоторые свойства (например, аффинность связывания FcRn для FcRn-связывающего домена или варианта Fc, коагулирующая активность для варианта FVIII или активность связывания FVIII для VWFфрагмента фактора фон Виллебранда) исходного полипептида. Фрагменты полипептидов включают протеолитические фрагменты, а также фрагменты с делецией в дополнение к конкретным фрагментам антител, рассмотренным в иных местах настоящего документа, но не включают встречающийся в природе полноразмерный полипептид (или зрелый полипептид). Варианты полипептидных связывающих доменов или связывающих молекул согласно настоящему изобретению включают фрагменты, описанные выше, а также полипептиды с измененными аминокислотными последовательностями в результате замен, делеций или встраиваний аминокислот. Варианты могут быть встречающимися в природе или не встречающимися в природе. Не встречающиеся в природе варианты могут быть получены с использованием известных в данной области техники методов мутагенеза. Вариантные полипептиды могут содержать консервативные или неконсервативные замены, делеций или присоединения аминокислот. В настоящем описании термин "VWFфрагмент фактора фон Виллебранда" или "фрагменты VWF" означает любые фрагменты VWF, которые взаимодействуют с FVIII и сохраняют по меньшей мере одно или более свойств, обычно обеспечиваемых полноразмерным VWF в отношении FVIII, например предотвращение преждевременной активации с образованием FVIIIa, предотвращение преждевременного протеолиза, предотвращение ассоциации с фосфолипидными мембранами, которое может привести к преждевременному клиренсу, предотвращение связывания с рецепторами, ответственными за клиренс FVIII, которые могут связывать "оголенный" FVIII, но не FVIII, связанный с VWF, и/или стабилизация взаимодействий тяжелой цепи и легкой цепи FVIII. "Консервативная замена аминокислоты" представляет собой замену, при которой аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком, имеющим схожую боковую цепь. В данной области техники были определены семейства аминокислотных остатков, имеющих схожие боковые цепи, включая основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислотные боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, если аминокислоту в полипептиде заменяют другой аминокислотой из того же семейства боковых цепей, данная замена считается консервативной. В другом варианте реализации ряд аминокислот может быть консервативно заменен структурно схожим рядом, отличающимся порядком и/или составом членов семейства боковых цепей. Как известно в данной области техники, "идентичность последовательностей" между двумя полипептидами определяют путем сравнения аминокислотной последовательности одного полипептида с последо-

вательностью второго полипептида. При рассмотрении в настоящем описании, то, является ли какой-либо конкретный полипептид по меньшей мере примерно на 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 или 100% идентичным другому полипептиду может быть определено с использованием методов и компьютерных программ/программного обеспечения, известных в данной области техники, таких как, но не ограниченных ими, программа BESTFIT (Висконсинский пакет программ для анализа последовательностей (Wisconsin Sequence Analysis Package), версия 8 для Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI53711). В BESTFIT используется алгоритм локальной гомологии Смита (Smith) и Уотермана (Waterman), *Advances in Applied Mathematics*, 2:482-489 (1981), для обнаружения сегмента наибольшей гомологии двух последовательностей. При использовании BESTFIT или любой другой программы для выравнивания последовательностей для определения того, является ли конкретная последовательность, например на 95% идентичной эталонной последовательности согласно настоящему изобретению, параметры устанавливаются, конечно, так, чтобы процент идентичности рассчитывался по всей длине эталонной полипептидной последовательности, и чтобы допускались пробелы (гэпы) в гомологии до 5% от общего количества аминокислот в эталонной последовательности.

В настоящем описании "аминокислоту, соответствующую" или "эквивалентную аминокислоту" в последовательности VWF или последовательности белка FVIII идентифицируют путем выравнивания для максимального увеличения идентичности или сходства между первой последовательностью VWF или FVIII и второй последовательностью VWF или FVIII. Номер, используемый для идентификации эквивалентной аминокислоты во второй последовательности VWF или FVIII, соответствует номеру, используемому для идентификации соответствующей аминокислоты в первой последовательности VWF или FVIII.

В настоящем описании термин "сайт встраивания" относится к положению в полипептиде FVIII или его фрагменте, варианте или производном, которое находится непосредственно выше положения, в котором может быть встроен гетерологичный фрагмент. "Сайт встраивания" обозначается номером, при этом указанный номер представляет собой номер аминокислоты в зрелом нативном FVIII (SEQ ID NO: 4), которой соответствует данный сайт встраивания, которая является непосредственно N-концевой по отношению к положению встраивания. Например, термин "а3 содержит XTEN в сайте встраивания, соответствующем аминокислоте 1656 последовательности SEQ ID NO: 4" означает, что гетерологичный фрагмент расположен между двумя аминокислотами, соответствующими аминокислоте 1656 и аминокислоте 1657 последовательности SEQ ID NO: 4.

В настоящем описании термин "непосредственно ниже аминокислоты" относится к положению сразу после концевой карбоксильной группы указанной аминокислоты. Подобным образом термин "непосредственно выше аминокислоты" относится к положению сразу после концевой аминогруппы указанной аминокислоты. Следовательно, в настоящем описании термин "между двумя аминокислотами сайта встраивания" относится к положению, в котором XTEN или любой другой полипептид встроен между двумя соседними аминокислотами. Таким образом, термины "встроенный непосредственно ниже аминокислоты" и "встроенный между двумя аминокислотами сайта встраивания" употребляются в качестве синонимов термину "встроенный в сайт встраивания". В настоящем описании термины "встроенный", "встраивают", "встроенный в" или грамматически родственные термины относятся к положению XTEN в химерном полипептиде относительно аналогичного положения в нативном зрелом FVIII человека. В настоящем описании указанные термины относятся к характеристикам рекомбинантного полипептида FVIII относительно нативного зрелого FVIII человека и не означают, подразумевают или предполагают какие-либо способы или процессы, посредством которых был получен химерный полипептид. Например, в отношении химерного полипептида, предложенного согласно настоящему изобретению, термин "XTEN встроена непосредственно ниже остатка 745 полипептида FVIII" означает, что указанный химерный полипептид содержит XTEN непосредственно ниже аминокислоты, соответствующей аминокислоте 745 в нативном зрелом FVIII человека, например, ограниченную аминокислотами, соответствующими аминокислотам 745 и 746 нативного зрелого FVIII человека.

"Гибридный" или "химерный" белок содержит первую аминокислотную последовательность, связанную со второй аминокислотной последовательностью, с которой она не связана в природе. Аминокислотные последовательности, которые обычно встречаются в отдельных белках, могут быть объединены в гибридном полипептиде, или аминокислотные последовательности, которые обычно встречаются в одном и том же белке, могут быть помещены в новую конфигурацию в гибридном полипептиде, например слияние домена фактора VIII согласно настоящему изобретению с доменом Fc Ig. Гибридный белок получают, например, путем химического синтеза или путем получения и трансляции полинуклеотида, в котором пептидные области закодированы в желаемом отношении. Химерный белок может дополнительно содержать вторую аминокислотную последовательность, ассоциированную с первой аминокислотной последовательностью ковалентной пептидной связью или нековалентной связью.

В настоящем описании термин "период полувыведения" относится к биологическому периоду полувыведения конкретного полипептида *in vivo*. Период полувыведения может представлять собой время, необходимое для выведения половины введенного субъекту количества из кровообращения и/или других тканей у животного. Когда кривую клиренса конкретного полипептида строят в зависимости от времени,

указанная кривая обычно является двухфазной с быстрой α -фазой и более длительной β -фазой. α -фаза, как правило, представляет собой уравнивание введенного полипептида Fc между внутри- и внесосудистым пространством и отчасти определяется размером полипептида. β -фаза, как правило, представляет собой катаболизм полипептида во внутрисосудистом пространстве. В некоторых вариантах реализации FVIII и химерные белки, содержащие FVIII, являются монофазными и, таким образом, не имеют альфа-фазы, а имеют только одну бета-фазу. Следовательно, в некоторых вариантах реализации термин "период полувыведения", употребляемый в настоящем описании, относится к периоду полувыведения полипептида в β -фазе. Типичный период полувыведения β -фазы антитела человека у людей составляет 21 день.

В настоящем описании термин "связанный" относится к первой аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности, ковалентно или нековалентно присоединенной ко второй аминокислотной последовательности или нуклеотидной последовательности соответственно. Первая аминокислотная или нуклеотидная последовательность может быть напрямую присоединена или соединена со второй аминокислотной или нуклеотидной последовательностью, или в качестве альтернативы вставочная последовательность может ковалентно присоединять первую последовательность ко второй последовательности. Термин "связанный" означает не только слияние первой аминокислотной последовательности со второй аминокислотной последовательностью на C-конце или N-конце, но также включает встраивание всей первой аминокислотной последовательности (или второй аминокислотной последовательности) в любые две аминокислоты во второй аминокислотной последовательности (или первой аминокислотной последовательности соответственно). В одном из вариантов реализации первая аминокислотная последовательность может быть связана со второй аминокислотной последовательностью пептидной связью или линкером. Первая нуклеотидная последовательность может быть связана со второй нуклеотидной последовательностью фосфодиэфирной связью или линкером. Линкер может представлять собой пептид, или полипептид (для полипептидных цепей), или нуклеотид, или нуклеотидную цепь (для нуклеотидных цепей), или любую химическую группу (как для полипептидных, так и для полинуклеотидных цепей). Термин "связанный" также обозначается соединительной черточкой (-).

В настоящем описании термин "ассоциированный с" относится к ковалентной или нековалентной связи, образованной между первой аминокислотной цепью и второй аминокислотной цепью. В одном из вариантов реализации термин "ассоциированный с" означает ковалентную непептидную связь или нековалентную связь. Данная ассоциация может быть обозначена двоеточием, т.е. (:). В другом варианте реализации она означает ковалентную связь за исключением пептидной связи. Например, аминокислота цистеин содержит тиольную группу, которая может образовывать дисульфидную связь или мостик с тиольной группой во втором остатке цистеина. В большинстве встречающихся в природе молекул IgG области CN1 и CL ассоциированы дисульфидной связью и две тяжелые цепи ассоциированы двумя дисульфидными связями в положениях, соответствующих 239 и 242 с использованием системы нумерации Кэбота (положение 226 или 229, система нумерации ЕС). Примеры ковалентных связей включают, но не ограничиваются перечисленными, пептидную связь, металлическую связь, водородную связь, дисульфидную связь, сигма-связь, пи-связь, дельта-связь, гликозидную связь, агностическую связь, изогнутую связь, дипольную связь, пи-дативное взаимодействие, двойную связь, тройную связь, четверную связь, пятикратную связь, шестикратную связь, конъюгацию, гиперконъюгацию, ароматичность, гаптность (hapticity) или антисвязывание. Неограничивающие примеры нековалентной связи включают ионную связь (например, катионная пи-связь или солевая связь), металлическую связь, водородную связь (например, диводородная связь, диводородный комплекс, низкобарьерная водородная связь или симметричная водородная связь), ван-дер-ваальсовы силы, лондоновскую дисперсионную силу, механическую связь, галогенную связь, ауروفильность, интеркаляцию, стэкинг, энтропийную силу или химическую полярность.

В настоящем описании термин "гибрид мономер-димер" относится к химерному белку, содержащему первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, которые ассоциированы друг с другом дисульфидной связью, при этом первая цепь содержит фактор свертывания крови, например фактор VIII, и первую область Fc, а вторая цепь содержит, по существу состоит из или состоит из второй области Fc без фактора свертывания крови. Таким образом, гибридная конструкция мономер-димер представляет собой гибрид, включающий мономерную составляющую, содержащую только один фактор свертывания крови, и димерную составляющую, содержащую две области Fc.

В настоящем описании термин "сайт расщепления" или "сайт ферментативного расщепления" относится к сайту, распознаваемому ферментом. Некоторые сайты ферментативного расщепления включают сайт внутриклеточного процессинга. В одном из вариантов реализации полипептид содержит сайт ферментативного расщепления, расщепляемый ферментом, который активируется в каскаде свертывания крови, в результате чего расщепление таких сайтов происходит в месте образования сгустка крови. Такие типичные сайты включают, например, сайты, распознаваемые тромбином, фактором XIa или фактором Xa. Типичные сайты расщепления FXIa включают, например, TQSFNDFTR (SEQ ID NO: 45) и SVSQTSLKTR (SEQ ID NO: 46). Типичные сайты расщепления тромбином включают, например, DFLAEGGGVR (SEQ

ID NO: 47), TTKIKPR (SEQ ID NO: 48), LVPRG (SEQ ID NO: 49) и ALRPR (аминокислоты с 1 по 5 последовательности SEQ ID NO: 50). Другие сайты ферментативного расщепления известны в данной области техники.

В настоящем описании термин "сайт процессинга" или "сайт внутриклеточного процессинга" относится к типу сайта ферментативного расщепления в полипептиде, который является мишенью для ферментов, функционирующих после трансляции полипептида. В одном из вариантов реализации такие ферменты функционируют во время транспорта из просвета аппарата Гольджи в транскомпаратмент аппарата Гольджи. Ферменты внутриклеточного процессинга расщепляют полипептиды перед секрецией белка из клетки. Примеры таких сайтов процессинга включают, например, сайты, на которые прицельно воздействует семейство эндопептидаз PACE/фурина (где PACE является акронимом для фермента, расщепляющего белок в месте спаренных основных аминокислот (Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme)). Данные ферменты локализованы в мембране Гольджи и расщепляют белки на карбоксиконцевой стороне последовательности-мотива Arg-[любой остаток]-(Lys или Arg)-Arg. В настоящем описании "фуриновое" семейство ферментов включает, например, PCSK1 (также известный как PC1/PC3), PCSK2 (также известный как PC2), PCSK3 (также известный как фурин или PACE), PCSK4 (также известный как PC4), PCSK5 (также известный как PC5 или PC6), PCSK6 (также известный как PACE4) или PCSK7 (также известный как PC7/LPC, PC8 или SPC7). Другие сайты процессинга известны в данной области техники. Очевидно, что в конструкциях, содержащих более одного сайта процессинга или расщепления, такие сайты могут быть одинаковыми или разными.

Термин "фурин" относится к ферментам, соответствующим ЕС № 3.4.21.75. Фурин представляет собой подобную субтилизину пропротеинконвертазу, также известную как PACE (фермент, расщепляющий белок в месте спаренных основных аминокислот). Фурин удаляет фрагменты неактивных белков-предшественников с превращением их в биологически активные белки. Во время внутриклеточного транспорта пропептид VWF может быть отщеплен от зрелой молекулы VWF под действием фермента фурина. В некоторых вариантах реализации фурин отщепляет D1D2 от D'D3 в VWF. В других вариантах реализации нуклеотидная последовательность, кодирующая фурин, может быть экспрессирована совместно с нуклеотидной последовательностью, кодирующей VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, так что домены D1D2 могут отщепляться внутри клетки под действием фурина.

Очевидно, что в конструкциях, содержащих более одного сайта процессинга или расщепления, такие сайты могут быть одинаковыми или разными.

В настоящем описании термин "процессируемый линкер" относится к линкеру, содержащему по меньшей мере один сайт внутриклеточного процессинга, описанный в иных местах настоящего документа.

В настоящем описании термин "нарушение гемостаза" означает генетически наследованное или приобретенное состояние, характеризующееся склонностью к кровоизлиянию либо спонтанному, либо в результате травмы, вследствие нарушенной способности или неспособности образовывать фибриновый сгусток. Примеры таких нарушений включают гемофилию. Три основные формы представляют собой гемофилию А (дефицит фактора VIII), гемофилию В (дефицит фактора IX или "болезнь Кристмаса") и гемофилию С (дефицит фактора XI, умеренная склонность к кровотечению). Другие нарушения гемостаза включают, например, болезнь фон Виллебранда, дефицит фактора XI (дефицит РТА), дефицит фактора XII, дефицит или структурные нарушения фибриногена, протромбина, фактора V, фактора VII, фактора X или фактора XIII, синдром Бернара-Сулье, который представляет собой дефект или дефицит GPIb (GPIb, рецептор для VWF, может иметь дефект и приводит к отсутствию образования первичного сгустка (первичный гемостаз) и повышенной склонности к кровотечениям), и тромбастению Гланцманна и Негели (тромбастения Гланцманна). При печеночной недостаточности (острой и хронической формах) происходит недостаточная выработка факторов свертывания крови печенью; это может увеличивать риск кровотечения.

Химерные молекулы согласно настоящему изобретению можно применять профилактически. В настоящем описании термин "профилактическое лечение" относится к введению молекулы до эпизода кровотечения. В одном из вариантов реализации субъект, нуждающийся в общем гемостатическом средстве, подвергается или вскоре подвергнется оперативному вмешательству. Химерный белок согласно настоящему изобретению может быть введен до или после оперативного вмешательства в качестве профилактического средства. Химерный белок согласно настоящему изобретению может быть введен во время или после оперативного вмешательства для контроля острого эпизода кровотечения. Указанное оперативное вмешательство может включать, но не ограничивается ими, трансплантацию печени, резекцию печени, стоматологические процедуры или трансплантацию стволовых клеток.

Химерный белок согласно настоящему изобретению также применяют для лечения по необходимости. Термин "лечение по необходимости" относится к введению химерной молекулы в ответ на симптомы эпизода кровотечения или перед активностью, которая может вызвать кровотечение. В соответствии с одним из аспектов лечение по необходимости можно осуществлять у субъекта, когда начинается кровотечение, например, после повреждения или когда ожидается кровотечение, например, перед оперативным вмешательством. В соответствии с другим аспектом лечение по необходимости можно осуществлять до активности, которая увеличивает риск кровотечения, такой как контактные виды спорта.

В настоящем описании термин "острое кровотечение" относится к эпизоду кровотечения вне зависимости от первопричины. Например, у субъекта может быть травма, уремия, наследственное нарушение, сопровождающееся повышенной кровоточивостью (например, дефицит фактора VII), нарушение функции тромбоцитов или резистентность вследствие выработки антител к факторам свертывания крови. В настоящем описании термин "лечить", "лечение", "осуществление лечения" относится, например, к

уменьшению тяжести заболевания или состояния; уменьшению продолжительности течения заболевания;

уменьшению интенсивности одного или более симптомов, связанных с заболеванием или состоянием;

обеспечению полезных эффектов для субъекта с заболеванием или состоянием без обязательного излечения указанного заболевания или состояния или профилактике одного или более симптомов, связанных с заболеванием или состоянием.

В одном из вариантов реализации термин "осуществление лечения" или "лечение" означает поддержание минимального уровня FVIII, составляющего по меньшей мере примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 МЕ/дл, у субъекта путем введения химерного белка или VWFфрагмента фактора фон Виллебранда согласно настоящему изобретению. В другом варианте реализации термин "осуществление лечения" или "лечение" означает поддержание минимального уровня FVIII от примерно 1 МЕ/дл до примерно 20 МЕ/дл, от примерно 2 МЕ/дл до примерно 20 МЕ/дл, от примерно 3 МЕ/дл до примерно 20 МЕ/дл, от примерно 4 МЕ/дл до примерно 20 МЕ/дл, от примерно 5 МЕ/дл до примерно 20 МЕ/дл, от примерно 6 МЕ/дл до примерно 20 МЕ/дл, от примерно 7 МЕ/дл до примерно 20 МЕ/дл, от примерно 8 МЕ/дл до примерно 20 МЕ/дл, от примерно 9 МЕ/дл до примерно 20 МЕ/дл или от примерно 10 МЕ/дл до примерно 20 МЕ/дл. Термин "лечение" или "осуществление лечения" заболевания или состояния также может включать поддержание активности FVIII у субъекта на уровне, сопоставимом с по меньшей мере примерно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20% активности FVIII у субъекта, не страдающего гемофилией. Минимальный уровень, необходимый для лечения, может быть измерен одним или более известными способами и может быть скорректирован (повышен или понижен) для каждого человека.

Химерные белки.

Настоящее изобретение относится к увеличению периода полувыведения белка, представляющего собой фактор VIII, с использованием VWFфрагмента фактора фон Виллебранда и последовательности XTEN путем предотвращения или ингибирования ассоциации фактора, ограничивающего период полувыведения FVIII, т.е. VWFэндогенного фактора фон Виллебранда, с белком FVIII. Эндогенный VWF ассоциирует с от примерно 95% до примерно 98% FVIII в нековалентные комплексы. Тогда как эндогенный VWF является фактором, ограничивающим период полувыведения FVIII, также известно, что эндогенный VWF, связанный с белком FVIII, защищает FVIII различными способами. Например, полноразмерный VWF (в виде мультимера, имеющего массу примерно 250 кДа) может защищать FVIII от расщепления протеазой и активации FVIII, стабилизировать тяжелую цепь и/или легкую цепь FVIII и предотвращать клиренс FVIII фагоцитарными рецепторами. Но в то же время эндогенный VWF ограничивает период полувыведения FVIII путем предотвращения пиноцитоза и путем выведения комплекса FVIII-VWF из системы по пути клиренса VWF. Без конкретного теоретического обоснования считается, что эндогенный VWF является фактором, ограничивающим период полувыведения, который препятствует более чем примерно двукратному увеличению периода полувыведения белка FVIII, слитого с "увеличителем" периода полувыведения, по сравнению с периодом полувыведения FVIII дикого типа. Следовательно, настоящее изобретение относится к предотвращению или ингибированию взаимодействия между VWFэндогенным фактором фон Виллебранда и белком FVIII с использованием VWFфрагмента фактора фон Виллебранда, что тем самым увеличивает период полувыведения белка FVIII, путем использования только последовательности XTEN или последовательности XTEN в комбинации с константной областью Ig или ее частью. Последовательность XTEN может быть связана с белком FVIII или VWFфрагментом фактора фон Виллебранда. Таким образом, белок FVIII, ассоциированный с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, медленнее выводится из кровообращения одним или более рецепторами, ответственными за клиренс VWF, и, следовательно, может демонстрировать полное увеличение периода полувыведения последовательностью XTEN или последовательностью XTEN в комбинации с константной областью Ig по сравнению с FVIII дикого типа или белком FVIII, не содержащим VWFфрагмент фактора фон Виллебранда.

В одном из вариантов реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда ассоциирован (или связан) с белком FVIII ковалентной или нековалентной связью. Однако в некоторых случаях физическая блокировка или химическая ассоциация (например, образование нековалентных связей) VWFфрагмента фактора фон Виллебранда и белка FVIII может не быть достаточно сильной для обеспечения стабильного комплекса, содержащего белок FVIII и VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, в присутствии VWFэндогенного фактора фон Виллебранда. Например, VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, образующий нековалентную связь с белком FVIII без каких-либо других связей, может легко отделяться от белка FVIII *in vivo* в присутствии VWFэндогенного фактора фон Виллебранда с заменой VWFфрагмента фактора фон Виллебранда (например, рекомбинантного VWF, т.е. rVWF) на эндогенный VWF. Следовательно,

но, белок FVIII, нековалентно связанный с VWFэндогенным фактором фон Виллебранда, будет претерпевать путь клиренса VWF и легко выводиться из системы. Для предотвращения диссоциации VWFфрагмента фактора фон Виллебранда с белком FVIII в некоторых вариантах реализации ассоциация или связь между белком FVIII и VWFфрагментом фактора фон Виллебранда представляет собой ковалентную связь, например пептидную связь, одну или более аминокислот или дисульфидную связь. В некоторых вариантах реализации ассоциация (т.е. связь) между присоединяемым фрагментом и белком FVIII представляет собой пептидную связь или линкер между белком FVIII и VWFфрагментом фактора фон Виллебранда ("линкер FVIII/VWF"). Неограничивающие примеры линкера описаны в иных местах настоящего документа. В некоторых вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда представляет собой полипептид, содержащий, по существу состоящий из или состоящий из по меньшей мере примерно 10, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2500, 3000 или 4000 аминокислот. Неограничивающие примеры VWFфрагмента фактора фон Виллебранда описаны в иных местах настоящего документа.

В некоторых вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда химически (например, нековалентно) связывается с или физически блокирует один или более сайтов VWFсвязывания фактора фон Виллебранда в белке FVIII. Сайт VWFсвязывания фактора фон Виллебранда в белке FVIII находится в пределах домена A3 или домена C2 белка FVIII. В других вариантах реализации сайт VWFсвязывания фактора фон Виллебранда в белке FVIII находится в пределах домена A3 и домена C2. Например, сайт VWFсвязывания фактора фон Виллебранда в белке FVIII может соответствовать аминокислотам с 1669 по 1689 и/или с 2303 по 2332 последовательности SEQ ID NO: 4 [полноразмерный зрелый FVIII].

Согласно настоящему изобретению также предложен химерный белок (содержащий белок FVIII и VWFфрагмент фактора фон Виллебранда), дополнительно содержащий одну или более последовательностей XTEN, которые обеспечивают свойства дополнительного увеличения периода полувыведения. Одна или более последовательностей XTEN могут быть встроены в белок FVIII или VWFфрагмент фактора фон Виллебранда или связаны с N-концом или C-концом белка FVIII или VWFфрагмента фактора фон Виллебранда. Настоящее изобретение также включает белок FVIII, связанный с последовательностью XTEN (первым фрагментом, увеличивающим период полувыведения) и константной областью Ig или ее частью (вторым фрагментом, увеличивающим период полувыведения), так чтобы указанные два фрагмента, увеличивающие период полувыведения, увеличивали период полувыведения белка FVIII по двум разным механизмам.

В некоторых вариантах реализации химерный белок содержит белок FVIII, связанный с первой константной областью Ig или ее частью (например, первым партнером по связыванию FcRn), VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, связанный со второй константной областью Ig или ее частью (например, вторым партнером по связыванию FcRn) и одну или более последовательностей XTEN, встроенных или связанных с указанным белком FVIII или VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, при этом VWFфрагмент фактора фон Виллебранда предотвращает связывание фактора, ограничивающего период полувыведения FVIII (например, VWFэндогенного фактора фон Виллебранда), с белком FVIII, при этом первая и вторая константные области Ig или их части образуют ковалентную связь, например дисульфидную связь, и одна или более последовательностей XTEN увеличивают период полувыведения белка FVIII. В некоторых вариантах реализации химерный белок согласно настоящему изобретению содержит белок FVIII, связанный с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда необязательным линкером (т.е. линкером FVIII/VWF), и одну или более последовательностей XTEN, встроенных или связанных с указанным белком FVIII или VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, при этом VWFфрагмент фактора фон Виллебранда предотвращает связывание фактора, ограничивающего период полувыведения FVIII (например, VWFэндогенного фактора фон Виллебранда), с белком FVIII, и одна или более последовательностей XTEN увеличивают период полувыведения белка FVIII. В соответствии с одним из аспектов необязательный линкер (линкер FVIII/VWF) содержит мотив распознавания сортазой. В соответствии с другим аспектом необязательный линкер (линкер FVIII/VWF) содержит расщепляемый сайт. Примеры расщепляемого линкера (т.е. линкера, содержащего один или более сайтов расщепления) описаны в иных местах настоящего документа.

Химерный белок согласно настоящему изобретению содержит, но не ограничивается ими,

(1) VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, содержащий домен D' и домен D3, последовательность XTEN и FVIII, при этом последовательность XTEN связана с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда;

(2) белок FVIII, последовательность XTEN и константную область Ig или ее часть, при этом белок FVIII связан с последовательностью XTEN и константной областью Ig или ее частью; или

(3) белок FVIII, последовательность XTEN и VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, при этом последовательность XTEN связана с белком FVIII на C-конце или N-конце или встроена непосредственно ниже одной или более аминокислот (например, один или более сайтов встраивания XTEN) FVIII, и VWFфрагмент фактора фон Виллебранда и белок FVIII ассоциированы друг с другом.

(1) Фрагмент фактора фон Виллебранда (VWF), связанный с XTEN и FVIII.

Настоящее изобретение относится к химерному белку, содержащему

(i) VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, содержащий домен D' и домен VWFD3 фактора фон Виллебранда;

(ii) последовательность XTEN; и

(iii) белок FVIII,

при этом (i), (ii) и (iii) связаны или ассоциированы друг с другом.

VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, связанный с последовательностью XTEN, в виде части химерного белка согласно настоящему изобретению ассоциирует с белком FVIII, что таким образом предотвращает или ингибирует взаимодействие между VWFэндогенным фактором фон Виллебранда и белком FVIII. В некоторых вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, способный предотвращать или ингибировать связывание белка FVIII с VWFэндогенным фактором фон Виллебранда, в то же время может обладать по меньшей мере одним подобным VWF защитным свойством в отношении FVIII. Примеры подобных VWF защитных свойств в отношении FVIII включают, но не ограничиваются перечисленными, защиту FVIII от расщепления протеазой и активации FVIII, стабилизацию тяжелой и/или легкой цепи FVIII и предотвращение клиренса FVIII фагоцитарными рецепторами. В результате VWFфрагмент фактора фон Виллебранда может предотвращать клиренс белка FVIII по пути клиренса VWF, что таким образом снижает клиренс FVIII из системы кровообращения. В некоторых вариантах реализации фрагменты VWF согласно настоящему изобретению связываются или ассоциируются с белком FVIII и/или физически или химически блокируют сайт VWFсвязывания фактора фон Виллебранда в белке FVIII. Таким образом, белок FVIII, ассоциированный с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, выводится из кровообращения медленнее по сравнению с FVIII дикого типа или FVIII, не ассоциированным с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда.

В одном из вариантов реализации настоящее изобретение относится к химерному белку, содержащему

(i) VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, содержащий домен D' и домен VWFD3 фактора фон Виллебранда;

(ii) последовательность XTEN; и

(iii) белок FVIII, при этом последовательность XTEN связана с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда (например, (a1) V-X или (a2) X-V, где V содержит VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, и X содержит последовательность XTEN), и VWFфрагмент фактора фон Виллебранда связан или ассоциирован с белком FVIII.

В другом варианте реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда и последовательность XTEN могут быть связаны линкером (например, (a3) V-L-X или (a4) X-L-V) или пептидной связью. Указанный линкер может представлять собой расщепляемый линкер, например расщепляемый тромбином линкер, который может быть расщеплен в месте коагуляции. В других вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, последовательность XTEN и белок FVIII "помещены" в одну полипептидную цепь. В других вариантах реализации химерный белок содержит две полипептидные цепи:

первую цепь, содержащую VWFфрагмент фактора фон Виллебранда и последовательность XTEN; и вторую цепь, содержащую белок FVIII.

В других вариантах реализации химерный белок содержит три полипептидные цепи:

первую цепь, содержащую VWFфрагмент фактора фон Виллебранда и последовательность XTEN;

вторую цепь, содержащую легкую цепь FVIII; и

третью цепь, содержащую тяжелую цепь FVIII,

при этом первая цепь и вторая цепь ассоциированы друг с другом (например, ковалентная связь, например, дисульфидная связь) и вторая цепь и третья цепь ассоциированы друг с другом (например, металлическая связь).

В других вариантах реализации последовательность XTEN может быть связана с N-концом или C-концом VWFфрагмента фактора фон Виллебранда или встроена непосредственно ниже одной или более аминокислот во фрагменте VWF.

В некоторых вариантах реализации химерный белок согласно настоящему изобретению имеет формулу, включающую

(a) V-X-FVIII,

(b) FVIII-X-V,

(c) V-X:FVIII,

(d) X-V:FVIII,

(e) FVIII:V-X

(f) FVIII:X-V или

(a5) X-V-FVIII,

где V содержит VWFфрагмент фактора фон Виллебранда,

X содержит одну или более последовательностей XTEN, и FVIII содержит белок FVIII,

(-) представляет собой пептидную связь или одну или более аминокислот, и

(:) представляет собой химическую ассоциацию или физическую ассоциацию.

В одном из вариантов реализации (:) представляет собой химическую ассоциацию, например по меньшей мере одну непептидную связь. В другом варианте реализации химическая ассоциация, т.е. (:), представляет собой ковалентную связь. В других вариантах реализации химическая ассоциация, т.е. (:), представляет собой нековалентное взаимодействие, например ионное взаимодействие, гидрофобное взаимодействие, гидрофильное взаимодействие, ван-дер-ваальсово взаимодействие или водородную связь. В других вариантах реализации (:) представляет собой непептидную ковалентную связь. В других вариантах реализации (:) представляет собой пептидную связь. В других вариантах реализации (:) представляет собой физическую ассоциацию между двумя последовательностями, при которой часть первой последовательности располагается очень близко ко второй последовательности, в результате чего первая последовательность защищает от или блокирует взаимодействие части второй последовательности с другим фрагментом и, кроме того, данная физическая ассоциация поддерживается, не позволяя второй последовательности взаимодействовать с другими фрагментами. Ориентация полипептидных формул в настоящем описании приведена от N-конца (слева) к C-концу (справа). Например, формула V-X-FVIII означает формулу NH₂-V-X-FVIII-COOH. В одном из вариантов реализации формулы, описанные в настоящем документе, могут содержать любые дополнительные последовательности между двумя фрагментами. Например, формула V-X-FVIII может дополнительно содержать любые последовательности на N-конце V между V и X, между X и FVIII или на C-конце FVIII, если не указано иное. В другом варианте реализации соединительная черточка (-) означает пептидную связь.

В других вариантах реализации химерный белок согласно настоящему изобретению имеет формулу, включающую

- (a) V(X1)-X2-FVIII,
- (b) FVIII-X2-V(X1),
- (c) V(X1):FVIII,
- (d) FVIII:V(X1) или
- (a5) X2-V(X1)-FVIII,

где V(X1) содержит VWFфрагмент фактора фон Виллебранда и первую последовательность XTEN (X1),

при этом указанная последовательность XTEN встроена непосредственно ниже одной или более аминокислот во фрагменте VWF,

X2 содержит одну или более необязательных последовательностей XTEN,

FVIII содержит белок FVIII,

(-) представляет собой пептидную связь или одну или более аминокислот, и

(:) представляет собой химическую ассоциацию или физическую ассоциацию.

В некоторых вариантах реализации химерный белок содержит

(i) VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, содержащий домен D' и домен VWFD3 фактора фон Виллебранда;

(ii) последовательность XTEN;

(iii) белок FVIII;

(iv) первый необязательный линкер; и

(v) второй необязательный линкер, при этом последовательность XTEN связана с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда и/или с белком FVIII линкером.

В некоторых вариантах реализации химерный белок имеет формулу, включающую

- (b1) V-L1-X-L2-FVIII,
- (b2) FVIII-L2-X-L1-V,
- (b3) V-L1-X:FVIII,
- (b4) X-L1-V:FVIII,
- (b5) FVIII:V-L1-X,
- (b6) FVIII:X-L1-V,
- (b7) X-L1-V-L2-FVIII или
- (b8) FVIII-L2-V-L1-X,

где V содержит VWFфрагмент фактора фон Виллебранда,

X содержит одну или более последовательностей XTEN,

FVIII содержит белок FVIII;

L1 содержит первый необязательный линкер, например первый расщепляемый линкер,

L2 содержит второй необязательный линкер, например второй расщепляемый линкер или возможный процессуемый линкер,

(-) представляет собой пептидную связь или одну или более аминокислот, и

(:) представляет собой химическую ассоциацию или физическую ассоциацию.

В одном из вариантов реализации (:) представляет собой химическую ассоциацию, например по меньшей мере одну непептидную связь. В другом варианте реализации химическая ассоциация, т.е. (:), представляет собой ковалентную связь. В других вариантах реализации химическая ассоциация, т.е. (:), представляет собой нековалентное взаимодействие, например ионное взаимодействие, гидрофобное взаимодействие, гидрофильное взаимодействие, ван-дер-ваальсово взаимодействие или водородную связь. В других вариантах реализации (:) представляет собой непептидную ковалентную связь. В других вариантах реализации (:) представляет собой пептидную связь. В других вариантах реализации (:) представляет собой физическую ассоциацию между двумя последовательностями, при которой часть первой последовательности располагается очень близко ко второй последовательности, в результате чего первая последовательность защищает от или блокирует взаимодействие части второй последовательности с другим фрагментом и, кроме того, данная физическая ассоциация поддерживается, не позволяя второй последовательности взаимодействовать с другими фрагментами. Ориентация полипептидных формул в настоящем описании приведена от N-конца (слева) к C-концу (справа). Например, формула (b1) V-L1-X-L2-FVIII означает формулу $\text{NH}_2\text{-V-L1-X-L2-FVIII-COOH}$. В одном из вариантов реализации формулы, описанные в настоящем документе, могут содержать любые дополнительные последовательности между двумя фрагментами. В другом варианте реализации соединительная черточка (-) означает пептидную связь.

Другой аспект настоящего изобретения состоит в получении химерного белка FVIII, демонстрирующего пониженные взаимодействия или отсутствие взаимодействий с фактором, ограничивающим период полувыведения FVIII, например VWFэндогенным фактором фон Виллебранда, и одновременно максимально увеличивающего период полувыведения белка FVIII с использованием последовательности XTEN (первый "увеличитель" периода полувыведения) в комбинации со вторым "увеличителем" периода полувыведения или фрагментом, обеспечивающим ковалентную связь между белком FVIII и VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, например константной областью Ig или ее частью. В одном из вариантов реализации химерный белок согласно настоящему изобретению содержит

(i) VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, содержащий домен D' и домен VWFD3 фактора фон Виллебранда;

(ii) последовательность XTEN;

(iii) белок FVIII; и

(iv) константную область Ig или ее часть (также обозначаемую в настоящем описании F), при этом

(1) VWFфрагмент фактора фон Виллебранда связан с последовательностью XTEN необязательным линкером, например, расщепляемым линкером;

(2) VWFфрагмент фактора фон Виллебранда ассоциирован или связан с белком FVIII дополнительным необязательным линкером, например, расщепляемым линкером; и

(3) константная область Ig или ее часть связана с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, последовательностью XTEN или белком FVIII.

В другом варианте реализации химерный белок согласно настоящему изобретению содержит

(i) VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, содержащий домен D' и домен VWFD3 фактора фон Виллебранда;

(ii) последовательность XTEN;

(iii) белок FVIII;

(iv) константную область Ig или ее часть (F1 или первая константная область Ig или ее часть); и

(v) дополнительную константную область Ig или ее часть (F2 или вторая константная область Ig или ее часть), при этом

(1) VWFфрагмент фактора фон Виллебранда связан с последовательностью XTEN необязательным линкером, например расщепляемым линкером;

(2) последовательность XTEN или VWFфрагмент фактора фон Виллебранда связан с константной областью Ig или ее частью;

(3) FVIII связан с дополнительной константной областью Ig или ее частью; и

(4) константная область Ig или ее часть ассоциирована или связана с дополнительной константной областью Ig или ее частью.

В одном из вариантов реализации ассоциация или связь между двумя константными областями Ig или их частью представляет собой ковалентную связь, например дисульфидную связь. В другом варианте реализации ассоциация или связь между двумя константными областями Ig или их частью представляет собой процессируемый линкер, при этом указанный процессируемый линкер подвергается внутриклеточному процессингу под действием протеазы.

Например, химерный белок имеет формулу, включающую

- (g) V-L2-X-L1-F1:FVIII-L3-F2;
- (h) V-L2-X-L1-F1:F2-L3-FVIII;
- (i) F-L1-X-L2-V:FVIII-L3-F2;
- (j) F-L1-X-L2-V:F2-L3-FVIII;
- (k) V-L2-X-L1-F1-L4-FVIII-L3-F2;
- (l) F2-L3-FVIII-L4-F1-L1-X-L2-V;
- (m) FVIII-L2-F2-L4-V-L2-X-L1-F1; или
- (n) F1-L1-X-L2-V-L4-F2-L2-FVIII,

где V содержит VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, каждый из L1 и L3 содержит необязательный линкер, L2 содержит необязательный линкер, например расщепляемый линкер; L4 представляет собой необязательный линкер, например процессуемый линкер, FVIII содержит белок FVIII, X содержит одну или более последовательностей XTEN, F1 содержит необязательную первую константную область Ig или ее часть, F2 содержит необязательную дополнительную константную область Ig или ее часть, (-) представляет собой пептидную связь или одну или более аминокислот, и (:) представляет собой химическую ассоциацию или физическую ассоциацию.

В некоторых вариантах реализации белок FVIII в любых конструкциях или формулах, описанных в настоящем документе, может дополнительно содержать по меньшей мере одну, по меньшей мере две, по меньшей мере три, по меньшей мере четыре, по меньшей мере пять или по меньшей мере шесть последовательностей XTEN, при этом каждая из последовательностей XTEN встроена непосредственно ниже одной или более аминокислот в белке FVIII или связана с N-концом или C-концом белка FVIII.

Неограничивающие примеры сайтов встраивания XTEN описаны в иных местах настоящего документа.

В одном из вариантов реализации (:) представляет собой химическую ассоциацию, например по меньшей мере одну непептидную связь. В другом варианте реализации химическая ассоциация, т.е. (:), представляет собой ковалентную связь. В других вариантах реализации химическая ассоциация, т.е. (:), представляет собой нековалентное взаимодействие, например ионное взаимодействие, гидрофобное взаимодействие, гидрофильное взаимодействие, ван-дер-ваальсово взаимодействие или водородную связь. В других вариантах реализации (:) представляет собой непептидную ковалентную связь. В других вариантах реализации (:) представляет собой пептидную связь. В других вариантах реализации (:) представляет собой физическую ассоциацию между двумя последовательностями, при которой часть первой последовательности располагается очень близко ко второй последовательности, в результате чего первая последовательность защищает от или блокирует взаимодействие части второй последовательности с другим фрагментом и, кроме того, данная физическая ассоциация поддерживается, не позволяя второй последовательности взаимодействовать с другими фрагментами. Ориентация полипептидных формул в настоящем описании приведена от N-конца (слева) к C-концу (справа). Например, формула (n) F1-L1-X-L2-V-L4-F2-L2-FVIII означает формулу NH₂-F1-L1-X-L2-V-L4-F2-L2-FVIII-COOH. В одном из вариантов реализации формулы, описанные в настоящем документе, могут содержать любые дополнительные последовательности между двумя фрагментами. В другом варианте реализации соединительная черточка (-) означает пептидную связь.

В одном из вариантов реализации любая из или как константная область Ig или ее часть (иногда обозначаемая в настоящем описании "F" или "F1"), так и дополнительная константная область Ig или ее часть (иногда обозначаемая в настоящем описании "F2"), связанная с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда или белком FVIII, могут увеличивать период полувыведения VWFфрагмента фактора фон Виллебранда, белка FVIII или обоих. В другом варианте реализации пара константной области Ig или ее части (иногда обозначаемой в настоящем описании "F" или "F1") и дополнительной константной области Ig или ее части (иногда обозначаемой в настоящем описании "F2"), каждая из которых связана с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда и белком FVIII, обеспечивает более сильную связь, чем нековалентная связь между белком FVIII и VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, т.е. ковалентную связь, например дисульфидную связь, что тем самым предотвращает замену VWFфрагмента фактора фон Виллебранда VWFэндогенным фактором фон Виллебранда *in vivo*. F1 или F2 может содержать область Fc или партнер по связыванию FcRn. В других вариантах реализации любая из или как F1, так и F2, связанные с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда и/или белком FVIII, образуют ковалентную связь (например, дисульфидную связь) между F1 и F2, тем самым располагая очень близко VWFфрагмент фактора фон Виллебранда и белок FVIII с предотвращением взаимодействия белка FVIII с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда. В некоторых вариантах реализации F1 и F2 являются одинаковыми или раз-

ными. Неограничивающие примеры F1 и F2 могут быть выбраны из группы, состоящей из домена СН1, домена СН2, домена СН3, домена СН4, шарнирного домена, их любых функциональных фрагментов, производных или аналогов и их двух или более комбинаций. В одном из вариантов реализации F1, F2 или обе содержат по меньшей мере один домен СН1, по меньшей мере один домен СН2, по меньшей мере один домен СН3, по меньшей мере один домен СН4 или их функциональные фрагменты, производные или аналоги. В другом варианте реализации F1, F2 или обе содержат по меньшей мере один шарнирный домен или его часть и по меньшей мере один домен СН2 или его часть (например, в ориентации шарнирный домен-СН2). В других вариантах реализации F1, F2 или обе содержат по меньшей мере один домен СН2 или его часть и по меньшей мере один домен СН3 или его часть (например, в ориентации СН2-СН3). Примеры комбинации включают, но не ограничиваются перечисленными, домен СН2, домен СН3 и шарнирный домен, которые также известны как область Fc (или домен Fc), например первая область Fc или первый партнер по связыванию FcRn для F1 и вторая область Fc или второй партнер по связыванию FcRn для F2. В других вариантах реализации F1 связана с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда линкером и/или F2 связана с белком FVIII линкером. В некоторых вариантах реализации F1 и/или F2 содержит, по существу состоит из или состоит из шарнирного домена. Дополнительные неограничивающие примеры областей Fc или партнеров по связыванию FcRn описаны в иных местах настоящего документа.

В некоторых вариантах реализации химерный белок согласно настоящему изобретению содержит две полипептидные цепи:

первую полипептидную цепь, содержащую, по существу состоящую из или состоящую из VWFфрагмента фактора фон Виллебранда, содержащего домен D' и домен D3, последовательности XTEN, первой константной области Ig или ее части (например, первой области Fc) и необязательного линкера между VWFфрагментом фактора фон Виллебранда и последовательностью XTEN или последовательностью XTEN или первой константной областью Ig или ее частью; и

вторую полипептидную цепь, содержащую, по существу состоящую из или состоящую из белка FVIII и второй константной области Ig или ее части (например, второй области Fc).

Линкер между VWFфрагментом фактора фон Виллебранда и первой константной областью Ig или ее частью может представлять собой расщепляемый линкер, например расщепляемый тромбином линкер, который может быть расщеплен в месте коагуляции. В некоторых вариантах реализации первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь ассоциированы друг с другом. Ассоциация первой цепи и второй цепи предотвращает замену первой цепи, содержащей VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, VWFэндогенным фактором фон Виллебранда *in vivo*. В одном из вариантов реализации ассоциация между первой цепью и второй цепью может представлять собой ковалентную связь. В конкретном варианте реализации ковалентная связь представляет собой дисульфидную связь. В некоторых вариантах реализации белок FVIII во второй цепи содержит также одну или более последовательностей XTEN, связанных с С-концом или N-концом белка FVIII или встроенных непосредственно ниже одной или более аминокислот (например, по меньшей мере один сайт встраивания, описанный в настоящем документе) в белке FVIII. Неограничивающие примеры сайтов встраивания описаны в иных местах настоящего документа.

В других вариантах реализации химерный белок согласно настоящему изобретению содержит три полипептидные цепи, при этом первая полипептидная цепь содержит, по существу состоит из или состоит из тяжелой цепи белка FVIII, вторая полипептидная цепь содержит, по существу состоит из или состоит из легкой цепи белка FVIII, слитой с первой константной областью Ig или ее частью (например, первой областью Fc), и третья полипептидная цепь содержит, по существу состоит из или состоит из VWFфрагмента фактора фон Виллебранда, содержащего домен D' и домен D3, последовательности XTEN, второй константной области Ig или ее части (например, второй области Fc), и необязательного линкера между последовательностью XTEN и второй константной областью Ig или ее частью, или VWFфрагментом фактора фон Виллебранда и последовательностью XTEN. Линкер в третьей цепи может представлять собой расщепляемый линкер, который расщепляется в месте коагуляции, например расщепляемый тромбином линкер. В некоторых вариантах реализации тяжелая цепь FVIII или легкая цепь FVIII связана с одной или более последовательностями XTEN, которые могут быть связаны с N-концом, С-концом или встроены в одном или более сайтах встраивания в пределах последовательности FVIII. Неограничивающие примеры сайтов встраивания описаны в иных местах настоящего документа.

В других вариантах реализации химерный белок согласно настоящему изобретению содержит две полипептидные цепи:

первую полипептидную цепь, содержащую, по существу состоящую из или состоящую из тяжелой цепи белка FVIII; и

вторую полипептидную цепь, содержащую, по существу состоящую из или состоящую из легкой цепи белка FVIII, первой константной области Ig или ее части (например, первой области Fc), первого линкера (например, процессируемого линкера, содержащего один или более сайтов расщепления протеазой, включая один или более сайтов внутриклеточного процессинга), VWFфрагмента фактора фон Виллебранда, второго линкера (например, расщепляемого тромбином линкера), последовательности XTEN и

второй константной области Ig или ее части (например, второй области Fc),

при этом легкая цепь белка FVIII связана с первой константной областью Ig или ее частью (например, первой областью Fc), которая также связана с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда первым линкером,

при этом VWFфрагмент фактора фон Виллебранда связан с последовательностью XTEN, которая также связана со второй константной областью Ig или ее частью вторым линкером.

В некоторых вариантах реализации первый линкер представляет собой процессуемый линкер, а второй линкер представляет собой расщепляемый линкер. После экспрессии химерный белок может быть процессирован под действием фермента внутриклеточного процессинга, который расщепляет процессуемый линкер, и, таким образом, химерный белок может содержать, по существу состоять из или состоять из трех полипептидных цепей. Кроме того, VWFфрагмент фактора фон Виллебранда может отщепляться в месте коагуляции благодаря расщепляемому линкеру.

В некоторых вариантах реализации химерный белок согласно настоящему изобретению содержит одну полипептидную цепь, содержащую одноцепочечный белок FVIII, первую константную область Ig или ее часть (например, первую область Fc), первый линкер (например, процессуемый линкер), VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, последовательность XTEN, второй линкер (например, расщепляемый тромбином линкер) и вторую константную область Ig или ее часть (например, вторую область Fc), при этом одноцепочечный белок FVIII связан с первой константной областью Ig или ее частью, которая также связана с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда первым линкером, и VWFфрагмент фактора фон Виллебранда связан с последовательностью XTEN, которая также связана со второй константной областью Ig или ее частью. В одном из вариантов реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда и последовательность XTEN связаны вторым линкером. В другом варианте реализации последовательность XTEN и вторая константная область Ig или ее часть связаны вторым линкером. В других вариантах реализации вторая цепь содержит также третий линкер. Таким образом, одна полипептидная цепь может содержать VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, связанный с последовательностью XTEN вторым линкером, и XTEN, связанную со второй константной областью Ig или ее частью третьим линкером. Второй линкер и третий линкер могут быть одинаковыми или разными. В одном из вариантов реализации первый линкер представляет собой процессуемый линкер. В другом варианте реализации второй линкер или третий линкер представляет собой расщепляемый линкер, содержащий один или два сайта расщепления. В конкретном варианте реализации второй линкер представляет собой расщепляемый тромбином линкер. Линкеры, используемые в настоящем изобретении, описаны в иных местах настоящего документа.

(2) FVIII, XTEN и Fc.

Химерный белок согласно настоящему изобретению также содержит

(i) белок FVIII;

(ii) последовательность XTEN (первый "увеличитель" периода полувыведения); и

(iii) константную область Ig или ее часть (второй "увеличитель" периода полувыведения),

при этом последовательность XTEN связана с белком FVIII необязательным линкером и константной областью Ig или ее частью дополнительным необязательным линкером.

Последовательность XTEN и константную область Ig или ее часть можно использовать вместе для увеличения периода полувыведения белка FVIII. В одном из вариантов реализации химерный белок представляет собой мономер. В другом варианте реализации химерный белок представляет собой димер (гомодимер или гетеродимер).

Настоящее изобретение также относится к химерному белку, содержащему

(i) белок FVIII;

(ii) последовательность XTEN;

(iii) константную область Ig или ее часть (т.е. первую константную область Ig или ее часть, "F" или "F1"); и

(iv) дополнительную константную область Ig или ее часть (т.е. вторую константную область Ig или ее часть или "F2").

В одном из вариантов реализации последовательность XTEN связана с белком FVIII на С-конце или N-конце или встроена непосредственно ниже одной или более аминокислот в белке FVIII (например, один или более сайтов встраивания XTEN), белок FVIII связан с первой константной областью Ig или ее частью, и первая константная область Ig или ее часть и вторая константная область Ig или ее часть ассоциированы или связаны друг с другом необязательным линкером. В соответствии с некоторыми аспектами химерный белок представляет собой гибридный мономер-димер, содержащий первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, при этом первая полипептидная цепь содержит белок FVIII, последовательность XTEN и первую константную область Ig или ее часть, а вторая полипептидная цепь содержит, по существу состоит из или состоит из второй константной области Ig или ее части без белка FVIII, и при этом первая цепь и вторая цепь ассоциированы друг с другом. Ассоциация между константной областью Ig или ее частью (например, первой областью Fc) и дополнительной константной областью Ig или ее частью (например, второй областью Fc) представляет собой химическую ассоциацию или фи-

зическую ассоциацию. В некоторых вариантах реализации химическая ассоциация представляет собой ковалентную связь. В других вариантах реализации химическая ассоциация представляет собой нековалентное взаимодействие, например ионное взаимодействие, гидрофобное взаимодействие, гидрофильное взаимодействие, ван-дер-ваальсово взаимодействие или водородную связь. В других вариантах реализации ассоциация представляет собой непептидную ковалентную связь. В других вариантах реализации ассоциация представляет собой пептидную связь.

В соответствии с другими аспектами химерный белок представляет собой одну полипептидную цепь, содержащую белок FVIII, последовательность XTEN, первую константную область Ig или ее часть, линкер, например процессируемый линкер, и вторую Ig константную область или ее часть, при этом указанная одна полипептидная цепь процессируется после экспрессии под действием внутриклеточного фермента и превращается в две полипептидные цепи.

В одном из вариантов реализации константная область Ig или ее часть (иногда обозначаемая в настоящем описании "F" или "F1"), связанная с белком FVIII, может увеличивать период полувыведения белка FVIII совместно с последовательностью XTEN. В другом варианте реализации константная область Ig или ее часть ("F" или "F1") представляет собой область Fc или партнер по связыванию FcRn, описанный в иных местах настоящего документа.

В других вариантах реализации дополнительная константная область Ig или ее часть (иногда обозначаемая в настоящем описании "F2" или второй константной областью Ig или ее частью), ассоциированная или связанная с первой константной областью Ig или ее частью, также может увеличивать период полувыведения белка FVIII. В других вариантах реализации вторая константная область Ig или ее часть ("F2") совместно с первой константной областью Ig или ее частью и последовательностью XTEN может увеличивать период полувыведения белка FVIII. Дополнительная константная область Ig или ее часть может представлять собой область Fc или партнер по связыванию FcRn, описанный в иных местах настоящего документа.

В некоторых вариантах реализации вторая константная область Ig или ее часть, ассоциированная с первой константной областью Ig или ее частью, также связана с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, описанным в иных местах настоящего документа, и возможной последовательностью XTEN.

В некоторых вариантах реализации любая из или как константная область Ig или ее часть ("F", или "F1", или первая константная область Ig, или ее часть), так и дополнительная константная область Ig или ее часть (т.е. вторая константная область Ig, или ее часть, или "F2") (обозначаемые в данном абзаце "константными областями Ig или их частью") могут включать, но не ограничиваются перечисленными, домен CH1, домен CH2, домен CH3, домен CH4, шарнирный домен, их любые функциональные фрагменты, производные или аналоги, или их две или более комбинаций. В одном из вариантов реализации константная область Ig или ее часть содержит по меньшей мере один домен CH1, по меньшей мере один домен CH2, по меньшей мере один домен CH3, по меньшей мере один домен CH4 или их функциональные фрагменты, производные или аналоги. В другом варианте реализации константная область Ig или ее часть содержит по меньшей мере один шарнирный домен или его часть и по меньшей мере один домен CH2 или его часть (например, в ориентации шарнирный домен-CH2). В других вариантах реализации константная область Ig или ее часть содержит по меньшей мере один домен CH2 или его часть и по меньшей мере один домен CH3 или его часть (например, в ориентации CF2-CH3). Примеры комбинации включают, но не ограничиваются перечисленными, домен CH2, домен CH3 и шарнирный домен, которые также известны как область Fc (или домен Fc), например первая область Fc. Дополнительные примеры константных областей Ig или их части описаны в иных местах настоящего документа.

Химерный белок согласно настоящему изобретению может иметь увеличенный период полувыведения белка FVIII по сравнению с FVIII дикого типа. В одном из вариантов реализации период полувыведения белка FVIII по меньшей мере примерно в 1,5 раза, по меньшей мере примерно в 2 раза, по меньшей мере примерно в 2,5 раза, по меньшей мере примерно в 3 раза, по меньшей мере примерно в 4 раза, по меньшей мере примерно в 5 раз, по меньшей мере примерно в 6 раз, по меньшей мере примерно в 7 раз, по меньшей мере примерно в 8 раз, по меньшей мере примерно в 9 раз, по меньшей мере примерно в 10 раз, по меньшей мере примерно в 11 раз или по меньшей мере примерно в 12 раз больше периода полувыведения FVIII дикого типа. В другом варианте реализации период полувыведения белка FVIII составляет по меньшей мере примерно 10 ч, по меньшей мере примерно 11 ч, по меньшей мере примерно 12 ч, по меньшей мере примерно 13 ч, по меньшей мере примерно 14 ч, по меньшей мере примерно 15 ч, по меньшей мере примерно 16 ч, по меньшей мере примерно 17 ч, по меньшей мере примерно 18 ч, по меньшей мере примерно 19 ч, по меньшей мере примерно 20 ч, по меньшей мере примерно 21 ч, по меньшей мере примерно 22 ч, по меньшей мере примерно 23 ч, по меньшей мере примерно 24 ч, по меньшей мере примерно 36 ч, по меньшей мере примерно 48 ч, по меньшей мере примерно 60 ч, по меньшей мере примерно 72 ч, по меньшей мере примерно 84 ч, по меньшей мере примерно 96 ч или по меньшей мере примерно 108 ч.

(3) FVIII, XTEN и VWF.

В соответствии с одним из аспектов химерный белок согласно настоящему изобретению содержит

(i) белок FVIII;

(ii) последовательность XTEN; и
 (iii) VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, содержащий домен D' и домен VWFD3 фактора фон Виллебранда,

при этом белок FVIII связан с последовательностью XTEN, и

при этом белок FVIII ассоциирован или связан с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда.

В одном из вариантов реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда химерного белка, описанного в настоящем документе, не способен связываться с рецептором, ответственным за клиренс VWF. В другом варианте реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда способен защищать белок FVIII от расщепления одной или более протеазами, защищать белок FVIII от активации, стабилизировать тяжелую цепь и/или легкую цепь белка FVIII или предотвращать клиренс белка FVIII с участием одного или более рецепторов макрофагов. В других вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда предотвращает или ингибирует связывание VWFэндогенного фактора фон Виллебранда с сайтом VWFсвязывания фактора фон Виллебранда в белке FVIII. Сайт VWFсвязывания фактора фон Виллебранда может быть расположен в домене A3 или домене C2 белка FVIII или как в домене A3, так и в домене C2. В конкретном варианте реализации сайт VWFсвязывания фактора фон Виллебранда содержит аминокислотную последовательность, соответствующую аминокислотам с 1669 по 1689 и/или аминокислотам с 2303 по 2332 последовательности SEQ ID NO: 2.

В соответствии с другим аспектом химерный белок содержит

(i) белок FVIII;

(ii) последовательность XTEN;

(iii) VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, содержащий домен D' и домен VWFD3 фактора фон Виллебранда; и

(iv) константную область Ig или ее часть,

при этом последовательность XTEN связана с белком FVIII на С-конце или N-конце или встроена непосредственно ниже одной или более аминокислот (например, один или более сайтов встраивания XTEN, описанных в настоящем документе) в белке FVIII, VWFфрагмент фактора фон Виллебранда связан или ассоциирован с белком FVIII или последовательностью XTEN, и константная область Ig или ее часть связана с белком FVIII, последовательностью XTEN, VWFфрагментом фактора фон Виллебранда или их любыми комбинациями.

Константная область Ig или ее часть, подходящая для химерных белков согласно настоящему изобретению, описана в иных местах настоящего документа. В одном из вариантов реализации константная область Ig или ее часть способна увеличивать период полувыведения белка FVIII. В другом варианте реализации константная область Ig или ее часть содержит первую область Fc или первый партнер по связыванию FcRn. В других вариантах реализации константная область Ig или ее часть связана с белком FVIII необязательным линкером. В других вариантах реализации указанный линкер включает расщепляемый линкер. Химерный белок может представлять собой одну полипептидную цепь, т.е. мономер (т.е. одна цепь), содержащий (i), (ii), (iii) и (iv), или две цепи, содержащие первую цепь, содержащую (i) и (ii), и вторую цепь, содержащую (iii) и (iv). В соответствии с другими аспектами химерный белок представляет собой димер (например, гомодимер или гетеродимер). В одном из вариантов реализации химерный белок содержит две цепи, каждая из которых содержит (i), (ii), (iii) и (iv).

В некоторых вариантах реализации химерный белок содержит

(i) белок FVIII;

(ii) последовательность XTEN;

(iii) VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, содержащий домен D' и домен VWFD3 фактора фон Виллебранда;

(iv) константную область Ig или ее часть (иногда также обозначаемую "F1", "первой константной областью Ig или ее частью" или "F2"); и

(v) дополнительную константную область Ig или ее часть (иногда также обозначаемую "F2" или "второй константной областью Ig или ее частью"), при этом

(1) белок FVIII связан с последовательностью XTEN на С-конце или N-конце белка FVIII или встроено непосредственно ниже одной или более аминокислот (например, один или более сайтов встраивания XTEN, описанных в настоящем документе) в белке FVIII;

(2) либо последовательность XTEN, либо белок FVIII связан с константной областью Ig или ее частью;

(3) VWFфрагмент фактора фон Виллебранда связан со второй константной областью Ig или ее частью; и

(4) константная область Ig или ее часть ассоциирована со второй константной областью Ig или ее частью.

В одном из вариантов реализации константная область Ig или ее часть, связанная с белком FVII или последовательностью XTEN, также связана с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда линкером, например процессируемым линкером. В другом варианте реализации дополнительная константная область Ig или ее часть, подходящая для химерных белков согласно настоящему изобретению, может быть также

связана с белком FVIII или константной областью Ig или ее частью необязательным линкером, например процессируемым линкером. В некоторых вариантах реализации пара константной области Ig или ее части и дополнительной константной области Ig или ее части, каждая из которых связана с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда и белком FVIII, обеспечивает более сильную связь, чем нековалентная связь между белком FVIII и VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, т.е. ковалентную связь, например дисульфидную связь, что тем самым предотвращает замену VWFфрагмента фактора фон Виллебранда VWFэндогенным фактором фон Виллебранда *in vivo*. В других вариантах реализации любая из или как константная область Ig или ее часть, так и дополнительная константная область Ig или ее часть способны увеличивать период полувыведения белка FVIII или VWFфрагмента фактора фон Виллебранда. В других вариантах реализации дополнительная константная область Ig или ее часть содержит вторую область Fc или партнер по связыванию FcRn. Константная область Ig или ее часть и дополнительная константная область Ig или ее часть в химерных белках являются одинаковыми или разными.

В некоторых вариантах реализации константная область Ig или ее часть и дополнительная константная область Ig или ее часть ассоциированы химической ассоциацией или физической ассоциацией. В одном из вариантов реализации химическая ассоциация, т.е. (:), представляет собой по меньшей мере одну непептидную связь. В некоторых вариантах реализации химическая ассоциация, т.е. (:), представляет собой ковалентную связь. В других вариантах реализации химическая ассоциация, т.е. (:), представляет собой нековалентное взаимодействие, например ионное взаимодействие, гидрофобное взаимодействие, гидрофильное взаимодействие, ван-дер-ваальсово взаимодействие или водородную связь. В других вариантах реализации (:) представляет собой непептидную ковалентную связь. В других вариантах реализации (:) представляет собой пептидную связь. В других вариантах реализации (:) представляет собой физическую ассоциацию между двумя последовательностями, при которой часть первой последовательности располагается очень близко ко второй последовательности, в результате чего первая последовательность защищает от или блокирует взаимодействие части второй последовательности с другим фрагментом. В некоторых вариантах реализации ассоциация между константной областью Ig или ее частью и дополнительной константной областью Ig или ее частью может представлять собой ковалентную связь, например, дисульфидную связь, которая предотвращает замену VWFфрагмента фактора фон Виллебранда или полипептида, содержащего VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, VWFэндогенным фактором фон Виллебранда. Следовательно, предотвращение взаимодействия между белком FVIII и VWFэндогенным фактором фон Виллебранда уменьшает или устраняет данный фактор, ограничивающий период полувыведения, для белка FVIII и, таким образом, период полувыведения белка FVIII увеличивается по сравнению с белком FVIII, не содержащим белок VWF, или FVIII дикого типа.

В соответствии с другими аспектами химерный белок имеет формулу, включающую

- (1) FVIII(X1)-L1-F1:V-L2-X2-L3-F2;
- (2) FVIII(X1)-L1-F1:F2-L3-X2-L2-V;
- (3) F1-L1-FVIII(X1):V-L2-X2-L3-F2;
- (4) F1-L1-FVIII(X1):F2-L3-X2-L2-V;
- (5) FVIII(X1)-L1-F1-L4-V-L2-X2-L3-F2;
- (6) FVIII(X1)-L1-F1-L4-F2-L3-X2-L2-V;
- (7) F1-L1-FVIII(X1)-L4-V-L2-X2-L3-F2 или
- (8) F1-L1-FVIII(X1)-L4- F2-L3-X2-L2-V,

где FVIII(X1) содержит белок FVIII и одну или более последовательностей XTEN,

при этом указанная одна или более последовательностей XTEN связаны с N-концом или C-концом белка FVIII или встроены непосредственно ниже одной или более аминокислот (например, один или более сайтов встраивания, описанных в настоящем документе) в белке FVIII,

каждый из L1, L2 и L3 содержит необязательный линкер, например расщепляемый линкер,

L4 представляет собой линкер, например процессируемый линкер,

X2 содержит одну или более необязательных последовательностей XTEN,

F1 содержит константную область Ig или ее часть,

F2 содержит необязательную дополнительную константную область Ig или ее часть, и

V содержит VWFфрагмент фактора фон Виллебранда,

(-) представляет собой пептидную связь или одну или более аминокислот, и

(:) включает химическую ассоциацию или физическую ассоциацию.

В одном из вариантов реализации (:) представляет собой химическую ассоциацию, например по меньшей мере одну непептидную связь. В другом варианте реализации химическая ассоциация, т.е. (:), представляет собой ковалентную связь. В других вариантах реализации химическая ассоциация, т.е. (:), представляет собой нековалентное взаимодействие, например ионное взаимодействие, гидрофобное взаимодействие, гидрофильное взаимодействие, ван-дер-ваальсово взаимодействие или водородную связь. В других вариантах реализации (:) представляет собой непептидную ковалентную связь. В других вари-

антах реализации (:) представляет собой пептидную связь. В других вариантах реализации (:) представляет собой физическую ассоциацию между двумя последовательностями, при которой часть первой последовательности располагается очень близко ко второй последовательности, в результате чего первая последовательность защищает от или блокирует взаимодействие части второй последовательности с другим фрагментом и, кроме того, данная физическая ассоциация поддерживается, не позволяя второй последовательности взаимодействовать с другими фрагментами. Ориентация полипептидных формул в настоящем описании приведена от N-конца (слева) к C-концу (справа). Например, формула V-X-FVIII означает формулу $\text{NH}_2\text{-V-X-FVIII-COOH}$. В одном из вариантов реализации формулы, описанные в настоящем документе, могут содержать любые дополнительные последовательности между двумя фрагментами. Например, формула V-X-FVIII может дополнительно содержать любые последовательности на N-конце V между V и X, между X и FVIII, или на C-конце FVIII, если не указано иное. В другом варианте реализации соединительная черточка (-) означает пептидную связь.

В соответствии с одним из аспектов химерный белок содержит две полипептидные цепи:

(A) первую цепь, содержащую

(i) одноцепочечный белок FVIII,

(ii) последовательность XTEN, и

(iii) первую константную область Ig или ее часть, например первую область Fc или партнер по связыванию FcRn,

при этом последовательность XTEN связана белком FVIII на N-конце или C-конце или встроена непосредственно ниже одной или более аминокислот белка FVIII (например, один или более сайтов встраивания XTEN, описанных в настоящем документе) и первая константная область Ig или ее часть связана с последовательностью XTEN, когда последовательность XTEN связана с белком FVIII на N-конце или C-конце FVIII белка или когда последовательность XTEN встроена в белок FVIII; и

(B) вторую цепь, содержащую

(iv) VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, содержащий домен D' и домен D3,

(v) линкер, и

(vi) вторую константную область Ig или ее часть, например вторую область Fc или второй партнер по связыванию FcRn,

при этом VWFфрагмент фактора фон Виллебранда связан с линкером, например расщепляемым линкером, который также связан со второй константной областью Ig или ее частью, и

при этом первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь ассоциированы друг с другом, например, ковалентной связью, например дисульфидной связью.

В одном из вариантов реализации линкер представляет собой расщепляемый линкер, описанный в иных местах настоящего документа, например расщепляемый тромбином линкер. В некоторых вариантах реализации вторая цепь содержит одну или более последовательностей XTEN между (iv) и (v) или (v) и (vi).

В соответствии с другими аспектами химерный белок содержит одну полипептидную цепь, содержащую

(i) одноцепочечный белок FVIII;

(ii) последовательность XTEN;

(iii) первую константную область Ig или ее часть, например первую область Fc или партнер по связыванию FcRn;

(iv) первый линкер;

(v) VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, содержащий домен D' и домен D3;

(vi) второй линкер; и

(vii) вторую константную область Ig или ее часть, например вторую область Fc или второй партнер по связыванию FcRn,

при этом элементы (i)-(vii) связаны в указанном порядке или в любом порядке.

В одном из вариантов реализации первый линкер представляет собой процессуемый линкер, который может быть процессирован или расщеплен внутри клетки после экспрессии и превращает одну полипептидную цепь в две полипептидные цепи. В другом варианте реализации второй линкер представляет собой расщепляемый линкер, описанный в настоящем документе, например расщепляемый тромбином линкер. Последовательность XTEN, используемая в настоящем изобретении, может быть связана с белком FVIII необязательным линкером на N-конце или C-конце белка FVIII или встроена непосредственно ниже одной или более аминокислот (например, один или более сайтов встраивания XTEN) в белке FVIII.

В соответствии с некоторыми аспектами химерный белок содержит три полипептидные цепи:

(A) первую полипептидную цепь, содержащую

(i) тяжелую цепь белка FVIII, и

(ii) последовательность XTEN, которые связаны друг с другом;

(B) вторую полипептидную цепь, содержащую

(iii) легкую цепь белка FVIII, и

- (iv) первую константную область Ig или ее часть, например первую область Fc или партнер по связыванию FcRn, которые связаны друг с другом; и
- (C) третью полипептидную цепь, содержащую
- (v) VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, содержащий домен D' и домен D3,
- (vi) линкер, и
- (vii) вторую константную область Ig или ее часть, например вторую область Fc или второй партнер по связыванию FcRn,

при этом указанная вторая цепь ассоциирована с первой цепью и третьей цепью.

В одном из вариантов реализации ассоциация между первой цепью и второй цепью представляет собой химическую ассоциацию или физическую ассоциацию. Например, ассоциация между первой цепью и второй цепью может представлять собой металлическую связь. В другом варианте реализации ассоциация между второй цепью и третьей цепью также представляет собой химическую ассоциацию или физическую ассоциацию, например ковалентную связь или нековалентную связь. В некоторых вариантах реализации ассоциация между второй цепью и третьей цепью осуществляется через две константные области Ig или их часть и представляет собой дисульфидную связь. Образование связи между второй цепью и третьей цепью предотвращает или ингибирует связывание белка FVIII с VWFэндогенным фактором фон Виллебранда, что таким образом предотвращает выведение белка FVIII по пути клиренса VWF. В некоторых вариантах реализации линкер представляет собой процессуемый линкер, который расщепляется внутри клетки после экспрессии в клетке-хозяине. Последовательность XTEN, используемая в настоящем изобретении, связана с белком FVIII необязательным линкером на N-конце или C-конце белка FVIII или встроена непосредственно ниже одной или более аминокислот (например, один или более сайтов встраивания XTEN) в белке FVIII. В некоторых вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда напрямую связан с белком FVIII, содержащим одну или более XTEN, пептидной связью или линкером. В качестве одного из способов связывания VWFфрагмента фактора фон Виллебранда и белка FVIII, в который встроены или с которым связаны прямой связью (например, пептидной связью) или линкером одна или более XTEN, может быть использовано ферментативное лигирование (например, сортаза). Например, сортаза относится к группе прокариотических ферментов, которые модифицируют поверхностные белки путем распознавания и расщепления карбоксиконцевого сигнала сортировки. Для большинства субстратов ферментов, представляющих собой сортазу, сигнал распознавания состоит из мотива LPXTG (Leu-Pro-любая-Thr-Gly (SEQ ID NO: 51)), затем высокогидрофобной трансмембранной последовательности, затем кластера основных остатков, таких как аргинин. Расщепление происходит между Thr и Gly с временным присоединением через остаток Thr к остатку Cys активного центра партнера по лигированию с последующей транспептидацией, которая приводит к ковалентному присоединению белка к клеточной стенке. В некоторых вариантах реализации партнер по лигированию содержит Gly(n). В других вариантах реализации химерный белок содержит также мотив распознавания сортазой. В некоторых вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда присоединяют к FVIII, содержащему одну или более XTEN, встроены или связанных с ним, с использованием опосредуемого сортазой лигирования белка *in vitro*.

В одном из вариантов реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, связанный с мотивом распознавания сортазой необязательным линкером, может быть слит с белком FVIII, связанным с Gly(n), под действием сортазы, где n может представлять собой любое целое число, при этом одна или более XTEN встроены или связаны с белком FVIII. Лигированная конструкция содержит VWFфрагмент фактора фон Виллебранда (N-концевая часть конструкции) и белок FVIII, в который встроена или с которым связана одна или более XTEN (C-концевая часть конструкции), при этом мотив распознавания сортазой встроены между ними. Другая лигированная конструкция содержит VWFфрагмент фактора фон Виллебранда (N-концевая часть конструкции), линкер, мотив распознавания сортазой и белок FVIII, в который встроена или с которым связана одна или более XTEN (C-концевая часть конструкции). В другом варианте реализации белок FVIII, связанный с мотивом распознавания сортазой необязательным линкером, может быть слит с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, связанным с Gly(n), под действием сортазы, где n представляет собой любое целое число. Полученная лигированная конструкция содержит белок FVIII (N-концевая часть конструкции), в который встроена или с которым связана одна или более XTEN, и VWFфрагмент фактора фон Виллебранда (C-концевая часть конструкции), при этом мотив распознавания сортазой встроены между ними. Другая полученная лигированная конструкция содержит белок FVIII (N-концевая часть конструкции), в который встроена или с которым связана одна или более XTEN, линкер, мотив распознавания сортазой и VWFфрагмент фактора фон Виллебранда (C-концевая часть конструкции). В других вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, связанный с мотивом распознавания сортазой первым необязательным линкером, может быть слит с гетерологичным фрагментом, например константной областью иммуноглобулина или ее частью, например областью Fc, связанным с сайтом расщепления тромбином, с помощью второго необязательного линкера. Полученная конструкция может содержать VWFфрагмент фактора фон Виллебранда (N-концевая часть), первый линкер, мотив распознавания сортазой, сайт расщепления протеазой, второй необязательный линкер и гетерологичный фрагмент.

В некоторых вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда ассоциирован с белком FVIII. Ассоциация между VWFфрагментом фактора фон Виллебранда и белком FVIII может представлять собой химическую ассоциацию или физическую ассоциацию. Химическая ассоциация может представлять собой нековалентное взаимодействие, например ионное взаимодействие, гидрофобное взаимодействие, гидрофильное взаимодействие, ван-дер-ваальсово взаимодействие или водородную связь. В других вариантах реализации ассоциация между белком FVIII и VWFфрагментом фактора фон Виллебранда представляет собой физическую ассоциацию между двумя последовательностями, например, обусловленную дополнительной ассоциацией между последовательностью, содержащей белок FVIII, и последовательностью, содержащей VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, при которой часть первой последовательности располагается очень близко ко второй последовательности, в результате чего первая последовательность защищает от или блокирует взаимодействие части второй последовательности с другим фрагментом. В результате предотвращения или ингибирования взаимодействия VWFэндогенного фактора фон Виллебранда с белком FVIII с помощью VWFфрагмента фактора фон Виллебранда, химерный белок, описанный в настоящем документе, имеет увеличенный период полувыведения по сравнению с FVIII дикого типа или соответствующим химерным белком, не содержащим VWFфрагмент фактора фон Виллебранда. В одном из вариантов реализации период полувыведения белка FVIII по меньшей мере примерно в 1,5 раза, по меньшей мере примерно в 2 раза, по меньшей мере примерно в 2,5 раза, по меньшей мере примерно в 3 раза, по меньшей мере примерно в 4 раза, по меньшей мере примерно в 5 раз, по меньшей мере примерно в 6 раз, по меньшей мере примерно в 7 раз, по меньшей мере примерно в 8 раз, по меньшей мере примерно в 9 раз, по меньшей мере примерно в 10 раз, по меньшей мере примерно в 11 раз или по меньшей мере примерно в 12 раз больше чем у белка FVIII, не содержащего VWFфрагмент фактора фон Виллебранда. В другом варианте реализации период полувыведения белка FVIII составляет по меньшей мере примерно 10 ч, по меньшей мере примерно 11 ч, по меньшей мере примерно 12 ч, по меньшей мере примерно 13 ч, по меньшей мере примерно 14 ч, по меньшей мере примерно 15 ч, по меньшей мере примерно 16 ч, по меньшей мере примерно 17 ч, по меньшей мере примерно 18 ч, по меньшей мере примерно 19 ч, по меньшей мере примерно 20 ч, по меньшей мере примерно 21 ч, по меньшей мере примерно 22 ч, по меньшей мере примерно 23 ч, по меньшей мере примерно 24 ч, по меньшей мере примерно 36 ч, по меньшей мере примерно 48 ч, по меньшей мере примерно 60 ч, по меньшей мере примерно 72 ч, по меньшей мере примерно 84 ч, по меньшей мере примерно 96 ч или по меньшей мере примерно 108 ч. В конкретном варианте реализации период полувыведения белка FVIII составляет по меньшей мере примерно 10 ч, по меньшей мере примерно 11 ч, по меньшей мере примерно 12 ч, по меньшей мере примерно 13 ч, по меньшей мере примерно 14 ч, по меньшей мере примерно 15 ч, по меньшей мере примерно 16 ч, по меньшей мере примерно 17 ч, по меньшей мере примерно 18 ч, по меньшей мере примерно 19 ч, по меньшей мере примерно 20 ч, по меньшей мере примерно 21 ч, по меньшей мере примерно 22 ч, по меньшей мере примерно 23 ч, по меньшей мере примерно 24 ч, по меньшей мере примерно 25 ч, по меньшей мере примерно 26 ч или по меньшей мере примерно 27 ч у мышей Nema.

А) Фрагмент фактора фон Виллебранда (VWF) VWF (также известный как F8VWF) представляет собой большой мультимерный гликопротеин, присутствующий в плазме крови и конститутивно вырабатываемый в эндотелии (в тельцах Вейбеля-Паладе), мегакариоцитах (α -гранулы тромбоцитов) и субэндотелиальной соединительной ткани. Основным мономер VWF представляет собой белок из 2813 аминокислот. Каждый мономер содержит ряд конкретных доменов, обладающих конкретной функцией, домен D7D3 (который связывается с фактором VIII), домен A1 (который связывается с GPIIb-рецептором тромбоцитов, гепарином и/или, возможно, коллагеном), домен A3 (который связывается с коллагеном), домен C1 (в котором домен RGD связывается с интегрином α IIb β 3 тромбоцитов, когда он активируется) и домен "цистеиновый узел" на С-конце белка (который является общим для VWF и фактора роста тромбоцитов (PDGF), трансформирующего фактора роста- β (TGFP) и β -хорионического гонадотропина человека (PHCG)).

В настоящем описании термин "VWFфрагмент фактора фон Виллебранда" включает, но не ограничивается ими, функциональные фрагменты VWF, содержащие домен D' и домен D3, которые способны ингибировать связывание VWFэндогенного фактора фон Виллебранда с FVIII. В одном из вариантов реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда связывается с белком FVIII. В другом варианте реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда блокирует сайт VWFсвязывания фактора фон Виллебранда в белке FVIII, тем самым ингибируя взаимодействие белка FVIII с VWFэндогенным фактором фон Виллебранда. Фрагменты VWF включают производные, варианты, мутанты или аналоги, которые сохраняют данные виды активности VWF. Последовательность мономера из 2813 аминокислот для VWF человека представлена под номером доступа NP_000543.2 в Genbank. Нуклеотидная последовательность, кодирующая VWF человека, представлена под номером доступа NM 000552.3 в Genbank. Нуклеотидная последовательность VWF человека обозначена SEQ ID NO: 1. SEQ ID NO: 2 представляет собой аминокислотную последовательность, кодируемую SEQ ID NO: 1. Каждый домен VWF перечислен в табл. 1.

Последовательности VWF	
Домены VWF	Аминокислотная последовательность
Сигнальный пептид VWF (Аминокислоты с 1 по 22 SEQ ID NO: 2)	1 <u>MIPARFAGVL LALALILPGT LC</u> 22
Область D1D2 VWF (Аминокислоты с 23 по 763 SEQ ID NO: 2)	23 <u>STARCSLFGS DFVNTFDGSM</u> <u>AEGTRGRS</u> 51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG 101 TVTQGDQRVS MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL 151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC 201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC 251 EKTLCCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDHSA CSPVCPAGME 301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLEDEG LCVESTECPC 351 VHS GKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD 401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIETV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG 451 LHNSLVKCLKH GAGVAMDGQD IQLPLLKGD RIQHTVTASV RLSYGEDLQM 501 DWDGRGRLLV KLSVPYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG 551 NAWKLGDCQ DLQKQHSDFC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS 601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGRV AVRE PGRCEL 651 NCPKQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD 701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD 751 AVLSSPLSHR SKR 763
Домен D' VWF	764 <u>SLSCRPP MVKLVCPADN</u> <u>LRAEGLECTK</u> <u>TCQNYDLECM</u> 801 <u>SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF</u> <u>HQKEYAPGE TVKIGCNTCV</u> 851 <u>CRDRKWCTD</u> <u>HVCDAT</u> 866
Домен VWF D3 фактора фон Виллебранда	867 <u>CSTI GMAHYLTFDG</u> <u>LKYLFPGEQ YVLVQDYCGS</u> 901 <u>NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE</u> <u>GGEIELFDGE VNVKRPMKDE</u> 951 <u>THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI</u> <u>SVVLQTYQE KVCGLCGNFD</u> 1001 <u>GIQNDLTSS NLOVEEDPVD FGNSWKVSSQ</u> <u>CADTRKPLD SSPATCHNNI</u> 1051 <u>MKQTMVDSSC RILTSDFVD CNKLVDPEPY</u> <u>LDVCIYDTCES CESIGDCACF</u> 1101 <u>CDTIAAYAHV CAQHGKVVW RTATLCPOS</u> <u>EERNLRENGY ECEWRYNSCA</u>

		1151	<u>PACQVTCQHP</u> <u>EPLACPVQCV</u> <u>EGCHAHCPPG</u> <u>KILDELLQTC</u> <u>VDPEDCPVCE</u>
		1201	<u>VAGRRFASGK</u> <u>KVTLNPSDPE</u> <u>HCQICHCDVV</u> <u>NLTCEACQEP</u>
		1240	
Домен фактора Виллебранда	VWFA1 фон	1241	GGLVVPPTDA
		1251	PVSPTTYLYVE DISEPPLHDF YCSRLLDLVF LLDGSSRLSE AEFEVLKAFV
		1301	VDMMERIRTS QKWVRVAVVF YHDGSHAYTG LKDRKRPESEL RRIASQVKYA
		1351	GSQVASTSEV LKYTLFQIFS KIDRPEASRI ALLLMASQEP QRMSRNFVRY
		1401	VQGLKKKKVI VIPVGIGPHA NLKQIRLIEK QAPENKAFVL SSVDELEQQR
		1451	DEIVSYLCDL APEAPPPTLP PDMAQVTVG 1479
		1501	FVLEGSBKIG EADFNRSEKF MEEVIQRMDV GQDSIHVTVL QYSYMTVEY
		1551	PFSEAQSKGD ILQRVREIRY QGGNRTNTGL ALRYLSDHSF LVSQGDREQA 1600
		1601	PNLVYMTGN PASDEIKRLP GDIQVPIGV GPNANVQELE RIGWPNAPIL
		1651	IQDFETLPRE APDLVLQRCR SGEGLQIPTL SPAPDCSQPL DVILLLDGSS
		1701	SFPASYFDEM KSFQAFISK ANIGPRLTQV SVLQYGSITT IDVPWNVPE
		1751	KAHLLSLVDV MQREGGPSQI GDALGFAVRY LTSEMHGARP GASKAVVILV
		1801	TDVSVDSVDA AADAARSNRV TVFPIGIGDR YDAAQLRILA GPAGDSNVVK
		1851	LQRIEDLPTM VTLGNSFLHK LCSEGFVVICM DEGNEKRPG DVWTLDPQCH
		1901	TVTCQPDGQT LLKSHRVNCD RGLRPSCPNS QSPVKEETC GCRWTCPCVC
		1951	TGSSTRHIVT FDGQNFKLTG SCSYVLFQNK EQDLEVILHN GACSPGARQG
		2001	CMKSEVKHS ALSVEXHSDM EVTVNGRLVS VPYVGGNMEV NVYGAIMHEV
		2051	RFNHLGHIFT FTPQNEFQL QLSPKTFASK TYGLCGICDE NGANDEMLRD
		2101	GTVTTDWCTL VQEWTVQRPQ QTCQPILEEQ CLVPDSSHQ VLLLPLFAEC
		2151	HKVLAPATFY AICQQDSCHQ EQVCEVIASY AHLCRTNGVC VDWRTPDFCA
		2201	MSCPPLSVYN HCEHGCPRHC DGNVSSCGDH PSEGCFPPD KVMLEGSCVP

	2251	EEACTQCIGE DGVQHQFLEA WVPDHQPCQI CTCLSGRKVN CTTQPCPTAK
	2301	APTCGLCEVA RLRQNADQCC PEYECVCDPV SCDLPPVPHC ERGLQPTLTN
	2351	PGECRPNFTC ACRKEECKRV SPPSCPPHRL PTLRKTQCCD EYECACNCVN
	2401	STVSCPLGYL ASTATNDCGC TTTTCLPDKV CVHRSTIYPV GQFWEEGCDV
	2451	CTCTDMEDAV MGLRVAQCSQ KPCEDSCRSG FTYVLHEGEC CGRCLPSACE
	2501	VVTGSPRGDS QSSWKSVMGQ WASPENPCLI NECVRVKEEV FIQQRNVSCP
	2551	QLEVPVCPSP FQLSCKTSAC CPSCRCERME ACMLNGTVIG PGKTVMIDVC
	2601	TTCRCMVQVG VISGFKLECR KTTCNPCPLG YKEENNTGEC CGRCLPTACT
	2651	IQLRGGQIMT LKRDETLQDG CDTHFCKVNE RGEYFWEKRV TGCPPFDEHK
	2701	CLAEQKIMK IPGTCCDTCE EPECNDITAR LQYVKVGSK SEVEVDIHYC
	2751	QGKCASKAMY SIDINDVQDQ CSCCSPTRTE PMQVALHCTN GSVVYHEVLN
	2801	AMECKCSPRK CSK
	Нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 1)	
Полноразмерный VWF	1	ATGATTCCTG CCAGATTTGC CGGGGTGCTG CTTGCTCTGG CCCTCATTTT 51 GCCAGGGACC CTTTGTGCAG AAGGAACCTG CGGCAGGTCA TCCACGGCCC 101 GATGCAGCCT TTTCGGAAGT GACTTCGTCA ACACCTTGA TGGGAGCATG 151 TACAGCTTTG CGGGATACTG CAGTTACCTC CTGGCAGGGG GCTGCCAGAA 201 ACGCTCCTTC TCGATTATTG GGGACTTCCA GAATGGCAAG AGAGTGAGCC 251 TCTCCGTGTA TCTTGGGGAA TTTTTTGACA TCCATTTGTT TGTCAATGGT 301 ACCGTGACAC AGGGGGACCA AAGAGTCTCC ATGCCCTATG CCTCCAAAGG 351 GCTGTATCTA GAAACTGAGG CTGGGTACTA CAAGCTGTCC GGTGAGGCCT 401 ATGGCTTTGT GGCCAGGATC GATGGCAGCG GCAACTTTCA AGTCCTGCTG 451 TCAGACAGAT ACTTCAACAA GACCTGCGGG CTGTGTGGCA ACTTTAACAT 501 CTTTGCTGAA GATGACTTTA TGACCCAAGA AGGGACCTTG ACCTCGGACC 551 CTTATGACTT TGCCAACTCA TGGGCTCTGA GCAGTGGAGA ACAGTGGTGT 601 GAACGGGCAT CTCCTCCAG CAGCTCATGC AACATCTCCT CTGGGGAAAT

651	GCAGAAGGGC CTGTGGGAGC AGTGCCAGCT TCTGAAGAGC ACCTCGGTGT
701	TGCCCCGCTG CCACCCTCTG GTGGACCCCG AGCCTTTTGT GGCCCTGTGT
751	GAGAAGACTT TGTGTGAGTG TGCTGGGGGG CTGGAGTGCG CCTGCCCTGC
801	CCTCCTGGAG TACGCCCGGA CCTGTGCCCA GGAGGGAATG GTGCTGTACG
851	GCTGGACCGA CCACAGCGCG TGCAGCCCAG TGTGCCCTGC TGGTATGGAG
901	TATAGGCAGT GTGTGTCCCC TTGCGCCAGG ACCTGCCAGA GCCTGCACAT
951	CAATGAAATG TGTCAGGAGC GATGCGTGGA TGGCTGCAGC TGCCCTGAGG
1001	GACAGCTCCT GGATGAAGGC CTCTGCGTGG AGAGCACCGA GTGTCCCTGC
1051	GTGCATTCCG GAAAGCGCTA CCCTCCCGGC ACCTCCCTCT CTCGAGACTG
1101	CAACACCTGC ATTTGCCGAA ACAGCCAGTG GATCTGCAGC AATGAAGAAT
1151	GTCCAGGGGA GTGCCTTGTC ACTGGTCAAT CCCACTTCAA GAGCTTTGAC
1201	AACAGATACT TCACCTCAG TGGGATCTGC CAGTACCTGC TGGCCCGGGA
1251	TGCCAGGAC CACTCCTTCT CCATTGTCAT TGAGACTGTC CAGTGTGCTG
1301	ATGACCGCGA CGCTGTGTGC ACCCGCTCCG TCACCGTCCG GCTGCCTGGC
1351	CTGCACAACA GCCTTGTGAA ACTGAAGCAT GGGGCAGGAG TTGCCATGGA
1401	TGCCAGGAC ATCCAGCTCC CCCTCCTGAA AGGTGACCTC CGCATCCAGC
1451	ATACAGTGAC GGCCTCCGTG CGCCTCAGCT ACGGGGAGGA CCTGCAGATG
1501	GACTGGGATG GCCGCGGGAG GCTGCTGGTG AAGCTGTCCC CCGTCTATGC
1551	CGGGAAGACC TGCGGCCTGT GTGGGAATTA CAATGGCAAC CAGGGCGACG
1601	ACTTCCTTAC CCCCTCTGGG CTGGCRGAGC CCCGGGTGGA GGA CTTCGGG
1651	AACGCCTGGA AGCTGCACGG GGA CTGCCAG GACCTGCAGA AGCAGCACAG
1701	CGATCCCTGC GCCCTCAACC CGCGCATGAC CAGGTTCTCC GAGGAGGCGT
1751	GCGCGTCCT GACGTCCCC ACATTCGAGG CCTGCCATCG TGCCGTCAGC
1801	CCGCTGCCCT ACCTGCGGAA CTGCCGCTAC GACGTGTGCT CCTGCTCGGA
1851	CGGCCGCGAG TGCCTGTGCG GCGCCCTGGC CAGCTATGCC GCGGCCTGCC
1901	CGGGGAGAGG CGTGCGCGTC GCGTGCGCG AGCCAGGCCG CTGTGAGCTG

1951	AACTGCCCGA AAGGCCAGGT GTACCTGCAG TGCGGGACCC CCTGCAACCT
2001	GACCTGCCGC TCTCTCTCTT ACCCGGATGA GGAATGCAAT GAGGCCTGCC
2051	TGGAGGGCTG CTTCTGCCCC CCAGGGCTCT ACATGGATGA GAGGGGGAC
2101	TGCGTGCCCA AGGCCCAGTG CCCCTGTTAC TATGACGGTG AGATCTTCCA
2151	GCCAGAAGAC ATCTTCTCAG ACCATCACAC CATGTGTAC TGTGAGGATG
2201	GCTTCATGCA CTGTACCATG AGTGGAGTCC CCGGAAGCTT GCTGCCTGAC
2251	GCTGTCTCA GCAGTCCCTT GTCTCATCGC AGCAAAAGGA GCCTATCCTG
2301	TCGGCCCCC ATGGTCAAGC TGGTGTGTCC CGCTGACAAC CTGCGGGCTG
2351	AAGGGCTCGA GTGTACCAAA ACGTGCCAGA ACTATGACCT GGAGTGCATG
2401	AGCATGGGCT GTGTCTCTGG CTGCCTCTGC CCCCCGGGCA TGGTCCGGCA
2451	TGAGAACAGA TGTGTGGCCC TGGAAAGGTG TCCCTGCTTC CATCAGGGCA
2501	AGGAGTATGC CCCTGGAGAA ACAGTGAAGA TTGGCTGCAA CACTTGTGTC
2551	TGTCGGGACC GGAAGTGGAA CTGCACAGAC CATGTGTGTG ATGCCACGTG
2601	CTCCACGATC GGCATGGCCC ACTACCTCAC CTTGACGGG CTCAAATACC
2651	TGTTCCCCGG GGAGTGCCAG TACGTTCTGG TGCAGGATTA CTGCGGCAGT
2701	AACCCTGGGA CCTTTCGGAT CCTAGTGGGG AATAAGGGAT GCAGCCACCC
2751	CTCAGTGAAG TGCAAGAAAC GGGTCACCAT CCTGGTGGAG GGAGGAGAGA
2801	TTGAGCTGTT TGACGGGGAG GTGAATGTGA AGAGGCCCAT GAAGGATGAG
2851	ACTCACTTTG AGGTGGTGGG GTCTGGCCGG TACATCATTC TGCTGCTGGG
2901	CAAAGCCCTC TCCGTGGTCT GGGACCGCCA CCTGAGCATC TCCGTGGTCC
2951	TGAAGCAGAC ATACCAGGAG AAAGTGTGTG GCCTGTGTGG GAATTTTGAT
3001	GGCATCCAGA ACAATGACCT CACCAGCAGC AACCTCCAAG TGGAGGAAGA
3051	CCCTGTGGAC TTTGGGAACT CCTGGAAAGT GAGCTCGCAG TGTGCTGACA
3101	CCAGAAAAGT GCCTCTGGAC TCATCCCCTG CCACCTGCCA TAACAACATC
3151	ATGAAGCAGA CGATGGTGGG TTCCTCCTGT AGAATCCTTA CCAGTGACGT
3201	CTCCAGGAC TGCAACAAGC TGGTGGACCC CGAGCCATAT CTGGATGTCT

	3251 GCATTACGA CACCTGCTCC TGTGAGTCCA TTGGGGACTG CGCCTGCTTC 3301 TGCGACACCA TTGCTGCCTA TGCCACCGTG TGTGCCCAGC ATGGCAAGGT 3351 GGTGACCTGG AGGACGGCCA CATTGTGCCC CCAGAGCTGC GAGGAGAGGA 3401 ATCTCCGGGA GAACGGGTAT GAGTGTGAGT GCGCTATAA CAGCTGTGCA 3451 CCTGCCTGTC AAGTCACGTG TCAGCACCTT GAGCCACTGG CCTGCCCTGT 3501 GCAGTGTGTG GAGGGCTGCC ATGCCACTG CCCTCCAGGG AAAATCCTGG 3551 ATGAGCTTTT GCAGACCTGC GTTGACCCTG AAGACTGTCC AGTGTGTGAG 3601 GTGGCTGGCC GCGTTTTGC CTCAGGAAAG AAAGTCACCT TGAATCCCAG 3651 TGACCCTGAG CACTGCCAGA TTTGCCACTG TGATGTTGTC AACCTCACCT 3701 GTGAAGCCTG CCAGGAGCCG GGAGGCCTGG TGGTGCCTCC CACAGATGCC 3751 CCGGTGAGCC CCACCACTCT GTATGTGGAG GACATCTCGG AACCGCCGTT 3801 GCACGATTTT TACTGCAGCA GGCTACTGGA CCTGGTCTTC CTGCTGGATG 3851 GCTCCTCCAG GCTGTCCGAG GCTGAGTTT AAGTGCTGAA GGCCTTTGTG 3901 GTGGACATGA TGGAGCGGCT GCGCATCTCC CAGAAGTGGG TCCGCGTGGC 3951 CGTGGTGGAG TACCACGACG GCTCCACGC CTACATCGGG CTCAAGGACC 4001 GGAAGCGACC GTCAGAGCTG CGGCGCATTG CCAGCCAGGT GAAGTATGCC 4051 GGCAGCCAGG TGGCCTCCAC CAGCGAGGTC TTGAAATACA CACTGTTCCA 4101 AATCTTCAGC AAGATCGACC GCCCTGAAGC CTCCCGCATC GCCCTGCTCC 4151 TGATGGCCAG CCAGGAGCCC CAACGGATGT CCCGGAACCT TGTCCGCTAC 4201 GTCCAGGGCC TGAAGAAGAA GAAGGTCATT GTGATCCCGG TGGGCATTGG 4251 GCCCCATGCC AACCTCAAGC AGATCCGCTT CATCGAGAAG CAGGCCCTTG 4301 AGAACAAGGC CTTCGTGCTG AGCAGTGTGG ATGAGCTGGA GCAGCAAAGG 4351 GACGAGATCG TTAGCTACCT CTGTGACCTT GCCCTGAAG CCCCTCCTCC 4401 TACTCTGCCC CCCGACATGG CACAAGTCAC TGTGGGCCCG GGGCTCTTGG 4451 GGGTTTCGAC CCTGGGGCCC AAGAGGAACT CCATGGTTCT GGATGTGGCG 4501 TTCGTCCTGG AAGGATCGGA CAAAATGGT GAAGCCGACT TCAACAGGAG
--	--

4551	CAAGGAGTTC ATGGAGGAGG TGATTCAGCG GATGGATGTG GGCCAGGACA
4601	GCATCCACGT CACGGTGCTG CAGTACTCCT ACATGGTGAC CGTGGAGTAC
4651	CCCTTCAGCG AGGCACAGTC CAAAGGGGAC ATCCTGCAGC GGGTGCAGGA
4701	GATCCGCTAC CAGGGCGGCA ACAGGACCAA CACTGGGCTG GCCCTGCGGT
4751	ACCTCTCTGA CCACAGCTTC TTGGTCAGCC AGGGTGACCG GGAGCAGGCG
4801	CCCAACCTGG TCTACATGGT CACCGGAAAT CCTGCCTCTG ATGAGATCAA
4851	GAGGCTGCCT GGAGACATCC AGGTGGTGCC CATTGGAGTG GGCCCTAATG
4901	CCAACGTGCA GGAGCTGGAG AGGATTGGCT GGCCCAATGC CCCTATCCTC
4951	ATCCAGGACT TTGAGACGCT CCCCGAGAG GCTCCTGACC TGGTGCTGCA
5001	GAGGTGCTGC TCCGGAGAGG GGCTGCAGAT CCCCACCCTC TCCCCTGCAC
5051	CTGACTGCAG CCAGCCCCTG GACGTGATCC TTCTCCTGGA TGGCTCCTCC
5101	AGTTTCCAG CTTCTTATTT TGATGAAATG AAGAGTTTCG CCAAGGCTTT
5151	CATTTCAAAA GCCAATATAG GGCCTGTCT CACTCAGGTG TCAGTGCTGC
5201	AGTATGGAAG CATCACCACC ATTGACGTGC CATGGAACGT GGTCCCGGAG
5251	AAAGCCATT TGCTGAGCCT TGTGGACGTC ATGCAGCGGG AGGGAGGCC
5301	CAGCCAAATC GGGGATGCTT TGGGCTTTGC TGTGCGATAC TTGACTTCAG
5351	AAATGCATGG TGCCAGGCCG GGAGCCTCAA AGGCGGTGGT CATCCTGGTC
5401	ACGGACGTCT CTGTGGATTC AGTGGATGCA GCAGCTGATG CCGCCAGGTC
5451	CAACAGAGTG ACAGTGTTC CTATTGGAAT TGGAGATCGC TACGATGCAG
5501	CCCAGCTACG GATCTTGGCA GGCCCAGCAG GCGACTCAA CGTGGTGAAG
5551	CTCCAGCGAA TCGAAGACCT CCCTACCATG GTCACCTTGG GCAATTCCTT
5601	CCTCCACAAA CTGTGCTCTG GATTTGTTAG GATTTGCATG GATGAGGATG
5651	GGAATGAGAA GAGGCCCGGG GACGTCTGGA CCTTGCCAGA CCAGTGCCAC
5701	ACCGTGACTT GCCAGCCAGA TGGCCAGACC TTGCTGAAGA GTCATCGGGT
5751	CAACTGTGAC CGGGGGCTGA GGCCTTCGTG CCCTAACAGC CAGTCCCCTG
5801	TTAAAGTGA AGAGACCTGT GGCTGCCGCT GGACCTGCCC CTGYGTGTGC

5851	ACAGGCAGCT CCACTCGGCA CATCGTGACC TTTGATGGGC AGAATTTCAA
5901	GCTGACTGGC AGCTGTTCTT ATGTCCTATT TCAAAACAAG GAGCAGGACC
5951	TGGAGGTGAT TCTCCATAAT GGTGCCTGCA GCCCTGGAGC AAGGCAGGGC
6001	TGCATGAAAT CCATCGAGGT GAAGCACAGT GCCCTCTCCG TCGAGSTGCA
6051	CAGTGACATG GAGGTGACGG TGAATGGGAG ACTGGTCTCT GTTCCTTACG
6101	TGGGTGGGAA CATGGAAGTC AACGTTTATG GTGCCATCAT GCATGAGGTC
6151	AGATTCAATC ACCTTGGTCA CATCTTCACA TTCACTCCAC AAAACAATGA
6201	GTTCCAAC TG CAGCTCAGCC CCAAGACTTT TGCTTCAAAG ACGTATGGTC
6251	TGTGTGGGAT CTGTGATGAG AACGGAGCCA ATGACTTCAT GCTGAGGGAT
6301	GGCACAGTCA CCACAGACTG GAAAACACTT GTTCAGGAAT GACTGTGCA
6351	GCGGCCAGGG CAGACGTGCC AGCCCATCCT GGAGGAGCAG TGTCTTGTCC
6401	CCGACAGCTC CCACTGCCAG GTCCTCCTCT TACCACTGTT TGCTGAATGC
6451	CACAAGGTCC TGGCTCCAGC CACATTCTAT GCCATCTGCC AGCAGGACAG
6501	TTGCCACCAG GAGCAAGTGT GTGAGGTGAT CGCCTCTTAT GCCCACCTCT
6551	GTCGGACCAA CGGGGTCTGC GTTGACTGGA GGACACCTGA TTTCTGTGCT
6601	ATGTCATGCC CACCATCTCT GGTCTACAAC CACTGTGAGC ATGGCTGTCC
6651	CCGGCACTGT GATGGCAACG TGAGCTCCTG TGGGGACCAT CCCTCCGAAG
6701	GCTGTTTCTG CCCTCCAGAT AAAGTCATGT TGGAAGGCAG CTGTGTCCCT
6751	GAAGAGGCCT GCACTCAGTG CATTGGTGAG GATGGAGTCC AGCACCAGTT
6801	CCTGGAAGCC TGGGTCCCGG ACCACCAGCC CTGTCAGATC TGCACATGCC
6851	TCAGCGGGCG GAAGGTCAAC TGCACAACGC AGCCCTGCCC CACGGCCAAA
6901	GCTCCCACGT GTGGCCTGTG TGAAGTAGCC CGCCTCCGCC AGAATGCAGA
6951	CCAGTGCTGC CCCGAGTATG AGTGTGTGTG TGACCCAGTG AGCTGTGACC
7001	TGCCCCAGT GCCTCACTGT GAACGTGGCC TCCAGCCCAC ACTGACCAAC
7051	CCTGGCGAGT GCAGACCCAA CTTCACCTGC GCCTGCAGGA AGGAGGAGTG
7101	CAAAAGAGTG TCCCACCCT CCTGCCCCCC GCACCGTTG CCCACCCTTC

	7151 GGAAGACCCA GTGCTGTGAT GAGTATGAGT GTGCCTGCAA CTGTGTCAAC
	7201 TCCACAGTGA GCTGTCCCCT TGGGTACTTG GCCTCAACCG CCACCAATGA
	7251 CTGTGGCTGT ACCACAACCA CCTGCCTTCC CGACAAGGTG TGTGTCCACC
	7301 GAAGCACCAT CTACCCTGTG GGCCAGTTCT GGGAGGAGGG CTGCGATGTG
	7351 TGCACCTGCA CCGACATGGA GGATGCCGTG ATGGGCCTCC GCGTGGCCCA
	7401 GTGCTCCAG AAGCCCTGTG AGGACAGCTG TCGGTCGGGC TTCACTTACG
	7451 TTCTGCATGA AGGCGAGTGC TGTGGAAGGT GCCTGCCATC TGCCTGTGAG
	7501 GTGGTACTG GCTCACCGCG GGGGACTCC CAGTCTTCTT GGAAGAGTGT
	7551 CGGCTCCAG TGGGCCTCCC CGGAGAACCC CTGCCTCATC AATGAGTGTG
	7601 TCCGAGTGAA GGAGGAGGTC TTTATACAAC AAAGGAACGT CTCCTGCCCC
	7651 CAGCTGGAGG TCCCTGTCTG CCCCTCGGGC TTTCAGCTGA GCTGTAAGAC
	7701 CTCAGCGTGC TGCCCAAGCT GTCGCTGTGA GCGCATGGAG GCCTGCATGC
	7751 TCAATGGCAC TGTCAATTGGG CCCGGAAGA CTGTGATGAT CGATGTGTGC
	7801 ACGACCTGCC GCTGCATGGT GCAGGTGGGG GTCATCTCTG GATTCAAGCT
	7851 GGAGTGCAGG AAGACCACCT GCAACCCTG CCCCCTGGGT TACAAGGAAG
	7901 AAAATAACAC AGGTGAATGT TGTGGGAGAT GTTTGCCTAC GGCTTGCACC
	7951 ATTCAGCTAA GAGGAGGACA GATCATGACA CTGAAGCGTG ATGAGACGCT
	8001 CCAGGATGGC TGTGATACTC ACTTCTGCAA GGTCAATGAG AGAGGAGAGT
	8051 ACTTCTGGGA GAAGAGGGTC ACAGGCTGCC CACCCTTTGA TGAACACAAG
	8101 TGTCTTGCTG AGGGAGGTAA AATTATGAAA ATTCCAGGCA CCTGCTGTGA
	8151 CACATGTGAG GAGCCTGAGT GCAACGACAT CACTGCCAGG CTGCAGTATG
	8201 TCAAGGTGGG AAGCTGTAAG TCTGAAGTAG AGGTGGATAT CCACTACTGC
	8251 CAGGGCAAAT GTGCCAGCAA AGCCATGTAC TCCATTGACA TCAACGATGT
	8301 GCAGGACCAG TGCTCCTGCT GCTCTCCGAC ACGGACGGAG CCCATGCAGG
	8351 TGGCCCTGCA CTGCACCAAT GGCTCTGTTG TGTACCATGA GGTTCTCAAT
	8401 GCCATGGAGT GCAAATGCTC CCCCAGGAAG TGCAGCAAGT GA

В настоящем описании VWFфрагмент фактора фон Виллебранда может представлять собой VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, содержащий домен D' и домен VWFD3 фактора фон Виллебранда, при этом указанный VWFфрагмент фактора фон Виллебранда связывается с фактором VIII (FVIII) и ингибирует связывание VWFэндогенного фактора фон Виллебранда (полноразмерного VWF) с FVIII. VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, содержащий домен D' и домен D3, может дополнительно содержать домен VWF, выбранный из группы, состоящей из домена A1, домена A2, домена A3, домена D1, домена D2, домена D4, домена B1, домена B2, домена B3, домена C1, домена C2, домена CK, их одного или более фрагментов и их любых комбинаций. В одном из вариантов реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда содержит, по существу состоит из или состоит из

- (1) доменов D' и VWFD3 фактора фон Виллебранда или их фрагментов;
- (2) доменов D1, D' и VWFD3 фактора фон Виллебранда или их фрагментов;
- (3) доменов D2, D' и VWFD3 фактора фон Виллебранда или их фрагментов;
- (4) доменов D1, D2, D' и VWFD3 фактора фон Виллебранда или их фрагментов; или
- (5) доменов D1, D2, D', D3 и VWFA1 фактора фон Виллебранда или их фрагментов.

VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, описанный в настоящем документе, не содержит сайт связывания с рецептором, ответственным за клиренс VWF. В другом варианте реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, описанный в настоящем документе, не соответствует аминокислотам с 764 по 1274 последовательности SEQ ID NO: 2. VWFфрагмент фактора фон Виллебранда согласно настоящему изобретению может содержать любые другие последовательности, связанные или слитые с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда. Например, VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, описанный в настоящем документе, может дополнительно содержать сигнальный пептид. В одном из вариантов реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда связывается или ассоциирует с белком FVIII. Путем связывания или ассоциации с белком FVIII VWFфрагмент фактора фон Виллебранда согласно настоящему изобретению защищает FVIII от расщепления протеазами и активации FVIII, стабилизирует тяжелую цепь и легкую цепь FVIII, и предотвращает клиренс FVIII фагоцитарными рецепторами. В другом варианте реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда связывается или ассоциирует с белком FVIII и блокирует или предотвращает связывание белка FVIII к фосфолипидом и активированным протеином C. Путем предотвращения или ингибирования связывания белка FVIII с эндогенным полноразмерным VWF, VWFфрагмент фактора фон Виллебранда согласно настоящему изобретению снижает клиренс FVIII рецепторами, ответственными за клиренс VWF, и таким образом увеличивает период полувыведения белка FVIII. Таким образом, в одном из вариантов реализации увеличение периода полувыведения белка FVIII обусловлено связыванием или ассоциацией VWFфрагмента фактора фон Виллебранда, в котором отсутствует сайт связывания с рецептором, ответственным за клиренс VWF, с белком FVIII и ограждением или защитой белка FVIII VWFфрагментом фактора фон Виллебранда от VWFэндогенного фактора фон Виллебранда, который содержит сайт связывания с рецептором, ответственным за клиренс VWF. Белок FVIII, связанный с или защищенный VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, также может обеспечивать рециркуляцию белка FVIII. За счет устранения сайтов связывания с рецептором, ответственным за клиренс VWF, содержащихся в полноразмерной молекуле VWF, гетеродимеры FVIII/VWF согласно настоящему изобретению защищены от пути клиренса VWF, что также увеличивает период полувыведения FVIII.

В одном из вариантов реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда согласно настоящему изобретению содержит домен D' и домен VWFD3 фактора фон Виллебранда, при этом домен D' по меньшей мере на 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичен аминокислотам с 764 по 866 последовательности SEQ ID NO: 2, при этом VWFфрагмент фактора фон Виллебранда предотвращает связывание VWFэндогенного фактора фон Виллебранда с FVIII. В другом варианте реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда содержит домен D' и домен VWFD3 фактора фон Виллебранда, при этом домен D3 по меньшей мере на 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичен аминокислотам с 867 по 1240 последовательности SEQ ID NO: 2, при этом VWFфрагмент фактора фон Виллебранда предотвращает связывание VWFэндогенного фактора фон Виллебранда с FVIII. В некоторых вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, описанный в настоящем документе, содержит, по существу состоит из или состоит из домена D' и домена VWFD3 фактора фон Виллебранда, которые по меньшей мере на 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны аминокислотам с 764 по 1240 последовательности SEQ ID NO: 2, при этом VWFфрагмент фактора фон Виллебранда предотвращает связывание VWFэндогенного фактора фон Виллебранда с FVIII. В других вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда содержит, по существу состоит из или состоит из доменов D1, D2, D' и D3, по меньшей мере на 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичных аминокислотам с 23 по 1240 последовательности SEQ ID NO: 2, при этом VWFфрагмент фактора фон Виллебранда предотвращает связывание VWFэндогенного фактора фон Виллебранда с FVIII. В других вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда содержит также сигнальный пептид, функционально связанный с ним.

В некоторых вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда согласно настоящему изобретению по существу состоит из или состоит из

- (1) домена D'D3, домена D1D'D3, домена D2D'D3 или домена D1D2D'D3; и
- (2) дополнительной последовательности VWF до примерно 10 аминокислот (например, любые последовательности от аминокислот с 764 по 1240 SEQ ID NO: 2 до аминокислот с 764 по 1250 SEQ ID NO: 2), до примерно 15 аминокислот (например, любые последовательности от аминокислот с 764 по 1240 SEQ ID NO: 2 до аминокислот с 764 по 1255 SEQ ID NO: 2), до примерно 20 аминокислот (например, любые последовательности от аминокислот с 764 по 1240 SEQ ID NO: 2 до аминокислот с 764 по 1260 SEQ ID NO: 2), до примерно 25 аминокислот (например, любые последовательности от аминокислот с 764 по 1240 SEQ ID NO: 2 до аминокислот с 764 по 1265 SEQ ID NO: 2) или до примерно 30 аминокислот (например, любые последовательности от аминокислот с 764 по 1240 SEQ ID NO: 2 до аминокислот с 764 по 1260 SEQ ID NO: 2).

В конкретном варианте реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, содержащий или по существу состоящий из домена D' и домена D3, не представляет собой ни аминокислоты с 764 по 1274 последовательности SEQ ID NO: 2, ни полноразмерный зрелый VWF. В некоторых вариантах реализации домен D1D2 экспрессирован в транс-положении с доменом D'D3. В некоторых вариантах реализации

домен D1D2 экспрессирован в цис-положении с доменом D'D3.

В других вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, содержащий домены D'D3, связанные с доменами D1D2, содержит также сайт внутриклеточного расщепления, например (сайт расщепления PACE (фурином) или PC5), что обеспечивает отщепление доменов D1D2 от доменов D'D3 после экспрессии. Неограничивающие примеры сайта внутриклеточного расщепления описаны в иных местах настоящего документа.

В других вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда содержит домен D' и домен D3, но не содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

- (1) аминокислот с 1241 по 2813 SEQ ID NO: 2;
- (2) аминокислот с 1270 по 2813 SEQ ID NO: 2;
- (3) аминокислот с 1271 по 2813 SEQ ID NO: 2;
- (4) аминокислот с 1272 по 2813 SEQ ID NO: 2;
- (5) аминокислот с 1273 по 2813 SEQ ID NO: 2;
- (6) аминокислот с 1274 по 2813 SEQ ID NO: 2 и их любых комбинаций.

В других вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда согласно настоящему изобретению содержит, по существу состоит из или состоит из аминокислотной последовательности, соответствующей домену D', домену D3 и домену A1, при этом указанная аминокислотная последовательность по меньшей мере на 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотам с 764 по 1479 последовательности SEQ ID NO: 2, при этом указанный VWFфрагмент фактора фон Виллебранда предотвращает связывание VWFэндогенного фактора фон Виллебранда с FVIII. В конкретном варианте реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда не соответствует аминокислотам с 764 по 1274 последовательности SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда согласно настоящему изобретению содержит домен D' и домен D3, но не содержит по меньшей мере один домен VWF, выбранный из группы, состоящей из

- (1) домена A1;
- (2) домена A2;
- (3) домена A3;
- (4) домена D4;
- (5) домена B1;
- (6) домена B2;
- (7) домена B3;
- (8) домена C1;
- (9) домена C2;
- (10) домена СК;
- (11) домена СК и домена C2;
- (12) домена СК, домена C2 и домена C1;
- (13) домена СК, домена C2, домена C1, домена B3;
- (14) домена СК, домена C2, домена C1, домена B3, домена B2;
- (15) домена СК, домена C2, домена C1, домена B3, домена B2 и домена B1;
- (16) домена СК, домена C2, домена C1, домена B3, домена B2, домена B1 и домена D4;
- (17) домена СК, домена C2, домена C1, домена B3, домена B2, домена B1, домена D4 и домена A3;
- (18) домена СК, домена C2, домена C1, домена B3, домена B2, домена B1, домена D4, домена A3 и домена A2;
- (19) домена СК, домена C2, домена C1, домена B3, домена B2, домена B1, домена D4, домена A3, домена A2 и домена A1; и
- (20) их любых комбинаций.

В других вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда содержит домены D'D3 и один или более доменов или модулей. Примеры таких доменов или модулей включают, но не ограничиваются перечисленными, домены и модули, описанные в Zhou et al., Blood, опубликованном в интернете 6 апреля 2012 г., DOI: 10.1182/blood-2012-01-405134. Например, VWFфрагмент фактора фон Виллебранда может содержать домен D'D3 и один или более доменов или модулей, выбранных из группы, состоящей из домена A1, домена A2, домена A3, модуля D4N, модуля VWD4, модуля C8-4, модуля TIL-4, модуля C1, модуля C2, модуля C3, модуля C4, модуля C5, модуля C5, модуля C6 и их любых комбинаций. В других вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда связан с гетерологичным фрагментом, при этом указанный гетерологичный фрагмент связан с N-концом или C-концом VWFфрагмента фактора фон Виллебранда, или встроено непосредственно ниже одной или более аминокислот (например, один или более сайтов встраивания XTEN) в белке FVIII во фрагменте VWF. Например, сайты встраивания для гетерологичного фрагмента во фрагменте VWF могут находиться в домене D', домене D3 или обоих. Гетерологичный фрагмент может представлять собой "увеличитель" периода полувыведения.

В некоторых вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда согласно настоящему изобретению образует мультимер, например димер, тример, тетрамер, пентамер, гексамер, гептамер или

мультимеры более высокого порядка. В других вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда представляет собой мономер, содержащий только один VWFфрагмент фактора фон Виллебранда. В некоторых вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда согласно настоящему изобретению может содержать одну или более замен, делеций, присоединений или модификаций аминокислот. В одном из вариантов реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда может содержать замены, делеций, присоединения или модификации аминокислот, в результате чего VWFфрагмент фактора фон Виллебранда не способен образовывать дисульфидную связь или образовывать димер или мультимер. В другом варианте реализации замена аминокислоты находится в пределах домена D' и домена D3. В конкретном варианте реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда согласно настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну замену аминокислоты в остатке, соответствующем остатку 1099, остатку 1142 или как остатку 1099, так и остатку 1142 последовательности SEQ ID NO: 2. Указанная по меньшей мере одна замена аминокислоты может представлять собой любые аминокислоты, которые не встречаются в природе в VWF дикого типа. Например, замена аминокислоты может представлять собой любые аминокислоты, отличные от цистеина, например изолейцин, аланин, лейцин, аспарагин, лизин, аспарагиновую кислоту, метионин, фенилаланин, глутаминовую кислоту, треонин, глутамин, триптофан, глицин, валин, пролин, серин, тирозин, аргинин или гистидин. В другом примере замена аминокислоты включает одну или более аминокислот, которые предотвращают или ингибируют образование фрагментами VWF мультимеров. В некоторых вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, подходящий для настоящего изобретения, может быть дополнительно модифицирован для улучшения взаимодействия с FVIII, например, для повышения аффинности связывания в отношении FVIII. В качестве неограничивающего примера, VWFфрагмент фактора фон Виллебранда содержит остаток серина в остатке, соответствующем аминокислоте 764 последовательности SEQ ID NO: 2, и остаток лизина в остатке, соответствующем аминокислоте 773 последовательности SEQ ID NO: 2. Остатки 764 и/или 773 могут вносить вклад в аффинность связывания VWFфрагментов фактора фон Виллебранда в отношении FVIII. В других вариантах реализации фрагменты VWF, подходящие для настоящего изобретения, могут содержать другие модификации, например белок может быть пегилирован, гликозилирован, гэкилирован (модифицирован ГЭК) или полисиалилирован.

В) Последовательности XTEN.

В настоящем описании термин "последовательность XTEN" относится к полипептидам увеличенной длины с не встречающимися в природе, по существу не повторяющимися последовательностями, которые главным образом состоят из малых гидрофильных аминокислот, при этом последовательность имеет низкий уровень или не имеет вторичной или третичной структуры в физиологических условиях. В качестве партнера химерного белка, XTEN могут служить в качестве носителя, придавая определенные желаемые фармакокинетические, физико-химические и фармацевтические свойства при связывании с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда или последовательностью FVIII согласно настоящему изобретению с образованием химерного белка. Такие желаемые свойства включают, но не ограничиваются перечисленными: улучшенные фармакокинетические параметры и характеристики растворимости. В настоящем описании термин "XTEN", в частности, исключает антитела или фрагменты антител, такие как одноцепочечные антитела или фрагменты Fc легкой цепи или тяжелой цепи.

В некоторых вариантах реализации последовательность XTEN согласно настоящему изобретению представляет собой пептид или полипептид, содержащий больше примерно 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 или 2000 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации XTEN представляет собой пептид или полипептид, содержащий больше чем от примерно 20 до примерно 3000 аминокислотных остатков, больше чем от примерно 30 до примерно 2500 остатков, больше чем от примерно 40 до примерно 2000 остатков, больше чем от 50 до примерно 1500 остатков, больше чем от 60 до примерно 1000 остатков, больше чем от 70 до примерно 900 остатков, больше чем от 80 до примерно 800 остатков, больше чем от 90 до примерно 700 остатков, больше чем от 100 до примерно 600 остатков, больше чем от 110 до примерно 500 остатков или больше чем от 120 до примерно 400 остатков.

Последовательность XTEN согласно настоящему изобретению может содержать одну или более последовательностей-мотивов из 9-14 аминокислотных остатков или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную последовательности-мотиву, при этом указанный мотив содержит, по существу состоит из или состоит из 4-6 типов аминокислот, выбранных из группы, состоящей из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P). См. US 2010-0239554 A1.

В некоторых вариантах реализации XTEN содержит не перекрывающиеся последовательности-мотивы, в которых примерно 80%, или по меньшей мере примерно 85%, или по меньшей мере примерно 90%, или примерно 91%, или примерно 92%, или примерно 93%, или примерно 94%, или примерно 95%, или примерно 96%, или примерно 97%, или примерно 98%, или примерно 99%, или примерно 100% последовательности состоит из нескольких единиц не перекрывающихся последовательностей, выбранных из одного семейства мотивов, выбранного из табл. 2А, что приводит к семейству последовательностей. В настоящем описании термин "семейство" означает, что XTEN содержит мотивы, выбранные только из

одной категории мотивов из табл. 2А, т.е. AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC или BD XTEN, и что любые другие аминокислоты в XTEN не из семейства мотивов выбраны для получения необходимого свойства, например, для обеспечения включения сайта рестрикции кодирующими нуклеотидами, включения последовательности расщепления или для достижения лучшего связывания с FVIII или VWF. В некоторых вариантах семейств XTEN последовательность XTEN содержит несколько единиц не пересекающихся последовательностей-мотивов семейства мотивов AD или семейства мотивов AE, или семейства мотивов AF, или семейства мотивов AG, или семейства мотивов AM, или семейства мотивов AQ, или семейства BC, или семейства BD, и полученная XTEN демонстрирует диапазон гомологии, описанный выше. В других вариантах реализации XTEN содержит несколько единиц последовательностей-мотивов двух или более семейств мотивов из табл. 2А. Данные последовательности могут быть выбраны для получения желаемых физических/химических характеристик, включая такие свойства, как суммарный заряд, гидрофильность, отсутствие вторичной структуры или отсутствие повторяемости, которые придает аминокислотный состав мотивов, более подробно описанный ниже. В вариантах реализации, описанных выше в данном абзаце, мотивы, включенные в XTEN, могут быть выбраны и собраны с использованием способов, описанных в настоящем документе, с получением XTEN из примерно 36 - примерно 3000 аминокислотных остатков.

Таблица 2А

Последовательности-мотивы из
12 аминокислот и семейства мотивов XTEN

Семейство мотивов*	ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ-МОТИВ
AD	GESPGGSSGSES
AD	GSEGSSGPGESS
AD	GSSESGSSEGGP
AD	GSGGEPSESGSS
AE, AM	GSPAGSPTSTEE
AE, AM, AQ	GSEPATSGSETP
AE, AM, AQ	GTSESATPESGP
AE, AM, AQ	GTSTEPSEGSAP
AF, AM	GSTSEPSGTAP
AF, AM	GTSTPESGSASP
AF, AM	GTSPSGESSTAP
AF, AM	GSTSSTAESPGP
AG, AM	GTPGSGTASSSP
AG, AM	GSSTPSGATGSP
AG, AM	GSSPSASTGTGP
AG, AM	GASPGTSSTGSP
AQ	GEPAGSPTSTSE
AQ	GTGEPSTPASE
AQ	GSGPSTESAPTE
AQ	GSETPSGPSETA
AQ	GPSETSTSEPGA
AQ	GSPSEPTEGTSA
BC	GSGASEPTSTEP
BC	GSEPATSGTEPS
BC	GTSEPSTSEPGA
BC	GTSTEPSEPGSA
BD	GSTAGSETSTEA
BD	GSETATSGSETA
BD	GTSESATSESGA
BD	GTSTEASEGSAS

Обозначает отдельные последовательности-мотивы, которые при совместном использовании в различных перестановках, приводят к "семейству последовательностей".

XTEN может иметь различную длину для встраивания или связывания с FVIII или VWF. В одном из вариантов реализации длина последовательности (последовательностей) XTEN выбрана исходя из свойства или функции, получаемой в гибридном белке. В зависимости от предполагаемого свойства или функции, XTEN может представлять собой короткую или средней длины последовательность или более длинную последовательность, которая может служить в качестве носителей. В некоторых вариантах реализации XTEN включает короткие сегменты от примерно 6 до примерно 99 аминокислотных остатков, сегменты средней длины от примерно 100 до примерно 399 аминокислотных остатков и более длинные сегменты от примерно 400 до примерно 1000 и до примерно 3000 аминокислотных остатков. Таким образом, XTEN, встроенная или связанная с FVIII или VWF может иметь длину, составляющую примерно 6, примерно 12, примерно 36, примерно 40, примерно 42, примерно 72, примерно 96, примерно 144, примерно 288, примерно 400, примерно 500, примерно 576, примерно 600, примерно 700, примерно 800, примерно 864, примерно 900, примерно 1000, примерно 1500, примерно 2000, примерно 2500 или до

примерно 3000 аминокислотных остатков. В других вариантах реализации длина последовательности XTEN составляет от примерно 6 до примерно 50, от примерно 50 до примерно 100, от примерно 100 до 150, от примерно 150 до 250, от примерно 250 до 400, от примерно 400 до примерно 500, от примерно 500 до примерно 900, от примерно 900 до примерно 1500, от примерно 1500 до примерно 2000 или от примерно 2000 до примерно 3000 аминокислотных остатков. Точная длина XTEN, встроенной или связанной с FVIII или VWF, может варьироваться, не оказывая при этом отрицательного влияния на активность FVIII или VWF. В одном из вариантов реализации одна или более XTEN, используемых в настоящем изобретении, имеют длину 36 аминокислот, 42 аминокислот, 72 аминокислот, 144 аминокислот, 288 аминокислот, 576 аминокислот или 864 аминокислот, и могут быть выбраны из одной или более последовательностей семейства XTEN, т.е. AD, AE, AF, AG, AM, AQ, BC или BD.

В некоторых вариантах реализации последовательность XTEN, используемая в настоящем изобретении, по меньшей мере на 60, 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из

AE42, AG42, AE48, AM48, AE72, AG72, AE108, AG108, AE144, AF144, AG144, AE180, AG180, AE216, AG216, AE252, AG252, AE288, AG288, AE324, AG324, AE360, AG360, AE396, AG396, AE432, AG432, AE468, AG468, AE504, AG504, AF504, AE540, AG540, AF540, AD576, AE576, AF576, AG576, AE612, AG612, AE624, AE648, AG648, AG684, AE720, AG720, AE756, AG756, AE792, AG792, AE828, AG828, AD836, AE864, AF864, AG864, AM875, AE912, AM923, AM1318, BC864, BD864, AE948, AE1044, AE1140, AE1236, AE1332, AE1428, AE1524, AE1620, AE1716, AE1812, AE1908, AE2004A, AG948, AG1044, AG1140, AG1236, AG1332, AG1428, AG1524, AG1620, AG1716, AG1812, AG1908 и AG2004. См. US 2010-0239554 A1.

В одном из вариантов реализации последовательность XTEN по меньшей мере на 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из

AE42 (SEQ ID NO: 36), AE72 (SEQ ID NO: 127), AE144_2A (SEQ ID NO: 128), AE144_3B (SEQ ID NO: 129), AE144_4A (SEQ ID NO: 130), AE144_5A (SEQ ID NO: 131), AE144_6B (SEQ ID NO: 132), AG144_A (SEQ ID NO: 133), AG144_B (SEQ ID NO: 134), AG144_C (SEQ ID NO: 135), AG144_F (SEQ ID NO: 136), AE864 (SEQ ID NO: 43), AE576 (SEQ ID NO: 41), AE288 (SEQ ID NO: 39), AE288_2 (SEQ ID NO: 137), AE144 (SEQ ID NO: 37), AG864 (SEQ ID NO: 44), AG576 (SEQ ID NO: 42), AG288 (SEQ ID NO: 40), AG144 (SEQ ID NO: 38)

и их любых комбинаций.

В некоторых вариантах реализации менее 100% аминокислот XTEN выбраны из глицина (G), аланина (A), серина (S), треонина (T), глутамата (E) и пролина (P) или менее 100% указанной последовательности состоит из последовательностей-мотивов из табл. 2A или последовательностей XTEN из табл. 2B. В таких вариантах реализации остальные аминокислотные остатки в XTEN выбраны из любых других 14 природных L-аминокислот, но могут быть предпочтительно выбраны из гидрофильных аминокислот, в результате чего последовательность XTEN содержит по меньшей мере примерно 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% или по меньшей мере примерно 99% гидрофильных аминокислот. Содержание гидрофобных аминокислот в XTEN, используемой в конъюгированных конструкциях, может быть меньше 5%, или меньше 2%, или меньше 1% гидрофобных аминокислот. Гидрофобные остатки, которые менее предпочтительны при формировании XTEN, включают триптофан, фенилаланин, тирозин, лейцин, изолейцин, валин и метионин. Кроме того, последовательности XTEN могут содержать меньше 5%, или меньше 4%, или меньше 3%, или меньше 2%, или меньше 1% или могут не содержать ни одной из следующих аминокислот: метионина (например, во избежание окисления) или аспарагина и глутамина (во избежание дезамидирования).

В другом варианте реализации последовательность XTEN выбрана из группы, состоящей из

AE42 (SEQ ID NO: 36), AE72 (SEQ ID NO: 127), AE144_2A (SEQ ID NO: 128), AE144_3B (SEQ ID NO: 129), AE144_4A (SEQ ID NO: 130), AE144_5A (SEQ ID NO: 131), AE144_6B (SEQ ID NO: 132), AG144_A (SEQ ID NO: 133), AG144_B (SEQ ID NO: 134), AG144_C (SEQ ID NO: 135), AG144_F (SEQ ID NO: 136), AE864 (SEQ ID NO: 43), AE576 (SEQ ID NO: 41), AE288 (SEQ ID NO: 39), AE288_2 (SEQ ID NO: 137), AE144 (SEQ ID NO: 37), AG864 (SEQ ID NO: 44), AG576 (SEQ ID NO: 42), AG288 (SEQ ID NO: 40), AG144 (SEQ ID NO: 38)

и их любых комбинаций.

В конкретном варианте реализации последовательность ХТЕН представляет собой АЕ288. Аминокислотные последовательности для некоторых последовательностей ХТЕН согласно настоящему изобретению представлены в табл. 2В.

Таблица 2В

Последовательности ХТЕН	
ХТЕН	Аминокислотная последовательность
АЕ42 SEQ ID NO: 36	GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS
АЕ72 SEQ ID NO: 127	GAPTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGASS
АЕ144 SEQ ID NO: 37	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSESA PESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
АЕ144_2А (SEQ ID NO: 128)	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES GPG
АЕ144_3В (SEQ ID NO: 129)	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APG
АЕ144_4А (SEQ ID NO: 130)	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APG
АЕ144_5А (SEQ ID NO: 131)	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEG
АЕ144_6В (SEQ ID NO: 132)	TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APG
АГ144 SEQ ID NO: 38	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG PGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS TGSPGSSPSA STGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP
АГ144_А (SEQ ID NO: 133)	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSP
АГ144_В (SEQ ID NO: 134)	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT SPGSSPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSP
АГ144_С	GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG

(SEQ ID NO: 135)	SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST GSP
AG144_F (SEQ ID NO: 136)	GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST GSP
AE288 SEQ ID NO:39	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAP
AE288_2 (SEQ ID NO: 137)	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAP
AG288 SEQ ID NO:40	PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTG TGPSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGS
AE576 SEQ ID NO:41	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEP

		<p>ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP</p>
AG576 SEQ NO:42	ID	<p>PGTPGSGTASSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSAST GTGPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGSS PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPGATGSPGSS TPGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGS</p>
AE864 SEQ NO:43	ID	<p>GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE EGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSE ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSP AGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPG SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP</p>

AG864		GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTTPGSGTASSS
SEQ	ID	PGSSTPSGATGS
NO:44		PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG
		SPGTTPGSGTASS
		SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT
		GSPGASPGTSST
		GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST
		GTGPGSSTPSGA
		TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTS
		STGSPGTPGSGT
		ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSA
		STGTGPGTPGSG
		TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTP
		SGATGSPGSSTP
		SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSST
		PSGATGSPGSST
		PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP
		GSGTASSSPGAS
		PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGT
		PGSGTASSSPGS
		STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG
		SSTPSGATGSPG
		SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP
		GTPGSGTASSSP
		GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGS
		PGASPGTSSTGS
		PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGT
		GPGTPGSGTASS
		SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP

В других вариантах реализации последовательность XTEN, используемая в настоящем изобретении, влияет на физическое или химическое свойство, например фармакокинетику химерного белка согласно настоящему изобретению. Последовательность XTEN, используемая в настоящем изобретении, может демонстрировать одно или более из следующих предпочтительных свойств: конформационная гибкость, повышенная растворимость в воде, высокая степень резистентности к протеазам, низкая иммуногенность, низкое связывание с рецепторами млекопитающих или увеличенные гидродинамические радиусы (или радиусы Стокса). В конкретном варианте реализации последовательность XTEN, связанная с белком FVIII в настоящем изобретении, улучшает фармакокинетические свойства, такие как более длительный конечный период полувыведения или увеличенная площадь под кривой (ППК), так что химерный белок, описанный в настоящем документе, остается *in vivo* в течение увеличенного периода времени по сравнению с FVIII дикого типа. В других вариантах реализации последовательность XTEN, используемая в настоящем изобретении, улучшает фармакокинетические свойства, такие как более длительный конечный период полувыведения или увеличенная площадь под кривой (ППК), так что белок FVIII остается *in vivo* в течение увеличенного периода времени по сравнению с FVIII дикого типа. Для определения физических/химических свойств белков, содержащих последовательность XTEN, могут быть использованы различные методы и анализы. Такие методы включают, но не ограничиваются перечисленными, аналитическое центрифугирование, электронный парамагнитный резонанс (EPR), ВЭЖХ-ионный обмен, эксклюзионную ВЭЖХ, обращенно-фазовую ВЭЖХ, рассеяние света, капиллярный электрофорез, круговой дихроизм, дифференциальную сканирующую калориметрию, флуоресценцию, ВЭЖХ-ионный обмен, эксклюзионную ВЭЖХ, ИК, ЯМР, рамановскую спектроскопию, рефрактометрию и спектроскопию в УФ/видимой области. Дополнительные методы описаны в Amai et al., Prot. Expr. and Purif., 48, 1-13 (2006). Дополнительные примеры последовательностей XTEN, которые могут быть использованы согласно настоящему изобретению, описаны в публикации патента США № 2010/023955 A1, 2010/0323956 A1, 2011/0046060 A1, 2011/0046061 A1, 2011/0077199 A1 или 2011/0172146 A1 или международной публикации патента № WO 2010091122 A1, WO 2010144502 A2, WO 2010144508 A1, WO 2011028228 A1, WO 2011028229 A1 или WO 2011028344 A2.

С) Белок фактора VIII (FVIII).

В настоящем описании термин "белок FVIII" означает функциональный полипептид FVIII, играющий обычную роль в свертывании крови, если не указано иное. Термин "белок FVIII" включает его функциональный фрагмент, вариант, аналог или производное, сохраняющее функцию полноразмерного фактора VIII дикого типа в пути свертывания крови. Термины "белок FVIII", "полипептид (или белок) FVIII" или "FVIII" являются взаимозаменяемыми. Примеры функций FVIII включают, но не ограничиваются перечисленными, способность активировать свертывание крови, способность выступать в качестве кофактора для фактора IX или способность образовывать теназный комплекс с фактором IX в присутствии Ca^{2+} и фосфолипидов, который затем превращает фактор X в активированную форму Xa . Белок FVIII может представлять собой белок FVIII человека, свиньи, собаки, крысы или мыши. Кроме того,

сравнение FVIII людей и других видов позволило идентифицировать консервативные остатки, которые могут быть необходимы для выполнения функции (Cameron et al., *Thromb. Haemost.*, 79:317-22 (1998); US 6251632). Доступен ряд тестов для оценки функции системы свертывания крови: тест на определение активированного частичного тромбопластинового времени (аРТТ), хромогенный анализ, анализ ROTEM, тест на определение протромбинового времени (PT) (также используемый для определения международного коэффициента нормализации (INR)), тест на определение фибриногена (часто методом Клаусса), подсчет количества тромбоцитов, тестирование функции тромбоцитов (часто с помощью анализатора функции тромбоцитов (PFA-100)), процентный объем тромбоцитов в крови (ТСТ), время кровотечения, тест со смешиванием (устраняется ли аномальность, если плазму крови пациента смешивают с нормальной плазмой крови), анализы факторов свертывания крови, антифосфолипидные антитела, D-димер, генетические тесты (например, фактор V Ляйдена, протромбиновая мутация G20210A), время в пробе с разбавленным ядом гадюки Рассела (dRVVT), смешанные тесты на определение функции тромбоцитов, тромбоэластография (TEG или Sonoclot), тромбоэластометрия (ТЕМ®, например, ротационная тромбоэластометрия (ROTEM)) или время лизиса эуглобулина (ELT). Тест аРТТ является показателем эффективности, позволяющим оценить эффективность как "внутреннего" (также называемого контактным путем активации), так и общего пути свертывания крови. Данный тест широко используют для измерения свертывающей активности коммерчески доступных рекомбинантных факторов свертывания крови, например FVIII или FIX. Его используют в сочетании с тестом на определение протромбинового времени (PT), который позволяет оценить внешний путь. Анализ ROTEM дает информацию обо всей кинетике гемостаза: время свертывания крови, образование сгустка крови, стабильность и лизис сгустка крови. Различные параметры тромбоэластометрии зависят от активности системы свертывания плазмы крови, функции тромбоцитов, фибринолиза или многих факторов, влияющих на данные взаимодействия. Данный анализ может дать полное представление о вторичном гемостазе. Известны полипептидные и полинуклеотидные последовательности FVIII, а также многие функциональные фрагменты, мутанты и модифицированные варианты. Примеры последовательностей (полноразмерные) FVIII человека приведены ниже.

Таблица 3

Аминокислотная последовательность полноразмерного фактора VIII

Сигнальный пептид: (SEQ ID NO: 3)

MQIELSTCFFLCLRFCFS

Зрелый фактор VIII (SEQ ID NO: 4)*

ATRRYYLGAVELSDYMQSDLGELPVDARFPFRVPKSPFPNTSVVYKKTFLVEFT
DHLFNIAKPRPPWMLLGPITIAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASE
GAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLV
KDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDR
DAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTPEVHSIFLEGHT
FLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLMLDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSQP
EEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDEMDVVRFDNNSPFIQIRSVAKKHPKTWVHY
IAAEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQIRIGRKYKRVRFMAYTDETFKTR
AIQHEGILGPLLYGEVGDITLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGV
KHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSFVNMERDLASGLIGP
LLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQRFLEPNPAGVQLED
PEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKH
KMVEDTLTLFPFSGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVVSSCDKNT
GDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSONSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD
PWFAHRTMPKIQNVSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKEYETFSDDPSPGAI
DSNNLSLSEMTFRPQLHHSQDMVFTPESEGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSS
TSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDITLFGKSSPLTESGGP
LSLSEENNSKLLSGLMNSQESSWGKNVSTESGRLFKGKRAHGPAALLTKDNAL
FKVSIISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDFEKKVTPL
IHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQKKEGPIPPDAQNPDMSSFFKML
FLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSKQLVSLGPEKSVSQNLFLEKNKVVVGKG
EFTKDVGLKEMVFPSSRNLFNLNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVV
LPQIHTVTGKNFMKNLFLSTRQNVESYDGAYAPVLQDFRSINDSTNRKTKHT
AHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQQRKRALKQFRL
PLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGATQSPSLDCLT
RSHSIPQANRSPPIAKVSSFPDIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASRKKDQSGVQE
SSHFLQGAKKNNLSLAITLLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPD
PKTSGKVELLPKVHIYQKDLFPETSNNGSPGHLDLVEGSLLOQTGEGAIKWNEANR

PGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPKTAFFKKK
 DTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPVVKRHQREI
 TRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKTRHYFIAAVER
 LWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPQFKKVVQFEFTDGSFTQPLYRGENEHLGLLG
 PYIRAEDVNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKKNFVKPNETKTY
 FWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLCHTNTLNPAHGRQ
 VTVQEFALFFTI FDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYI
 MDTLPLGLVMAQDQIRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYP
 GVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPMGASGHIRDF
 QITASGYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI IHGIKTQGAR
 QKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPII
 ARYIRLHPHTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMF
 ATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTQGVKSLLTSM
 YVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRHP
 QSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

Полноразмерный FVIII (сигнальный пептид FVIII подчеркнут; тяжелая цепь FVIII подчеркнута двойной чертой; домен В выделен курсивом; и легкая цепь FVIII представлена в виде обычного текста).

Таблица 4

Нуклеотидная последовательность,
 кодирующая полноразмерный FVIII (SEQ ID NO: 5)*

661	<u>ATG</u>
<u>CAAATAGAGC TCTCCACCTG</u>	
721 <u>CTTCTTTCTG TGCCTTTTGC GATTCTGCTT TAGTGCCACC</u>	
AGAAGATACT ACCTGGGTGC	
781 AGTGGAAGCTG TCATGGGACT ATATGCAAAG TGATCTCGGT	
GAGCTGCCTG TGGACGCAAG	
841 ATTTCCCTCCT AGAGTGCCAA AATCTTTTCC ATTCAACACC	
TCAGTCGTGT AAAAAAGAC	
901 TCTGTTTGTA GAATTCACGG ATCACCTTTT CAACATCGCT	
AAGCCAAGGC CACCCTGGAT	
961 GGGTCTGCTA GGTCTACCA TCCAGGCTGA GGTATTATGAT	
ACAGTGGTCA TTACACTTAA	
1021 GAACATGGCT TCCCATCCTG TCAGTCTTCA TGCTGTTGGT	
GTATCCTACT GGAAAGCTTC	
1081 TGAGGGAGCT GAATATGATG ATCAGACCAG TCAAAGGGAG	
AAAGAAGATG ATAAAGTCTT	
1141 CCCTGGTGGA AGCCATACAT ATGTCTGGCA GGTCTGAAA	
GAGAATGGTC CAATGGCCTC	
1201 TGACCCACTG TGCCTTACCT ACTCATATCT TTCTCATGTG	
GACCTGGTAA AAGACTTGAA	
1261 TTCAGGCCTC ATTGGAGCCC TACTAGTATG TAGAGAAGGG	
AGTCTGGCCA AGGAAAAGAC	
1321 ACAGACCTTG CACAAATTTA TACTACTTTT TGCTGTATTT	
GATGAAGGGA AAAGTTGGCA	
1381 CTCAGAAACA AAGAACTCCT TGATGCAGGA TAGGGATGCT	
GCATCTGCTC GGCCTGGCC	
1441 TAAAATGCAC ACAGTCAATG GTTATGTAAA CAGGTCTCTG	
CCAGGTCTGA TTGGATGCCA	
1501 CAGGAAATCA GTCTATTGGC ATGTGATTGG AATGGGCACC	
ACTCCTGAAG TGCACTCAAT	
1561 ATTCCTCGAA GGTCACACAT TTCTTGAGAG GAACCATCGC	
CAGGCGTCTT TGGAAATCTC	
1621 GCCAATAACT TTCCTTACTG CTCAAACACT CTTGATGGAC	
CTTGGACAGT TTCTACTGTT	
1681 TTGTCATATC TCTTCCCACC AACATGATGG CATGGAAGCT	
TATGTCAAAG TAGACAGCTG	
1741 TCCAGAGGAA CCCCAACTAC GAATGAAAAA TAATGAAGAA	
GCGGAAGACT ATGATGATGA	
1801 TCTTACTGAT TCTGAAATGG ATGTGGTCAG GTTTGATGAT	
GACAACTCTC CTTCCCTTAT	
1861 CCAAATTCGC TCAGTTGCCA AGAAGCATCC TAAAACCTGG	
GTACATTACA TTGCTGCTGA	
1921 AGAGGAGGAC TGGGACTATG CTCCCTTAGT CCTCGCCCCC	
GATGACAGAA GTTATAAAAG	

1981 TCAATATTTG AACAATGGCC CTCAGCGGAT TGGTAGGAAG
 TACAAAAAAG TCCGATTTAT
 2041 GGCATACACA GATGAAACCT TTAAGACTCG TGAAGCTATT
 CAGCATGAAT CAGGAATCTT
 2101 GGGACCTTTA CTTTATGGGG AAGTTGGAGA CACACTGTTG
 ATTATATTTA AGAATCAAGC
 2161 AAGCAGACCA TATAACATCT ACCCTCACGG AATCACTGAT
 GTCCGTCCCT TGTATTCAAG
 2221 GAGATTACCA AAAGGTGTAA AACATTTGAA GGATTTTCCA
 ATTCTGCCAG GAGAAATATT
 2281 CAAATATAAA TGGACAGTGA CTGTAGAAGA TGGGCCAACT
 AAATCAGATC CTCGGTGCCT
 2341 GACCCGCTAT TACTCTAGTT TCGTTAATAT GGAGAGAGAT
 CTAGCTTCAG GACTCATTGG
 2401 CCCTCTCCTC ATCTGCTACA AAGAATCTGT AGATCAAAGA
 GGAAACCAGA TAATGTCAGA
 2461 CAAGAGGAAT GTCATCCTGT TTTCTGTATT TGATGAGAAC
 CGAAGCTGGT ACCTCACAGA
 2521 GAATATACAA CGCTTCTCC CCAATCCAGC TGGAGTGCAG
 CTTGAGGATC CAGAGTTCCA
 2581 AGCCTCCAAC ATCATGCACA GCATCAATGG CTATGTTTTT
 GATAGTTTGC AGTTGTCAGT
 2641 TTGTTTGCAT GAGGTGGCAT ACTGGTACAT TCTAAGCATT
 GGAGCACAGA CTGACTTCCT
 2701 TTCTGTCTTC TTCTCTGGAT ATACCTTCAA ACACAAAATG
 GTCTATGAAG ACACACTCAC
 2761 CCTATTCCCA TTCTCAGGAG AAAGTGTCTT CATGTCGATG
 GAAAACCCAG GTCTATGGAT
 2821 TCTGGGGTGC CACAACCTAG ACTTTCGGAA CAGAGGCATG
 ACCGCCTTAC TGAAGGTTTC
 2881 TAGTTGTGAC AAGAACACTG GTGATTATTA CGAGGACAGT
 TATGAAGATA TTTCAGCATA
 2941 CTTGCTGAGT AAAACAATG CCATTGAACC AAGAAGCTTC
 TCCCAGAATT CAAGACACCC
 3001 TAGCACTAGG CAAAAGCAAT TTAATGCCAC CACAATTCCA
 GAAAATGACA TAGAGAAGAC
 3061 TGACCCTTGG TTTGCACACA GAACACCTAT GCCTAAAATA
 CAAAATGTCT CCTCTAGTGA
 3121 TTTGTTGATG CTCTTGGCAG AGAGTCCTAC TCCACATGGG
 CTATCCTTAT CTGATCTCCA
 3181 AGAAGCCAAA TATGAGACTT TTTCTGATGA TCCATCACCT
 GGAGCAATAG ACAGTAATAA
 3241 CAGCCTGTCT GAAATGACAC ACTTCAGGCC ACAGCTCCAT
 CACAGTGGGG ACATGGTATT
 3301 TACCCCTGAG TCAGGCCTCC AATTAAGATT AAATGAGAAA
 CTGGGGACAA CTGCAGCAAC
 3361 AGAGTTGAAG AAAGTGTGATT TCAAAGTTTC TAGTACATCA
 AATAATCTGA TTCAACAAT
 3421 TCCATCAGAC AATTTGGCAG CAGGTACTGA TAATACAAGT
 TCCTTAGGAC CCCCAAGTAT
 3481 GCCAGTTCAT TATGATAGTC AATTAGATAC CACTCTATTT
 GGCAAAAAGT CATCTCCCCT
 3541 TACTGAGTCT GGTGGACCTC TGAGCTTGAG TGAAGAAAAT
 ATGATTCLL AGTTGTTAGL
 3601 ATCAGGTTTA ATGAATAGCC AAGAAAGTTC ATGGGGAAAA
 AATGTATCGT CAACAGAGAG
 3661 TGGTAGGTTA TTTAAAGGGA AAAGAGCTCA TGGACCTGCT
 TTGTTGACTA AAGATAATGC
 3721 CTTATTCAAA GTTAGCATCT CTTTGTAAA GACAAACAAA
 ACTTCCAATA ATCAGCAAC
 3781 TAATAGAAAG ACTCACATTG ATGGCCCATC ATTATTAATT
 GAGAATAGTC CATCAGTCTG
 3841 GCAAAATATA TTAGAAAGTG AACTGAGTT TAAAAAAGTG
 ACACCTTTGA TTCATGACAG

3901 AATGCTTATG GACAAAAATG CTACAGCTTT GAGGCTAAAT
CATATGTCAA ATAAAACTAC
3961 TTCATCAAAA AACATGGAAA TGGTCCAACA GAAAAAAGAG
GGCCCCATT CACCAGATGC
4021 ACAAAAATCCA GATATGTCGT TCTTTAAGAT GCTATTCTTG
CCAGAATCAG CAAGGTGGAT
4081 ACAAAGGACT CATGGAAAGA ACTCTCTGAA CTCTGGGCAA
GGCCCCAGTC CAAAGCAATT
4141 AGTATCCTTA GGACCAGAAA AATCTGTGGA AGGTCAGAAT
TTCTTGTCTG AGAAAAACAA
4201 AGTGGTAGTA GGAAAGGGTG AATTTACAAA GGACGTAGGA
CTCAAAGAGA TGGTTTTTCC
4261 AAGCAGCAGA AACCTATTTT TTACTAACTT GGATAATTTA
CATGAAAATA ATACACACAA
4321 TCAAGAAAAA AAAATTCAGG AAGAAATAGA AAAGAAGGAA
ACATTAATCC AAGAGAATGT
4381 AGTTTTGCCT CAGATACATA CAGTGAAGTGG CACTAAGAAT
TTCATGAAGA ACCTTTTCTT
4441 ACTGAGCACT AGGCAAAATG TAGAAGGTTC ATATGACGGG
GCATATGCTC CAGTACTTCA
4501 AGATTTTAGG TCATTAAATG ATTCAACAAA TAGAACAAAG
AAACACACAG CTCATTTCTC
4561 AAAAAAAGGG GAGGAAGAAA ACTTGGAAGG CTTGGGAAAT
CAAACCAAGC AAATTGTAGA
4621 GAAATATGCA TGCACCACAA GGATATCTCC TAATACAAGC
CAGCAGAATT TTGTCACGCA
4681 ACGTAGTAAG AGAGCTTTGA AACAAATCAG ACTCCCCTA
GAAGAAACAG AACTTGAAAA
4741 AAGGATAATT GTGGATGACA CCTCAACCCA GTGGTCCAAA
AACATGAAAC ATTTGACCCC
4801 GAGCACCTC ACACAGATAG ACTACAATGA GAAGGAGAAA
GGGGCCATTA CTCAGTCTCC
4861 CTTATCAGAT TGCCTTACGA GGAGTCATAG CATCCCTCAA
GCAAATAGAT TCATTACC
4921 CATTGCAAAG GTATCATCAT TTCCATCTAT TAGACCTATA
TATCTGACCA GGGTCCTATT
4981 CCAAGACAAC TCTTCTCATC TTCCAGCAGC ATCTTATAGA
AAGAAAGATT CTGGGGTCCA
5041 AGAAAGCAGT CATTCTTAC AAGGAGCCAA AAAAAATAAC
CTTTCTTTAG CCATTCTAAC
5101 CTTGGAGATG ACTGGTGATC AAAGAGAGGT TGGCTCCCTG
GGGACAAGTG CCACAAATTC
5161 AGTCACATAC AAGAAAGTTG AGAACACTGT TCTCCCGAAA
CCAGACTTGC CAAAACATC
5221 TGGCAAAGTT GAATGCTTC CAAAAGTTCA CATTATCAG
AAGGACCTAT TCCCTACGGA
5281 AACTAGCAAT GGGTCTCCTG GCCATCTGGA TCTCGTGGAA
GGGAGCCTTC TTCAGGGAAC
5341 AGAGGGAGCG ATTAAGTGGA ATGAAGCAA CAGACCTGGA
AAAGTTCCCT TTCTGAGAGT
5401 AGCAACAGAA AGCTCTGCAA AGACTCCCTC CAAGCTATTG
GATCCTCTTG CTTGGGATAA

5461 CCACTATGGT ACTCAGATAC CAAAAGAAGA GTGGAAATCC
CAAGAGAAGT CACCAGAAAA
5521 AACAGCTTTT AAGAAAAAGG ATACCATTTT GTCCCTGAAC
GCTTGTGAAA GCAATCATGC
5581 AATAGCAGCA ATAAATGAGG GACAAAATAA GCCCGAAATA
GAAGTCACCT GGGCAAAGCA
5641 AGGTAGGACT GAAAGGCTGT GCTCTCAAAA CCCACCAGTC
TTGAAACGCC ATCAACGGGA
5701 AATAACTCGT ACTACTCTTC AGTCAGATCA AGAGGAAATT
GACTATGATG ATACCATATC
5761 AGTTGAAATG AAGAAGGAAG ATTTTGACAT TTATGATGAG
GATGAAAATC AGAGCCCCCG
5821 CAGCTTTCAA AAGAAAACAC GACACTATTT TATTGCTGCA
GTGGAGAGGC TCTGGGATTA
5881 TGGGATGAGT AGCTCCCCAC ATGTTCTAAG AACAGGGCT
CAGAGTGGCA GTGTCCCTCA
5941 GTTCAAGAAA GTTGTTTTCC AGGAATTTAC TGATGGCTCC
TTTACTCAGC CCTTATACCG
6001 TGGAGAATA AATGAACATT TGGGACTCCT GGGGCCATAT
ATAAGAGCAG AAGTTGAAGA
6061 TAATATCATG GTAACTTTCA GAAATCAGGC CTCTCGTCCC
TATTCCTTCT ATTCTAGCCT
6121 TATTTCTTAT GAGGAAGATC AGAGGCAAGG AGCAGAACCT
AGAAAAAACT TTGTCAAGCC
6181 TAATGAAACC AAAACTTACT TTTGGAAAGT GCAACATCAT
ATGGCACCCA CTAAGATGA
6241 GTTTGACTGC AAAGCCTGGG CTTATTTCTC TGATGTTGAC
CTGGAAAAAG ATGTGCACTC
6301 AGGCCTGATT GGACCCCTTC TGGTCTGCCA CACTAACACA
CTGAACCCTG CTCATGGGAG
6361 ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT TTCACCATC
TTTGATGAGA CCAAAGCTG
6421 GTRACTTCACT GAAAATATGG AAAGAACTG CAGGGCTCCC
TGCAATATCC AGATGGAAGA
6481 TCCCCTTTT AAAGAGAATT ATCGCTTCCA TGCAATCAAT
GGCTACATAA TGGATACACT
6541 ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG GATTTCGATGG
TATCTGCTCA GCATGGGCAG
6601 CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTTCA TGGACATGTG
TTCCTGTAC GAAAAAAGA
6661 GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA TCCAGGTGTT
TTTGAGACAG TGGAAATGTT
6721 ACCATCCAAA GCTGGAATTT GGCGGGTGGG ATGCCTTATT
GGCGAGCATC TACATGCTGG
6781 GATGAGCACA CTTTTTCTGG TGTACAGCAA TAAGTGTGAC
ACTCCCCTGG GAATGGCTTC
6841 TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA
TATGGACAGT GGGCCCCAAA
6901 GCTGGCCAGA CTTTATTATT CCGGATCAAT CAATGCCTGG
AGCACCAAGG AGCCCTTTTC
6961 TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGACCAAT GATTATTCAC
GGCATCAAGA CCCAGGGTGC

```

7021 CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC
      ATCATGTATA GTCTTGATGG
7081 GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC
      TTAATGGTCT TCTTTGGCAA
7141 TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTTAAACCTT
      CCAATTATTG CTCGATACAT
7201 CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCG CAGCACTCTT
      CGCATGGAGT TGATGGGCTG
7261 TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG AATGGAGAGT
      AAAGCAATAT CAGATGCACA
7321 GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC
      TGGTCTCCTT CAAAAGCTCG
7381 ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG
      GTGAATAATC CAAAAGAGTG
7441 GTCGAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA
      GTAACACTC AGGGAGTAAA
7501 ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC
      TCCAGCAGTC AAGATGGCCA
7561 TCAGTGGACT CTCTTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT
      TTTCAAGGAA ATCAAGACTC
7621 CTTCACACCT GTGGTGAACST CTCTAGACCC ACCGTTACTG
      ACTCGCTACC TTCGAATTCA
7681 CCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG
      GTTCTGGGCT GCGAGGCACA
7741 GGACCTCTAC

```

* Подчеркнутые нуклеиновые кислоты кодируют сигнальный пептид.

Полипептиды FVIII включают полноразмерный FVIII, полноразмерный FVIII без Met на N-конце, зрелый FVIII (без сигнальной последовательности), зрелый FVIII с дополнительным Met на N-конце и/или FVIII с полной или частичной делецией домена В. В некоторых вариантах реализации варианты FVIII содержат делеции домена В, будь то частичные или полные делеции.

Последовательность нативного зрелого FVIII человека представлена в виде SEQ ID NO: 4. Нативный белок FVIII имеет следующую формулу:

A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2,

где A1, A2 и A3 представляют собой структурно родственные "домены А",

В представляет собой "домен В",

C1 и C2 представляют собой структурно родственные "домены С", и

a1, a2 и a3 представляют собой кислотные спейсерные области.

Относительно положения первичной аминокислотной последовательности в SEQ ID NO: 4, домен A1 FVIII человека простирается от Ala1 до примерно Arg336, спейсерная область a1 простирается от примерно Met337 до примерно Val374, домен A2 простирается от примерно Ala375 до примерно Tyr719, спейсерная область a2 простирается от примерно Glu720 до примерно Arg740, домен В простирается от примерно Ser741 до примерно Arg1648, спейсерная область a3 простирается от примерно Glu1649 до примерно Arg1689, домен A3 простирается от примерно Ser1690 до примерно Leu2025, домен C1 простирается от примерно Gly2026 до примерно Asn2072, и домен C2 простирается от примерно Ser2073 до Tyr2332. За исключением конкретных сайтов протеолитического расщепления обозначение расположения границ между доменами и областями FVIII может варьироваться в разных литературных источниках. Следовательно, границы, отмеченные в настоящем описании, обозначены как приблизительные путем использования термина "примерно".

Ген FVIII человека был выделен и экспрессирован в клетках млекопитающих (Toole, J.J. et al., Nature, 312:342-347 (1984); Gitschier, J. et al., Nature, 312:326-330 (1984); Wood, W.I. et al., Nature, 312:330-337 (1984); Vehar, G.A. et al., Nature, 312:337-342 (1984); WO 87/04187; WO 88/08035; WO 88/03558; патент США № 4757006). Аминокислотная последовательность FVIII была выведена из кДНК, как показано в патенте США № 4965199. Кроме того, FVIII с частичной или полной делецией В-домена показан в патентах США № 4994371 и 4868112. В некоторых вариантах реализации В-домен FVIII человека заменен В-доменом фактора V человека, как показано в патенте США № 5004803. Последовательность кДНК, кодирующая фактор VIII человека, и аминокислотная последовательность представлены в SEQ ID NO: 4 и 5 соответственно в публикации заявки США № 2005/0100990.

Последовательность FVIII свиньи опубликована в Toole, J.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 83:5939-5942 (1986). Кроме того, полная последовательность кДНК свиньи, полученная в результате ПЦР-амплификации последовательностей FVIII из библиотеки кДНК селезенки свиньи, была описана в Healey, J.F. et al., Blood, 88:4209-4214 (1996). Гибридный FVIII человека/свиньи, содержащий замены всех доменов, всех субъединиц и конкретных аминокислотных последовательностей, описан Lollar и Runge в патенте США № 5364771 и в WO 93/20093. Недавно нуклеотидные и соответствующие аминокис-

кислотные последовательности доменов A1 и A2 FVIII свиньи и химерного FVIII с заменой соответствующих доменов человека на домены A1 и/или A2 свиньи были описаны в WO 94/11503. В патенте США № 5859204, Lollar, J.S., также описана кДНК свиньи и выведенные аминокислотные последовательности. В патенте США № 6458563 описан FVIII свиньи с делецией В-домена.

В патенте США № 5859204, Lollar, J.S., описаны функциональные мутанты FVIII, обладающие пониженной антигенностью и пониженной иммунореактивностью. В патенте США № 6376463, Lollar, J.S., также описаны мутанты FVIII, обладающие пониженной иммунореактивностью. В публикации заявки США № 2005/0100990, Saenko et al., описаны функциональные мутации в домене A2 FVIII.

В одном из вариантов реализации FVIII (или часть FVIII химерного белка) может быть по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичен аминокислотной последовательности FVIII аминокислот с 1 по 1438 SEQ ID NO: 6 или аминокислот с 1 по 2332 SEQ ID NO: 4 (без сигнальной последовательности) или аминокислотной последовательности FVIII аминокислот с 1 по 19 SEQ ID NO: 3 и с 1 по 1438 SEQ ID NO: 6 или аминокислот с 1 по 19 SEQ ID NO: 3 и аминокислот с 1 по 2332 SEQ ID NO: 4 (с сигнальной последовательностью), при этом FVIII обладает свертывающей активностью, например активирует фактор IX в качестве кофактора для превращения фактора X в активированный фактор X. FVIII (или часть FVIII химерного белка) может быть идентичен аминокислотной последовательности FVIII аминокислот с 1 по 1438 SEQ ID NO: 6 или аминокислот с 1 по 2332 SEQ ID NO: 4 (без сигнальной последовательности). FVIII может дополнительно содержать сигнальную последовательность.

В настоящем описании "В-домен" FVIII является таким же, что и В-домен, известный в данной области техники, который определяется идентичностью внутренней аминокислотной последовательности и сайтами протеолитического расщепления, например остатки Ser741-Arg1648 полноразмерного FVIII человека. Другие домены FVIII человека определяется следующими аминокислотными остатками: A1, остатки Ala1-Arg372; A2, остатки Ser373-Arg740; A3, остатки Ser1690-Asn2019; C1, остатки Lys2020-Asn2172; C2, остатки Ser2173-Tyr2332. Последовательность A3-C1-C2 содержит остатки Ser1690-Tyr2332. Остальная последовательность, остатки Glu1649-Arg1689, обычно называется кислотной областью a3. Расположение границ для всех доменов, включая В-домены, для FVIII свиньи, мыши и собаки также известно в данной области техники. В одном из вариантов реализации домен В FVIII делегирован ("фактор VIII с делецией В-домена" или "BDD FVIII"). Примером BDD FVIII является РЕФАКТО® (рекомбинантный BDD FVIII), который содержит такую же последовательность, что и часть фактора VIII последовательности в табл. 5. (тяжелая цепь BDD FVIII подчеркнута двойной чертой; домен В выделен курсивом; и легкая цепь BDD FVIII представлена в виде обычного текста). Нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO: 7), кодирующая аминокислотную последовательность, приведенную в табл. 5, представлена в табл. 6.

Таблица 5

Аминокислотная последовательность
фактора VIII с делецией В-домена (BDD FVIII)

BDD FVIII (SEQ ID NO: 6)

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRPVPSFPFNTSVVYKKTFLVEFT
DHLFNIAPRPPWMLLGPITIQAEVYDVTVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASE
GAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLV
KDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDR
DAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTPEVHSIFLEGHT
FLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLMLDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSQP
EFPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNPSFIIQIRSVAKKHPKTWVHY
IAAEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSOYLNNGPQIRIGRKYKVRFMAYTDETFKTR
AIQHESGILGPLLYGEVGDITLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKCV
KHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMRDLASGLIGP
LLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQRFPLNPAGVQLED
PEFOASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFSGYTFKH
KMVEYEDTLTLPFSGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNT
GDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNPVLRKHQREITRITLQSDQEEIDY
DDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVL
NRAQSGSVPQFKKVVQFETDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVT
FRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRNFKVKNETKTYFWKVQHMAPTKDE
FDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAGRQVTVQEFALFFTI
ETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQR
IRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAG
IWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPMGASGHIRDFQITASGOYQGWAPK
LARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI IHGIKTQGARQKFS SLYISQFI
IMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPIIARYIRLHPHTYSIR
STLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAI SDAQITASSYFTNM FATWSPSKARLHLQG
RSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTQGVKSLTSMYVKEFLISSSQDGH
QWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLR IH PQSWVHQIALRMEVL
GCEAQDLY

Нуклеотидная последовательность,
кодирующая BDD FVIII (SEQ ID NO: 7)*

661	A	TGCAAATAGA
	GCTCTCCACC	TGCTTCTTTC
721	TGTGCCSTTTT	GCGATTCTGC
	CTACCTGGGT	GCAGTGGAAC
781	TGTCATGGGA	CTATATGCAA
	TGTGGACGCA	AGATTTCCTC
841	CTAGAGTGCC	AAAATCTTTT
	GTACAAAAAG	ACTCTGTTTG
901	TAGAATTCAC	GGATCACSTT
	GCCACCCTGG	ATGGGTCTGC
961	TAGGTCCTAC	CATCCAGGCT
	CATTACACTT	AAGAACATGG
1021	CTTCCCATCC	TGTCAGTCTT
	CTGGAAAGCT	TCTGAGGGAG
1081	CTGAATATGA	TGATCAGACC
	TGATAAAGTC	TTCCCTGGTG
1141	GAAGCCATAC	ATATGTCTGG
	TCCAATGGCC	TCTGACCCAC
1201	TGTGCCTTAC	CTACTCATAT
	AAAAGACTTG	AATTCAGGCC
1261	TCATTGGAGC	CCTACTAGTA
	CAAGGAAAAG	ACACAGACCT
1321	TGCACAAATT	TATACTACTT
	GAAAAGTTGG	CACTCAGAAA
1381	CAAAGAATC	CTTGATGCAG
	TCGGGCCTGG	CCTAAAATGC
1441	ACACAGTCAA	TGGTTATGTA
	GATTGGATGC	CACAGGAAAT
1501	CAGTCTATTG	GCATGTGATT
	AGTGCCTCA	ATATTCCTCG
1561	AAGGTCACAC	ATTTCTTG TG
	CTTGGAAATC	TCGCCAATAA
1621	CTTTCCTTAC	TGCTCAAACA
	GTTTCTACTG	TTTTGTCATA
1681	TCTCTTCCCA	CCAACATGAT
	AGTAGACAGC	TGTCAGAGG
1741	AACCCCAACT	ACGAATGAAA
	CTATGATGAT	GATCTTACTG
1801	ATTCTGAAAT	GGATGTGGTC
	TCCTTCCTTT	ATCCAAATTC
1861	GCTCAGTTGC	CAAGAAGCAT
	CATTGCTGCT	GAAGAGGAGG
1921	ACTGGGACTA	TGCTCCCTTA
	AAGTTATAAA	AGTCAATATT
1981	TGAACAATGG	CCCTCAGCGG
	AGTCCGATTT	ATGGCATAACA
2041	CAGATGAAAC	CTTTAAGACT
	ATCAGGAATC	TTGGGACCTT
2101	TACTTTATGG	GGAAGTTGGA
	TAAGAATCAA	GCAAGCAGAC
2161	CATATAACAT	CTACCCTCAC
	TTTGATTTCA	AGGAGATTAC
2221	CAAAAGGTGT	AAAACATTTG
	AGGAGAAATA	TTCAAATATA
2281	AATGGACAGT	GACTGTAGAA
	TCCTCGGTGC	CTGACCCGCT
2341	ATTACTCTAG	TTTCGTTAAT
	AGGACTCATT	GGCCCTCTCC
2401	TCATCTGCTA	CAAAGAATCT
	GATAATGTCA	GACAAGAGGA
2461	ATGTCATCCT	GTTTTCTGTA
	GTACCTCACA	GAGAAATATAC

2521 AACGCTTTCT CCCAATCCA GCTGGAGTGC AGCTTGAGGA
 TCCAGAGTTC CAAGCCTCCA
 2581 ACATCATGCA CAGCATCAAT GGCTATGTTT TTGATAGTTT
 GCAGTTGTCA GTTTGTTC
 2641 ATGAGGTGGC ATACTGGTAC ATTCTAAGCA TTGGAGCACA
 GACTGACTTC CTTTCTGTCT
 2701 TCTTCTCTGG ATATACCTTC AAACACAAAA TGGTCTATGA
 AGACACACTC ACCCTATTCC
 2761 CATTCTCAGG AGAACTGTC TTCATGTCGA TGGAAAACCC
 AGGTCTATGG ATTCTGGGGT
 2821 GCCACAATC AGACTTTCGG AACAGAGGCA TGACCGCCTT
 ACTGAAGGTT TCTAGTTGTG
 2881 ACAAGAACAC TGGTGATTAT TACGAGGACA GTTATGAAGA
 TATTTTCAGCA TACTTGCTGA
 2941 GTAAAAACAA TGCCATTGAA CCAAGAAGCT TCTCTCAAAA
 CCCACCAGTC TTGAAACGCC
 3001 ATCAACGGGA AATAACTCGT ACTACTCTTC AGTCAGATCA
 AGAGGAAAT GACTATGATG
 3061 ATACCATATC AGTTGAAATG AAGAAGGAAG ATTTTGACAT
 TTATGATGAG GATGAAAATC
 3121 AGAGCCCCCG CAGCTTTCOA AAGAAAACAC GACACTATTT
 TATTGCTGCA GTGGAGAGGC
 3181 TCTGGGATTA TGGGATGAGT AGCTCCCCAC ATGTTCTAAG
 AAACAGGGCT CAGAGTGGCA
 3241 GTGTCCCTCA GTTCAAGAAA GTTGTTTTCC AGGAATTTAC
 TGATGGCTCC TTTACTCAGC
 3301 CTTTATACCG TGGAGAACTA AATGAACATT TGGGACTCCT
 GGGGCCATAT ATAAGAGCAG
 3361 AAGTTGAAGA TAATATCATG GTAACCTTCA GAAATCAGGC
 CTCTCGTCCC TATTCCTTCT
 3421 ATTCTAGCCT TATTTCTTAT GAGGAAGATC AGAGGCAAGG
 AGCAGAACCT AGAAAAAAT
 3481 TTGTCAAGCC TAATGAAACC AAAACTTACT TTTGGAAAGT
 GCAACATCAT ATGGCACCCA
 3541 CTAAAGATGA GTTTGACTGC AAAGCCTGGG CTTATTTCTC
 TGATGTTGAC CTGGAAAAAG
 3601 ATGTGCACTC AGGCCTGATT GGACCCCTTC TGGTCTGCCA
 CACTAACACA CTGAACCCTG
 3661 CTCATGGGAG ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT
 TTTACCATC TTTGATGAGA
 3721 CAAAAGCTG GTACTTCACT GAAAATATGG AAAGAACTG
 CAGGGCTCCC TGCAATATCC
 3781 AGATGGAAGA TCCCCTTTT AAAGAGAATT ATCGCTTCCA
 TGCAATCAAT GGCTACATAA
 3841 TGGATACACT ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG
 GATTCGATGG TATCTGCTCA
 3901 GCATGGGCAG CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTTCA
 TGGACATGTG TTCACTGTAC
 3961 GAAAAAAGA GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA
 TCCAGGTGTT TTTGAGACAG
 4021 TGGAAATGTT ACCATCCAAA GCTGGAATTT GGCGGGTGGG
 ATGCCTTATT GGCGAGCATC
 4081 TACATGCTGG GATGAGCACA CTTTTTCTGG TGTACAGCAA
 TAAGTGTGAG ACTCCCCTGG
 4141 GAATGGCTTC TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC
 TTCAGGACAA TATGGACAGT
 4201 GGGCCCCAAA GCTGGCCAGA CTTTATTATT CCGGATCAAT
 CAATGCCTGG AGCACCAAGG
 4261 AGCCCTTTTC TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACCAAT
 GATTATTAC GGCATCAAGA

```

4321 CCCAGGGTGC CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC
      TCAGTTTATC ATCATGTATA
4381 GTCTTGATGG GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC
      CACTGGAACC TTAATGGTCT
4441 TCTTTGGCAA TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT
      TTTTAAACCCT CCAATTATTG
4501 CTCGATACAT CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCG
      CAGCACTCTT CGCATGGAGT
4561 TGATGGGCTG TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG
      AATGGAGAGT AAAGCAATAT
4621 CAGATGCACA GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT
      GTTTGCCACC TGGTCTCCTT
4681 CAAAAGCTCG ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG
      GAGACCTCAG GTGAATAATC
4741 CAAAAGAGTG GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA
      AGTCACAGGA GTAACACTC
4801 AGGGAGTAAA ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA
      GTTCCTCATC TCCAGCAGTC
4861 AAGATGGCCA TCAGTGGACT CTCTTTTTTC AGAATGGCAA
      AGTAAAGGTT TTTCAGGGAA
4921 ATCAAGACTC STTCACACCT GTGGTGAACT CTCTAGACCC
      ACCGTACTG ACTCGCTACC
4981 TTCGAATTCA CCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT
      GAGGATGGAG GTTCTGGGCT
5041 GCGAGGCACA GGACCTCTAC

```

* Подчеркнутые нуклеиновые кислоты кодируют сигнальный пептид.

"FVIII с делецией В-домена" может содержать полные или частичные делеции, описанные в патентах США № 6316226, 6346513, 7041635, 5789203, 6060447, 5595886, 6228620, 5972885, 6048720, 5543502, 5610278, 5171844, 5112950, 4868112 и 6458563. В некоторых вариантах реализации последовательность FVIII с делецией В-домена согласно настоящему изобретению содержит любую из делеций, описанных в 4 колонке, 4 строке - 5 колонке, 28 строке и примерах 1-5 патента США № 6316226 (также в US 6346513). В другом варианте реализации фактор VIII с делецией В-домена представляет собой фактор VIII с делецией В-домена S743/Q1638 (SQ BDD FVIII) (например, фактор VIII, содержащий делецию с аминокислоты 744 по аминокислоту 1637, например фактор VIII, содержащий аминокислоты 1-743 и аминокислоты 1638-2332 последовательности SEQ ID NO: 4, т.е. SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах реализации FVIII с делецией В-домена согласно настоящему изобретению содержит делецию, описанную во 2 колонке, 26-51 строках и примерах 5-8 патента США № 5789203 (также US 6060447, US 5595886 и US 6228620). В некоторых вариантах реализации фактор VIII с делецией В-домена содержит делецию, описанную в 1 колонке, 25 строке - 2 колонке, 40 строке патента США № 5972885; 6 колонке, 1-22 строках и примере 1 патента США № 6048720; 2 колонке, 17-46 строках патента США № 5543502; 4 колонке, 22 строке - 5 колонке, 36 строке патента США № 5171844; 2 колонке, 55-68 строках, фиг. 2 и примере 1 патента США № 5112950; 2 колонке, 2 строке - 19 колонке, 21 строке и табл. 2 патента США № 4868112; 2 колонке, 1 строке - 3 колонке, 19 строке, 3 колонке, 40 строке - 4 колонке, 67 строке, 7 колонке, 43 строке - 8 колонке, 26 строке и 11 колонке, 5 строке - 13 колонке, 39 строке патента США № 7041635; или 4 колонке, 25-53 строках патента США № 6458563. В некоторых вариантах реализации FVIII с делецией В-домена содержит делецию большей части домена В, но по-прежнему содержит аминоконцевые последовательности домена В, которые необходимы для протеолитического процессинга *in vivo* первичного продукта трансляции с образованием двух полипептидных цепей, как описано в WO 91/09122. В некоторых вариантах реализации получен FVIII с делецией В-домена с делецией аминокислот 747-1638, т.е. практически с полной делецией домена В. Hoenen, R.C. et al., J. Biol. Chem., 265(13):7318-7323 (1990). Фактор VIII с делецией В-домена также может содержать делецию аминокислот 771-1666 или аминокислот 868-1562 FVIII. Meulien, P. et al., Protein Eng., 2(4):301-6 (1988). Дополнительные делеции домена В, которые являются частью настоящего изобретения, включают делецию аминокислот с 982 по 1562 или с 760 по 1639 (Toole et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1986), 83, 5939-5942), с 797 по 1562 (Eaton, et al., Biochemistry (1986), 25:8343-8347), с 741 по 1646 (Kaufman (опубликованная заявка PCT № WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver et al., DNA (1987), 6:553-564), с 741 по 1648 (Pasek (опубликованная заявка PCT № 88/00831)) или с 816 по 1598, или с 741 по 1648 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988), № 82:16-25, EP 295597)). В других вариантах реализации BDD FVIII включает полипептид FVIII, содержащий фрагменты В-домена, сохраняющие один или более сайтов N-связанного гликозилирования, например, остатки 757, 784, 828, 900, 963 или, возможно, 943, которые соответствуют аминокислотной последовательности полноразмерной последовательности FVIII. Примеры фрагментов В-домена включают 226 аминокислот или 163 аминокислоты В-домена, описанные в Miao, H.Z. et al., Blood, 103(a):3412-3419 (2004), Kasuda, A. et al., J. Thromb. Haemost., 6:1352-1359 (2008); и Pipe, S.W. et al., J. Thromb. Haemost.,

9:2235-2242 (2011) (т.е. первые 226 аминокислот или 163 аминокислоты домена В сохраняются). В других вариантах реализации BDD FVIII содержит также точечную мутацию в остатке 309 (от Phe к Ser) для улучшения экспрессии белка BDD FVIII. См. Miao, H.Z. et al., Blood, 103(a):3412-3419 (2004). В других вариантах реализации BDD FVIII включает полипептид FVIII, содержащий часть В-домена, но не содержащий один или более сайтов расщепления фурином (например, Arg1313 и Arg1648). См. Pipe, S.W. et al., J. Thromb. Haemost., 9:2235-2242 (2011). Каждая из вышеуказанных делеций может быть произведена в любой последовательности FVIII.

В некоторых вариантах реализации FVIII содержит частичный В-домен. В некоторых вариантах реализации белок FVIII, содержащий частичный В-домен, представляет собой FVIII198 (SEQ ID NO: 89). FVIII198 представляет собой содержащую частичный В-домен одноцепочечную молекулу FVIII_{Fc}-226N6. 226 представляет собой N-концевую аминокислоту 226 В-домена FVIII, и N6 представляет собой шесть сайтов N-гликозилирования в В-доме.

В одном из вариантов реализации FVIII расщепляется сразу после аргинина в аминокислоте 1648 (в полноразмерном факторе VIII или SEQ ID NO: 4), аминокислоте 754 (в факторе VIII с делецией В-домена S743/Q1638 или SEQ ID NO: 6) или соответствующем остатке аргинина (в других вариантах), что тем самым приводит к образованию тяжелой цепи и легкой цепи. В другом варианте реализации FVIII содержит тяжелую цепь и легкую цепь, которые связаны или ассоциированы нековалентной связью, опосредуемой ионом металла.

В других вариантах реализации FVIII представляет собой одноцепочечный FVIII, который не был расщеплен сразу после аргинина в аминокислоте 1648 (в полноразмерном FVIII или SEQ ID NO: 4), аминокислоте 754 (в FVIII с делецией В-домена S743/Q1638 или SEQ ID NO: 6) или соответствующем остатке аргинина (в других вариантах). Одноцепочечный FVIII может содержать одну или более замен аминокислот. В одном из вариантов реализации замена аминокислоты находится в остатке, соответствующем остатку 1648, остатку 1645 или обоим в полноразмерном зрелом полипептиде FVIII (SEQ ID NO: 4), или остатку 754, остатку 751 или обоим в SQ BDD факторе VIII (SEQ ID NO: 6). Замена аминокислоты может представлять собой любые аминокислоты, отличные от аргинина, например изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, треонин, триптофан, валин, аланин, аспарагин, аспарагиновую кислоту, цистеин, глутаминовую кислоту, глутамин, глицин, пролин, селеноцистеин, серин, тирозин, гистидин, орнитин, пирролизин или таурин.

FVIII также может расщепляться тромбином, а затем активироваться в виде FVIII_a, служащего в качестве кофактора для активированного фактора IX (FIX_a). И активированный FIX совместно с активированным FVIII образует комплекс Xase и превращает фактор X в активированный фактор X (FX_a). Для активации FVIII расщепляется тромбином после трех остатков аргинина, в аминокислотах 372, 740 и 1689 (соответствующих аминокислотам 372, 740 и 795 в последовательности FVIII с делецией В-домена); в результате данного расщепления образуется FVIII_a, содержащий цепи A1 50 кДа, A2 43 кДа и A3-C1-C2 73 кДа. В одном из вариантов реализации белок FVIII, подходящий для настоящего изобретения, представляет собой неактивный FVIII. В другом варианте реализации белок FVIII представляет собой активированный FVIII.

Белок, содержащий полипептид FVIII, связанный или ассоциированный с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, может содержать последовательность, по меньшей мере на 50, 60, 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную SEQ ID NO: 4 или 6, при этом указанная последовательность обладает свертывающей активностью FVIII, например активирует фактор IX в качестве кофактора для превращения фактора X в активированный фактор X (FX_a).

В настоящем описании термин "гибридные" или "химерные" полипептиды и белки включает комбинацию первой полипептидной цепи, например, VWFфрагмента фактора фон Виллебранда, возможно слитого с первой константной областью Ig или ее частью, со второй полипептидной цепью, например белком FVIII, связанным с последовательностью XTEN, возможно слитой со второй константной областью Ig или ее частью, тем самым образуя гетеродимер. В одном из вариантов реализации первый полипептид и второй полипептид в гибриде ассоциированы друг с другом за счет белок-белковых взаимодействий, таких как взаимодействия заряд-заряд или гидрофобные взаимодействия. В другом варианте реализации первый полипептид и второй полипептид в гибриде ассоциированы друг с другом дисульфидной или другой ковалентной(ыми) связью(ями). Гибриды описаны, например, в US 2004/101740 и US 2006/074199. Второй полипептид может представлять собой идентичную копию первого полипептида или неидентичный полипептид. В одном из вариантов реализации первый полипептид представляет собой гибридный белок FVIII-белок(X)-Fc, а второй полипептид представляет собой полипептид, содержащий, по существу состоящий из или состоящий из области Fc, при этом первый полипептид и второй полипептид ассоциированы друг с другом. В другом варианте реализации первый полипептид содержит гибридный белок VWFфрагмент фактора фон Виллебранда-XTEN-Fc, а второй полипептид содержит гибридный белок FVIII-Fc, образующие гибрид - гетеродимер. В других вариантах реализации первый полипептид содержит гибридный белок VWFфрагмент фактора фон Виллебранда-Fc, а второй полипептид содержит гибридный белок FVIII(X)-Fc, образующие гибрид - гетеродимер. В других вариантах реализации первый полипептид содержит гибридный белок VWFфрагмент фактора фон Виллебранда-XTEN-Fc, а второй

полипептид содержит гибридный белок FVIII(X)-Fc. Первый полипептид и второй полипептид могут быть ассоциированы ковалентной связью, например дисульфидной связью между первой областью Fc и второй областью Fc. Первый полипептид и второй полипептид также могут быть ассоциированы друг с другом путем образования связи между VWFфрагментом фактора фон Виллебранда и белком FVIII.

Белок FVIII, подходящий для настоящего изобретения, может включать FVIII, содержащий одну или более дополнительных последовательностей XTEN, которые не влияют на коагулирующую активность FVIII. Такие последовательности XTEN могут быть слиты с С-концом или N-концом белка FVIII, или встроены между одним или более из двух аминокислотных остатков в белке FVIII, при этом данные встраивания не влияют на коагулирующую активность FVIII или функцию FVIII. В одном из вариантов реализации указанные встраивания улучшают фармакокинетические свойства белка FVIII (например, период полувыведения). В другом варианте реализации встраивания могут представлять собой многочисленные встраивания, например, больше двух, трех, четырех, пяти, шести, семи, восьми, девяти или десяти встраиваний. Примеры сайтов встраивания включают, но не ограничиваются перечисленными: сайты, перечисленные в табл. 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, или их любые комбинации.

Белок FVIII, связанный с одной или более последовательностями XTEN, может быть представлен в виде FVIII(X), FVIII(X1), FVIII_(a→b)-X-FVIII_(c→d), где FVIII_(a→b);

содержит, по существу состоит из или состоит из первой части белка FVIII от аминокислотного остатка "a" до аминокислотного остатка "b";

X или XI содержит, по существу состоит из или состоит из одной или более последовательностей XTEN, FVIII_(c→d) содержит, по существу состоит из или состоит из второй части белка FVIII от аминокислотного остатка "c" до аминокислотного остатка "d";

a представляет собой N-концевой аминокислотный остаток первой части белка FVIII;

b представляет собой C-концевой аминокислотный остаток первой части белка FVIII, а также представляет собой N-концевой аминокислотный остаток двух аминокислот сайта встраивания, в который встроена последовательность XTEN;

c представляет собой N-концевой аминокислотный остаток второй части белка FVIII, а также представляет собой C-концевой аминокислотный остаток двух аминокислот сайта встраивания, в который встроена последовательность XTEN; и

d представляет собой C-концевой аминокислотный остаток белка FVIII,

при этом первая часть белка FVIII и вторая часть белка FVIII не идентичны друг другу и вместе имеют достаточную длину, в результате чего указанный белок FVIII обладает коагулирующей активностью FVIII.

В одном из вариантов реализации первая часть белка FVIII и вторая часть белка FVIII представляют собой фрагменты SEQ ID NO: 4 [полноразмерная последовательность зрелого FVIII] или SEQ ID NO: 6 [FVIII с делецией В-домена], например N-концевую часть и C-концевую часть соответственно. В некоторых вариантах реализации первая часть белка FVIII содержит домен A1 и домен A2 белка FVIII. Вторая часть белка FVIII содержит домен A3, домен C1 и, возможно, домен C2. В других вариантах реализации первая часть белка FVIII содержит домен A1 и домен A2, а вторая часть белка FVIII содержит часть домена В, домен A3, домен C1 и возможно домен C2. В других вариантах реализации первая часть белка FVIII содержит домен A1, домен A2 и часть домена В белка FVIII, а вторая часть белка FVIII содержит домен A3, домен C1 и возможно домен C2. В других вариантах реализации первая часть белка FVIII содержит домен A1, домен A2 и первую часть домена В белка FVIII. Вторая часть белка FVIII содержит вторую часть домена В, домен A3, домен C1 и возможно домен C2. В некоторых вариантах реализации две аминокислоты ("b" и "c") могут представлять собой любой один или более аминокислотных остатков сайтов встраивания, представленных в табл. 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15. Например, "b" может представлять собой аминокислотный остаток непосредственно выше сайта, в который встроена или с которым связана одна или более последовательностей XTEN, и "c" может представлять собой аминокислотный остаток непосредственно ниже сайта, в который встроена или с которым связана одна или более последовательностей XTEN. В некоторых вариантах реализации "a" представляет собой первую зрелую аминокислотную последовательность белка FVIII, и "d" представляет собой последнюю аминокислотную последовательность белка FVIII. Например, FVIII_(a→b) может представлять собой аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотам с 1 по 745 последовательности SEQ ID NO: 6 [аминокислотная последовательность FVIII с делецией В-домена] или последовательности SEQ ID NO: 4 [полноразмерный FVIII], и FVIII_(c→d) может представлять собой аминокислоты с 746 по 1438 последовательности SEQ ID NO: 6 или аминокислоты с 1641 по 2332 последовательности SEQ ID NO: 4 соответственно. В соответствии с некоторыми аспектами сайт встраивания в белке FVIII располагается в одном или более доменах белка FVIII, которые представляют собой N-конец, домен A1, домен A2, домен A3, домен В, домен C1, домен C2, С-конец или их две или более комбинаций, или между двумя доменами белка FVIII, которые представляют собой домен A1 и кислотную область a1, и кислотную область a1 и домен A2, домен A2 и кислотную область a2, кислотную область a2 и домен В, домен В и домен A3, и домен A3 и домен C1, домен C1 и домен C2 или их

любые комбинации. Например, сайты встраивания, в которые может быть встроена последовательность XTEN, выбраны из группы, состоящей из N-конца и домена A1, N-конца и домена A2, N-конца и домена A3, N-конца и домена B, N-конца и домена C1, N-конца и домена C2, N-конца и C-конца, доменов A1 и A2, доменов A1 и A3, доменов A1 и B, доменов A1 и C1, доменов A1 и C2, домена A1 и C-конца, доменов A2 и A3, доменов A2 и B, доменов A2 и C1, доменов A2 и C2, домена A2 и C-конца, доменов A3 и B, доменов A3 и C1, доменов A3 и C2, домена A3 и C-конца, доменов B и C1, доменов B и C2, домена B и C-конца, доменов C1 и C2, C1 и C-конца, домена C2 и C-конца, и их двух или более комбинаций. Неограничивающие примеры сайтов встраивания перечислены в табл. 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15.

Белок FVIII, в котором последовательность XTEN встроена непосредственно ниже одной или более аминокислот (например, один или более сайтов встраивания XTEN) в белке FVIII или связана с C-концом или N-концом, сохраняет активность FVIII после связывания или встраивания последовательности XTEN. Последовательность XTEN может быть встроена в белок FVIII один раз или более одного раза, два раза, три раза, четыре раза, пять раз или шесть раз так, чтобы указанные встраивания не влияли на активность FVIII (т.е. белок FVIII по-прежнему сохранял коагулирующее свойство).

Белок FVIII, подходящий для настоящего изобретения, может быть связан с одним или более полипептидами XTEN на N-конце или C-конце белка FVIII необязательным линкером, или указанные полипептиды могут быть встроены непосредственно ниже одной или более аминокислот (например, один или более сайтов встраивания XTEN) в белке FVIII с помощью одного или более необязательных линкеров. В одном из вариантов реализации два аминокислотных остатка, в которые встроена последовательность XTEN, или аминокислотный остаток, с которым связана последовательность XTEN, соответствуют двум или одному аминокислотному остатку последовательности SEQ ID NO: 4 [полноразмерный зрелый FVIII], выбранному из группы, состоящей из остатков в табл. 7, 8, 9 и 10, и их любых комбинаций.

В других вариантах реализации по меньшей мере одна последовательность XTEN встроена в любом одном или более сайтах встраивания XTEN, описанных в настоящем документе, или их любых комбинациях. В соответствии с одним из аспектов по меньшей мере одна последовательность XTEN встроена в одном или более сайтах встраивания XTEN, описанных в табл. 7.

Таблица 7

Типичные сайты встраивания XTEN

№.	Точка встраивания XTEN*	Остаток встраивания	Нижележащая последовательность BDD FVIII	Домен FVIII
1	0	(N-конец)	ATR	A1
2	3	R	RYY	A1
3	17	M	QSD	A1
4	18	Q	SDL	A1
5	22	G	ELP	A1
6	24	L	PVD	A1
7	26	V	DAR	A1
8	28	A	RFP	A1
9	32	P	RVP	A1
10	38	F	PFN	A1
11	40	F	NTS	A1
12	41	N	TSV	A1
13	60	N	IAK	A1
14	61	I	AKP	A1
15	65	R	PPW	A1
16	81	Y	DTV	A1
17	111	G	AEY	A1
18	116	D	QTS	A1
19	119	S	QRE	A1
20	120	Q	REK	A1
21	128	V	FPG	A1
22	129	F	PGG	A1
23	130	P	GGG	A1
24	182	G	SLA	A1
25	185	A	KEK	A1
26	188	K	TQT	A1
27	205	G	KSW	A1
28	210	S	ETK	A1
29	211	E	TKN	A1
30	216	L	MQD	A1

31	220	R	DAA	A1
32	222	A	ASA	A1
33	223	A	SAR	A1
34	224	S	ARA	A1
35	230	K	MHT	A1
36	243	P	GLI	A1
37	244	G	LIG	A1
38	250	R	KSV	A1
39	318	D	GME	A1
40	333	P	QLR	A1
42	334	Q	LRM	A1
43	336	R	MKN	a1
44	339	N	NEE	a1
45	345	D	YDD	a1
46	357	V	VRF	a1
47	367	S	FIQ	a1
48	370	S	RPY	a1
49	375	A	KKH	A2
50	376	K	KHP	A2
51	378	H	PKT	A2
52	399	V	LAP	A2
53	403	D	DRS	A2
54	405	R	SYK	A2
55	409	S	QYL	A2
56	416	P	QRI	A2
57	434	E	TFK	A2
58	438	T	REA	A2
59	441	A	IQH	A2
60	442	I	QHE	A2
61	463	I	IFK	A2
62	487	Y	SRR	A2
63	490	R	LPK	A2
64	492	P	KGV	A2
65	493	K	GVK	A2
66	494	G	VKH	A2
67	500	D	FPI	A2
68	506	G	EIF	A2
69	518	E	DGP	A2
70	556	K	ESV	A2
71	565	Q	IMS	A2
72	566	I	MSD	A2
73	598	P	AGV	A2
74	599	A	GVQ	A2
75	603	L	EDP	A2
76	616	S	ING	A2
77	686	G	LWI	A2
78	713	K	NTG	A2
79	719	Y	EDS	A2
80	730	L	LSK	A2
81	733	K	NNA	A2
82	745	N	PPV**	B
83	1640	P	PVL	B
84	1652	R	TTL	B
85	1656	Q	SDQ	A3
86	1685	N	QSP	A3
87	1711	M	SSS	A3
88	1713	S	SPH	A3
89	1720	N	RAQ	A3
90	1724	S	GSV	A3
91	1725	G	SVP	A3
92	1726	S	VPQ	A3
93	1741	G	SFT	A3
94	1744	T	QPL	A3
95	1749	R	GEL	A3
96	1773	V	TFR	A3
97	1792	Y	EED	A3
98	1793	E	EDQ	A3
99	1796	Q	RQG	A3

100	1798	Q	GAE	A3
101	1799	G	AEP	A3
102	1802	P	RKN	A3
103	1803	R	KNF	A3
104	1807	V	KPN	A3
105	1808	K	PNE	A3
106	1827	K	DEF	A3
107	1844	E	KDV	A3
108	1861	N	TLN	A3
109	1863	L	NPA	A3
110	1896	E	RNC	A3
111	1900	R	APC	A3
112	1904	N	IQM	A3
113	1905	I	QME	A3
114	1910	P	TFK	A3
115	1920	A	ING	A3
116	1937	D	QRI	A3
117	1981	G	VFE	A3
118	2019	N	KCQ	A3
119	2020	K	CQT	C1
120	2044	G	QWA	C1
121	2068	F	SWI	C1
122	2073	V	DLL	C1
123	2090	R	QKF	C1
124	2092	K	FSS	C1
125	2093	F	SSL	C1
126	2111	K	WQT	C1
127	2115	Y	RGH	C1
128	2120	T	GTL	C1
129	2125	V	FFG	C1
130	2171	L	NSC	C1
131	2173	S	CSM	C2
132	2188	A	QIT	C2
133	2223	V	NNP	C2
134	2224	N	NPK	C2
135	2227	K	EWL	C2
136	2268	G	HQW	C2
137	2277	N	GKV	C2
138	2278	G	KVK	C2
139	2290	F	TPV	C2
140	2332	Y	C-конец FVIII	CT

* Показывает точку встраивания XTEN на основе номера аминокислоты в зрелом полномерном FVIII человека, при этом указанное встраивание может происходить либо в N-, либо в C-концевой части указанной аминокислоты.

В некоторых вариантах реализации одна или более последовательностей XTEN встроены в пределах примерно шести аминокислот выше или ниже аминокислот 32, 220, 224, 336, 339, 399, 416, 603, 1656, 1711, 1725, 1905 или 1910, соответствующих последовательности SEQ ID NO: 4, или их любых комбинаций.

Таблица 8

Типичные диапазоны встраивания XTEN

№.	Точка встраивания XTEN*	Остаток встраивания	Нижележащая последовательность BDD FVIII	Домен FVIII	Отдаленность от остатка встраивания*
9	32	P	RVP	A1	-3, +6
31	220	R	DAA	A1	-
34	224	S	ARA	A1	+5
43	336	R	MKN	a1	-1, +6
44	339	N	NEE	a1	-4, +5
52	399	V	LAP	A2	-6, +3
56	416	P	QRI	A2	+6
75	603	L	EDP	A2	-6, +6
85	1656	Q	SDQ	B	-3, +6
87	1711	M	SSS	A3	-6, +1
91	1725	G	SVP	A3	+6
113	1905	I	QME	A3	+6
114	1910	P	TFK	A3	-5, +6

* Отдаленность от остатка встраивания относится к относительному числу аминокислот от N-конца (отрицательные числа) или C-конца (положительные числа).

ные числа) обозначенного остатка встраивания (остаток "0"), где может быть произведено встраивание.

Обозначение "-х" относится к сайту встраивания, который расположен на х аминокислот в сторону на N-концевой части обозначенного остатка встраивания. Подобным образом, обозначение "+х" относится к сайту встраивания, который расположен на х аминокислот в сторону на С-концевой части обозначенного остатка встраивания.

Например, "-1, +2" означает, что встраивание произведено на N-конце или С-конце аминокислотных остатков, обозначенных -1, 0, +1 или +2.

В других вариантах реализации одна или более последовательностей ХТЕН встроены непосредственно ниже одной или более аминокислот, соответствующих полноразмерному зрелому FVIII человека, выбранных из группы, состоящей из одного или более сайтов встраивания в табл. 9.

Таблица 9

Типичные сайты или диапазоны встраивания ХТЕН

№.	Диапазон точек встраивания ХТЕН *	Первый остаток встраивания	Домен FVIII
3	18-32	Q	A1
8	40	F	A1
18	211-224	E	A1
27	336-403	R	A1, A2
43	599	A	A2
47	745-1640	N	B
50	1656-1728	Q	B, a3, A3
57	1796-1804	R	A3
65	1900-1912	R	A3
81	2171-2332	L	C1, C2

* Показывает диапазон сайтов встраивания, пронумерованных относительно номера аминокислоты зрелого FVIII человека.

В других вариантах реализации одна или более ХТЕН встроены в домен В FVIII. В одном из примеров ХТЕН встроена между аминокислотами 740 и 1640, соответствующими SEQ ID NO: 4, при этом последовательность FVIII между аминокислотами 740 и 1640 возможно не присутствует. В другом примере ХТЕН встроена между аминокислотами 741 и 1690, соответствующими SEQ ID NO: 4, при этом последовательность FVIII между аминокислотами 740 и 1690 возможно не присутствует. В других примерах ХТЕН встроена между аминокислотами 741 и 1648, соответствующими SEQ ID NO: 4, при этом последовательность FVIII между аминокислотами 741 и 1648 возможно не присутствует. В других примерах ХТЕН встроена между аминокислотами 743 и 1638, соответствующими SEQ ID NO: 4, при этом последовательность FVIII между аминокислотами 743 и 1638 возможно не присутствует. В других примерах ХТЕН встроена между аминокислотами 745 и 1656, соответствующими SEQ ID NO: 4, при этом последовательность FVIII между аминокислотами 745 и 1656 возможно не присутствует. В некоторых примерах ХТЕН встроена между аминокислотами 745 и 1657, соответствующими SEQ ID NO: 4, при этом последовательность FVIII между аминокислотами 745 и 1657 возможно не присутствует. В некоторых примерах ХТЕН встроена между аминокислотами 745 и 1667, соответствующими SEQ ID NO: 4, при этом последовательность FVIII между аминокислотами 745 и 1667 возможно не присутствует. В других примерах ХТЕН встроена между аминокислотами 745 и 1686, соответствующими SEQ ID NO: 4, при этом последовательность FVIII между аминокислотами 745 и 1686 возможно не присутствует. В некоторых других примерах ХТЕН встроена между аминокислотами 747 и 1642, соответствующими SEQ ID NO: 4, при этом последовательность FVIII между аминокислотами 747 и 1642 возможно не присутствует. В других примерах ХТЕН встроена между аминокислотами 751 и 1667, соответствующими SEQ ID NO: 4, при этом последовательность FVIII между аминокислотами 751 и 1667 возможно не присутствует.

В некоторых вариантах реализации одна или более ХТЕН встроены в одну или более аминокислот непосредственно ниже аминокислоты сайта встраивания, выбранного из группы, состоящей из аминокислотных остатков в табл. 10.

Сайты встраивания XTEN FVIII и обозначения конструкций

Номер конструкции	Домен	№ вышележащего остатка*	№ нижележащего остатка*	Вышележащая последовательность	Нижележащая последовательность
F8X-1	A1	3	4	ATR	RYY
F8X-2	A1	18	19	YMQ	SDL
F8X-3	A1	22	23	DLG	ELP
F8X-4	A1	26	27	LPV	DAR
F8X-5	A1	40	41	FPF	NTS
F8X-6	A1	60	61	LFN	IAK
F8X-7	A1	116	117	YDD	QTS
F8X-8	A1	130	131	VFP	GGG
F8X-9	A1	188	189	KEK	TQT
F8X-10	A1	216	217	NSL	MQD
F8X-11	A1	230	231	WPK	MHT
F8X-12	A1	333	334	EEP	QLR
F8X-13	A2	375	376	SVA	KKH
F8X-14	A2	403	404	APD	DRS
F8X-15	A2	442	443	EAI	QHE
F8X-16	A2	490	491	RRL	PKG
F8X-17	A2	518	519	TVE	DGP
F8X-18	A2	599	600	NPA	GVQ
F8X-19	A2	713	714	CDK	NTG
F8X-20	BD	745	746	SQN	PPV
F8X-21	BD	745	746	SQN	PPV
F8X-22	BD**	745	746	SQN	PPV
F8X-23	A3	1720	1721	APT	KDE
F8X-24	A3	1796	1797	EDQ	RQG
F8X-25	A3	1802	1803	AEP	RKN
F8X-26	A3	1827	1828	PTK	DEF
F8X-27	A3	1861	1862	HTN	TLN
F8X-28	A3	1896	1897	NME	RNC
F8X-29	A3	1900	1901	NCR	APC
F8X-30	A3	1904	1905	PCN	IQM
F8X-31	A3	1937	1938	AQD	QRI
F8X-32	C1	2019	2020	YSN	KCQ
F8X-33	C1	2068	2069	EPF	SWI
F8X-34	C1	2111	2112	GKK	WQT
F8X-35	C1	2120	2121	NST	GTL
F8X-36	C2	2171	2172	CDL	NSC
F8X-37	C2	2188	2189	SDA	QIT
F8X-38	C2	2227	2228	NPK	EWL
F8X-39	C2	2277	2278	FQN	GKV

F8X-40	CT	2332	нет данных	DLY	NA
F8X-41	CT	2332	нет данных	DLY	NA
F8X-42	A1	3	4	ATR	ATR
pSD0001	A2	403	404		
pSD0002	A2	599	600		
pSD0021	N-кон.	0	1		
pSD0022	A1	32	33		
pSD0023	A1	65	66		
pSD0024	A1	81	82		
pSD0025	A1	119	120		
pSD0026	A1	211	212		
pSD0027	A1	220	221		
pSD0028	A1	224	225		
pSD0029	A1	336	337		
pSD0030	A1	339	340		
pSD0031	A2	378	379		
pSD0032	A2	399	400		
pSD0033	A2	409	410		
pSD0034	A2	416	417		
pSD0035	A2	487	488		
pSD0036	A2	494	495		
pSD0037	A2	500	501		
pSD0038	A2	603	604		
pSD0039	A3	1656	1657		
pSD0040	A3	1711	1712		
pSD0041	A3	1725	1726		
pSD0042	A3	1749	1750		
pSD0043	A3	1905	1906		
pSD0044	A3	1910	1911		
pDS0062	A3	1900	1901		

* Показывает номер аминокислоты зрелого белка FVIII.

В одном из вариантов реализации один или более сайтов встраивания XTEN расположены в пределах одной или более гибких петлеобразных структур белка FVIII с доступностью поверхностных групп (например, пермиссивная петля). Например, по меньшей мере одна последовательность XTEN может быть встроена в каждый домен "А" FVIII, содержащий по меньшей мере две "пермиссивных петли", в которые может быть встроены по меньшей мере один полипептид XTEN без устранения прокоагулянтной активности рекомбинантного белка или способности рекомбинантных белков экспрессироваться *in vivo* или *in vitro* в клетке-хозяине. Пермиссивные петли представляют собой области, которые допускают встраивание по меньшей мере одной последовательности XTEN, с высокой степенью доступности поверхностных групп или высокой степенью доступности для растворителей, и высокой конформационной гибкостью, среди других признаков. Домен А1 содержит область пермиссивной петли-1 (А1-1), и область пермиссивной петли-2 (А1-2), домен А2 содержит область пермиссивной петли-1 (А2-1) и область пермиссивной петли-2 (А2-2), домен А3 содержит область пермиссивной петли-1 (А3-1) и область пермиссивной петли-2 (А3-2). В соответствии с одним из аспектов первая пермиссивная петля в домене А1 (А1-1) FVIII расположена между бета-нитью 1 и бета-нитью 2, а вторая пермиссивная петля в домене А2 (А1-2) FVIII расположена между бета-нитью 11 и бета-нитью 12. Первая пермиссивная петля в домене А2 (А2-1) FVIII расположена между бета-нитью 22 и бета-нитью 23, а вторая пермиссивная петля в домене А2 (А2-2) FVIII расположена между бета-нитью 32 и бета-нитью 33. Первая пермиссивная петля в домене А3 (А3-1) FVIII расположена между бета-нитью 38 и бета-нитью 39, а вторая пермиссивная петля в А3 (А3-2) FVIII расположена между бета-нитью 45 и бета-нитью 46. В соответствии с некоторыми аспектами гибкая петлеобразная структура с доступностью поверхностных групп, содержащая А1-1, соответствует области в нативном зрелом FVIII человека от примерно аминокислоты 15 до примерно аминокислоты 45 последовательности SEQ ID NO: 4, например от примерно аминокислоты 18 до примерно аминокислоты 41 последовательности SEQ ID NO: 4. В соответствии с другими аспектами гибкая петлеобразная структура с доступностью поверхностных групп, содержащая А1-2, соответствует области в нативном зрелом FVIII человека от примерно аминокислоты 201 до примерно аминокислоты 232 последовательности SEQ ID NO: 4, например, от примерно аминокислоты 218 до примерно аминокислоты 229 последовательности SEQ ID NO: 4. В соответствии с другими аспектами гибкая петлеобразная структура с доступностью поверхностных групп, содержащая А2-1, соответствует области в нативном зрелом FVIII человека от примерно аминокислоты 395 до примерно аминокислоты 421 последовательности SEQ ID NO: 4, например от примерно аминокислоты 397 до примерно аминокислоты 418 последовательности SEQ ID NO: 4. В соответствии с другими аспектами гибкая петлеобразная структура с доступностью поверхностных групп,

содержащая A2-2, соответствует области в нативном зрелом FVIII человека от примерно аминокислоты 577 до примерно аминокислоты 635 последовательности SEQ ID NO: 4, например от примерно аминокислоты 595 до примерно аминокислоты 607 последовательности SEQ ID NO: 4. В соответствии с другими аспектами гибкая петлеобразная структура с доступностью поверхностных групп, содержащая A3-1, соответствует области в нативном зрелом FVIII человека от примерно аминокислоты 1705 до примерно аминокислоты 1732 последовательности SEQ ID NO: 4, например, от примерно аминокислоты 1711 до примерно аминокислоты 1725 последовательности SEQ ID NO: 4. В соответствии с другими аспектами гибкая петлеобразная структура с доступностью поверхностных групп, содержащая A3-2, соответствует области в нативном зрелом FVIII человека от примерно аминокислоты 1884 до примерно аминокислоты 1917 последовательности SEQ ID NO: 4, например, от примерно аминокислоты 1899 до примерно аминокислоты 1911 последовательности SEQ ID NO: 4.

В другом варианте реализации одна или более аминокислот, в которые встроена по меньшей мере одна последовательность XTEN, расположены в пределах домена a3, например аминокислоты с 1649 по 1689, соответствующие полноразмерному зрелому полипептиду FVIII. В конкретном варианте реализации последовательности XTEN встроена между аминокислотами 1656 и 1657 последовательности SEQ ID NO: 4 (полноразмерный зрелый FVIII). В конкретном варианте реализации белок FVIII, содержащий последовательность XTEN, встроенную непосредственно ниже аминокислоты 1656, соответствующей SEQ ID NO: 4, также содержит делецию с аминокислоты 745 по аминокислоту 1656, соответствующую SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах реализации один или более сайтов встраивания для одного или более встраиваний XTEN расположены непосредственно ниже одной или более аминокислот, выбранных из группы, состоящей из

- (1) аминокислоты 3,
- (2) аминокислоты 18,
- (3) аминокислоты 22,
- (4) аминокислоты 26,
- (5) аминокислоты 32,
- (6) аминокислоты 40,
- (7) аминокислоты 60,
- (8) аминокислоты 65,
- (9) аминокислоты 81,
- (10) аминокислоты 116,
- (11) аминокислоты 119,
- (12) аминокислоты 130,
- (13) аминокислоты 188,
- (14) аминокислоты 211,
- (15) аминокислоты 216,
- (16) аминокислоты 220,
- (17) аминокислоты 224,
- (18) аминокислоты 230,
- (19) аминокислоты 333,
- (20) аминокислоты 336,
- (21) аминокислоты 339,
- (22) аминокислоты 375,
- (23) аминокислоты 399,
- (24) аминокислоты 403,
- (25) аминокислоты 409,
- (26) аминокислоты 416,
- (26) аминокислоты 442,
- (28) аминокислоты 487,
- (29) аминокислоты 490,
- (30) аминокислоты 494,
- (31) аминокислоты 500,
- (32) аминокислоты 518,
- (33) аминокислоты 599,
- (34) аминокислоты 603,
- (35) аминокислоты 713,
- (36) аминокислоты 745,
- (37) аминокислоты 1656,
- (38) аминокислоты 1711,
- (39) аминокислоты 1720,
- (40) аминокислоты 1725,

- (41) аминокислоты 1749,
 (42) аминокислоты 1796,
 (43) аминокислоты 1802,
 (44) аминокислоты 1827,
 (45) аминокислоты 1861,
 (46) аминокислоты 1896,
 (47) аминокислоты 1900,
 (48) аминокислоты 1904,
 (49) аминокислоты 1905,
 (50) аминокислоты 1910,
 (51) аминокислоты 1937,
 (52) аминокислоты 2019,
 (53) аминокислоты 2068,
 (54) аминокислоты 2111,
 (55) аминокислоты 2120,
 (56) аминокислоты 2171,
 (57) аминокислоты 2188,
 (58) аминокислоты 2221,
 (59) аминокислоты 2277, и
 (60) двух или более комбинаций указанных кислот.

В одном из вариантов реализации белок FVIII, подходящий для настоящего изобретения, содержит две последовательности ХТЕН:

первую последовательность ХТЕН, встроенную в первый сайт встраивания ХТЕН; и
 вторую ХТЕН, встроенную во второй сайт встраивания ХТЕН.

Неограничивающие примеры первого сайта встраивания ХТЕН и второго сайта встраивания ХТЕН перечислены в табл. 11.

Таблица 11

Типичные сайты встраивания для двух ХТЕН

Встраивание 1		Встраивание 2	
Сайт встраивания	Домен	Сайт встраивания	Домен
745	B	2332	CT
26	A1	403	A2
40	A1	403	A2
18	A1	403	A2
26	A1	599	A2
40	A1	599	A2
18	A1	599	A2
1720	A3	1900	A3
1725	A3	1900	A3
1711	A3	1905	A3
1720	A3	1905	A3
1725	A3	1905	A3
1656	A3	26	A1
1656	A3	18	A1
1656	A3	40	A1
1656	A3	399	A2
1656	A3	403	A2
1656	A3	1725	A3
1656	A3	1720	A3
1900	A3	18	A1
1900	A3	26	A1
1900	A3	40	A1
1905	A3	18	A1
1905	A3	40	A1
1905	A3	26	A1
1910	A3	26	A1
18	A1	399	A2
26	A1	399	A2
40	A1	399	A2
18	A1	403	A2
1656	A3	1900	A3
1656	A3	1905	A3
1711	A3	40	A1
1711	A3	26	A1
1720	A3	26	A1
1720	A3	40	A1

1720	A3	18	A1
1725	A3	26	A1
1725	A3	40	A1
1725	A3	18	A1
1720	A3	403	A2
1720	A3	399	A2
1711	A3	403	A2
1720	A3	403	A2
1725	A3	403	A2
1725	A3	399	A2
1711	A3	403	A2
1900	A3	399	A2
1900	A3	403	A2
1905	A3	403	A2
1905	A3	399	A2
1910	A3	403	A2

Две XTEN, встроенные или связанные с белком FVIII, могут быть одинаковыми или разными. В некоторых вариантах реализации белок FVIII, подходящий для настоящего изобретения, содержит две последовательности XTEN, встроенные в белок FVIII:

первую последовательность XTEN, встроенную непосредственно ниже аминокислоты 745, соответствующей SEQ ID NO: 4; и

вторую последовательность XTEN, встроенную непосредственно ниже аминокислоты 2332, соответствующей SEQ ID NO: 4 (С-конец).

В других вариантах реализации первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 18, 26, 40, 1656 или 1720, соответствующей SEQ ID NO: 4, а вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 403, соответствующей SEQ ID NO: 4. В других вариантах реализации первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 18, 26 или 40, соответствующей SEQ ID NO: 4, а вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 599, соответствующей SEQ ID NO: 4. В других вариантах реализации первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1656, соответствующей SEQ ID NO: 4, а вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 18, 26, 40, 399, 403, 1725, 1720, 1900, 1905 или 2332, соответствующей SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах реализации первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1900, соответствующей SEQ ID NO: 4, а вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 18, 26 или 40, соответствующей SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах реализации первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 18, 26 или 40, соответствующей SEQ ID NO: 4, а вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 399, соответствующей SEQ ID NO: 4. В других вариантах реализации первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1720, соответствующей SEQ ID NO: 4, а вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 18, 26, или 40, соответствующей SEQ ID NO: 4. В других вариантах реализации первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1720, соответствующей SEQ ID NO: 4, а вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 18, соответствующей SEQ ID NO: 4. В конкретном варианте реализации белок FVIII содержит две последовательности XTEN:

первую последовательность XTEN, встроенную непосредственно ниже аминокислоты 745, соответствующей SEQ ID NO: 4; и

вторую последовательность XTEN, встроенную непосредственно ниже аминокислоты 2332, соответствующей SEQ ID NO: 4,

при этом указанный белок FVIII также содержит делецию с аминокислоты 745, соответствующей SEQ ID NO: 4, по аминокислоту 1685, соответствующую SEQ ID NO: 4, мутацию или замену в аминокислоте 1680, соответствующей SEQ ID NO: 4, например Y1680F, мутацию или замену в аминокислоте 1648, соответствующей SEQ ID NO: 4, например R1648A, или по меньшей мере две мутации или замены в аминокислоте 1648, соответствующей SEQ ID NO: 4, например R1648A, и аминокислоте 1680, соответствующей SEQ IDNO: 4, например Y1680F.

В конкретном варианте реализации белок FVIII содержит две последовательности XTEN:

первую последовательность XTEN, встроенную непосредственно ниже аминокислоты 1656, соответствующей SEQ ID NO: 4; и

вторую последовательность XTEN, встроенную непосредственно ниже аминокислоты 2332 последовательности SEQ ID NO: 4,

при этом указанный белок FVIII также содержит делецию с аминокислоты 745 по аминокислоту 1656, соответствующую SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах реализации белок FVIII содержит три последовательности XTEN:

первую последовательность XTEN, встроенную в первый сайт встраивания XTEN;

вторую последовательность XTEN, встроенную во второй сайт встраивания XTEN; и третью последовательность XTEN, встроенную в третий сайт встраивания XTEN.

Указанная первая, вторая или третья последовательности XTEN могут быть одинаковыми или разными. Указанный первый, второй и третий сайты встраивания могут быть выбраны из группы любого из сайтов встраивания, описанных в настоящем документе. В некоторых вариантах реализации белок FVIII, содержащий три последовательности XTEN, также может содержать мутацию или замену, например, аминокислоты 1648, соответствующей SEQ ID NO: 4, например R1648A. Например, неограничивающие примеры первого, второго и третьего сайтов встраивания XTEN перечислены в табл. 12.

Таблица 12

Типичные сайты встраивания для трех XTEN

Встраивание 1		Встраивание 2		Встраивание 3	
Сайт встраивания	Домен	Сайт встраивания	Домен	Сайт встраивания	Домен
26	A1	403	A2	1656	A3
26	A1	403	A2	1720	A3
26	A1	403	A2	1900	A3
26	A1	1656	A3	1720	A3
26	A1	1656	A3	1900	A3
26	A1	1720	A3	1900	A3
403	A2	1656	A3	1720	A3
403	A2	1656	A3	1900	A3
403	A2	1720	A3	1900	A3
1656	A3	1720	A3	1900	A3
745	B	1900		2332	CT
18	A1	745	B	2332	CT
26	A1	745	B	2332	CT
40	A1	745	B	2332	CT
18	A1	745	B	2332	CT
40	A1	745	B	2332	CT
403	A2	745	B	2332	CT
399	A2	745	B	2332	CT
1725	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	745	B	2332	CT
1711	A3	745	B	2332	CT
1900	A3	745	B	2332	CT
1905	A3	745	B	2332	CT
1910	A3	745	B	2332	CT

В некоторых вариантах реализации белок FVIII содержит три последовательности XTEN: первую последовательность XTEN, встроенную непосредственно ниже аминокислоты 26, соответствующей SEQ ID NO: 4, вторую последовательность XTEN, встроенную непосредственно ниже аминокислоты 403, соответствующей SEQ ID NO: 4, и третью последовательность XTEN, встроенную непосредственно ниже аминокислоты 1656, 1720 или 1900, соответствующей SEQ ID NO: 4. В других вариантах реализации первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 26, соответствующей SEQ ID NO: 4, вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1656, соответствующей SEQ ID NO: 4, а третья последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1720 или 1900, соответствующей SEQ ID NO: 4. В других вариантах реализации первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 26, соответствующей SEQ ID NO: 4, вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1720, соответствующей SEQ ID NO: 4, а третья последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1900, соответствующей SEQ ID NO: 4. В других вариантах реализации первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 403, соответствующей SEQ ID NO: 4, вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1656, соответствующей SEQ ID NO: 4, а третья последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1720 или 1900, соответствующей SEQ ID NO: 4. В других вариантах реализации первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 403 или 1656, соответствующей SEQ ID NO: 4, вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1720, соответствующей SEQ ID NO: 4, а третья последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 1900, соответствующей SEQ ID NO: 4. В других вариантах реализации первая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 18, 26, 40, 399, 403, 1711, 1720, 1725, 1900, 1905 или 1910, соответствующей SEQ ID NO: 4, вторая последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 745, соответствующей SEQ ID NO: 4, а третья последовательность XTEN встроена непосредственно ниже аминокислоты 2332, соответствующей SEQ ID NO: 4. В других вариантах реализации белок FVIII содержит четыре последовательности XTEN: первую последовательность XTEN, встроенную в первый сайт встраивания, вторую последовательность XTEN, встроенную во второй сайт встраивания, третью последовательность XTEN, встроенную в третий сайт встраивания, и четвертую последовательность XTEN, встроенную в четвертый сайт встраивания.

довательность ХТЕН, встроенную в третий сайт встраивания, и четвертую последовательность ХТЕН, встроенную в четвертый сайт встраивания. Указанная первая, вторая, третья и четвертая последовательности ХТЕН могут быть одинаковыми, разными или представлять собой их комбинации. В некоторых вариантах реализации белок FVIII, содержащий четыре последовательности ХТЕН, также может содержать мутацию или замену, например, аминокислоты 1648, соответствующей SEQ ID NO: 4, например R1648A. Неограничивающие примеры первого, второго, третьего и четвертого сайтов встраивания ХТЕН перечислены в табл. 13.

Таблица 13

Типичные сайты встраивания для четырех ХТЕН

Встраивание 1		Встраивание 2		Встраивание 3		Встраивание 4	
Сайт встраивания	Домен						
26	A1	403	A2	1656	a3	1720	A3
26	A1	403	A2	1656	a3	1900	A3
26	A1	403	A2	1720	A3	1900	A3
26	A1	1656	a3	1720	A3	1900	A3
403	A2	1656	a3	1720	A3	1900	A3
0040	A1	0403	A2	745	B	2332	CT
0040	A1	0403	A2	745	B	2332	CT
0018	A1	0409	A2	745	B	2332	CT
0040	A1	0409	A2	745	B	2332	CT
0040	A1	0409	A2	745	B	2332	CT
0018	A1	0409	A2	745	B	2332	CT
0040	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1720	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1900	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1900	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1900	A3	745	B	2332	CT
0040	A1	1900	A3	745	B	2332	CT
0040	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0040	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1905	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0040	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0026	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0040	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0018	A1	1910	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1720	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1720	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1720	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1720	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1720	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1900	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1905	A3	745	B	2332	CT

0409	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1905	A3	745	B	2332	CT
0409	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1910	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	1900	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	1905	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	1910	A3	745	B	2332	CT
1720	A3	1910	A3	745	B	2332	CT
0403	A2	1656	a3	1720	A3	2332	CT
0403	A2	1656	a3	1900	A3	2332	CT
0403	A2	1720	A3	1900	A3	2332	CT
1656	a3	1720	A3	1900	A3	2332	CT
0018	A1	0403	A2	1656	a3	2332	CT
0018	A1	0403	A2	1720	A3	2332	CT
0018	A1	0403	A2	1900	A3	2332	CT
0018	A1	1656	a3	1720	A3	2332	CT
0018	A1	1656	a3	1900	A3	2332	CT
0018	A1	1720	A3	1900	A3	2332	CT
0018	A1	0403	A2	0745	B	2332	CT
0018	A1	0745	B	1720	A3	2332	CT
0018	A1	0745	B	1900	A3	2332	CT
0403	A2	0745	B	1720	A3	2332	CT
0403	A2	0745	B	1900	A3	2332	CT
0745	B	1720	A3	1900	A3	2332	CT
0188	A1	1900	A3	0745	B	2332	CT
0599		1900	A3	0745	B	2332	CT
2068		1900	A3	0745	B	2332	CT
2171		1900	A3	0745	B	2332	CT
2227		1900	A3	0745	B	2332	CT
2277		1900	A3	0745	B	2332	CT

В некоторых вариантах реализации белок FVIII содержит пять последовательностей XTEN: первую последовательность XTEN, встроенную в первый сайт встраивания; вторую последовательность XTEN, встроенную во второй сайт встраивания; третью последовательность XTEN, встроенную в третий сайт встраивания; четвертую последовательность XTEN, встроенную в четвертый сайт встраивания; и пятую последовательность XTEN, встроенную в пятый сайт встраивания.

Указанная первая, вторая, третья, четвертая и пятая последовательности XTEN могут быть одинаковыми, разными или представлять собой их комбинации. Неограничивающие примеры первого, второго, третьего, четвертого и пятого сайтов встраивания XTEN перечислены в табл. 14.

Таблица 14

Типичные сайты встраивания для пяти XTEN

Встраивание XTEN 1	Встраивание XTEN 2	Встраивание XTEN 3	Встраивание XTEN 4	Встраивание XTEN 5
0403	1656	1720	1900	2332
0018	0403	1656	1720	2332
0018	0403	1656	1900	2332
0018	0403	1720	1900	2332
0018	1656	1720	1900	2332
0018	0403	0745	1720	2332
0018	0403	0745	1900	2332
0018	0745	1720	1900	2332
0403	0745	1720	1900	2332

В некоторых вариантах реализации белок FVIII содержит шесть последовательностей XTEN: первую последовательность XTEN, встроенную в первый сайт встраивания; вторую последовательность XTEN, встроенную во второй сайт встраивания; третью последовательность XTEN, встроенную в третий сайт встраивания; четвертую последовательность XTEN, встроенную в четвертый сайт встраивания; пятую последовательность XTEN, встроенную в пятый сайт встраивания; и шестую последовательность XTEN, встроенную в шестой сайт встраивания.

Указанная первая, вторая, третья, четвертая, пятая или шестая последовательности XTEN могут

быть одинаковыми, разными или представлять собой их комбинации. Примеры шести сайтов встраивания XTEN включают, но не ограничиваются перечисленными: сайты встраивания, перечисленные в табл. 15.

Таблица 15

Типичные сайты встраивания XTEN для шести XTEN					
Встраивание XTEN 1	Встраивание XTEN 2	Встраивание XTEN 3	Встраивание XTEN 4	Встраивание XTEN 5	Встраивание XTEN 6
0018	0403	1656	1720	1900	2332
0018	0403	0745	1720	1900	2332

В конкретном примере первая XTEN встроена между аминокислотами 26 и 27, соответствующими SEQ ID NO: 4, а вторая XTEN встроена между аминокислотами 1720 и 1721, соответствующими SEQ ID NO: 4 (полноразмерный зрелый FVIII). В другом примере первая XTEN встроена между аминокислотами 403 и 404, соответствующими SEQ ID NO: 4, а вторая XTEN встроена между аминокислотами 1720 и 1721, соответствующими SEQ ID NO: 4. В некоторых примерах первая XTEN встроена между аминокислотами 1656 и 1657, соответствующими SEQ ID NO: 4, а вторая XTEN встроена между аминокислотами 1720 и 1721, соответствующими SEQ ID NO: 4. В других примерах первая XTEN встроена между аминокислотами 26 и 27, соответствующими SEQ ID NO: 4, вторая XTEN встроена между аминокислотами 1656 и 1657, соответствующими SEQ ID NO: 4, а третья XTEN встроена между аминокислотами 1720 и 1721, соответствующими SEQ ID NO: 4. В других вариантах реализации первая XTEN встроена между аминокислотами 403 и 404, соответствующими SEQ ID NO: 4, вторая XTEN встроена между аминокислотами 1656 и 1657, соответствующими SEQ ID NO: 4, а третья XTEN встроена между аминокислотами 1720 и 1721, соответствующими SEQ ID NO: 4. В других вариантах реализации первая XTEN встроена между аминокислотами 403 и 404, соответствующими SEQ ID NO: 4, вторая XTEN встроена между аминокислотами 1656 и 1657, соответствующими SEQ ID NO: 4, а третья XTEN встроена между аминокислотами 1720 и 1721, соответствующими SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах реализации первая XTEN встроена между аминокислотами 26 и 27, соответствующими SEQ ID NO: 4, вторая XTEN встроена между аминокислотами 1720 и 1721, соответствующими SEQ ID NO: 4, а третья XTEN встроена между аминокислотами 1900 и 1901, соответствующими SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах реализации первая XTEN встроена между аминокислотами 26 и 27, соответствующими SEQ ID NO: 4, вторая XTEN встроена между аминокислотами 1656 и 1657, соответствующими SEQ ID NO: 4, третья XTEN встроена между аминокислотами 1720 и 1721, соответствующими SEQ ID NO: 4, а четвертая XTEN встроена между аминокислотами 1900 и 1901, соответствующими SEQ ID NO: 4.

В конкретном варианте реализации последовательность XTEN встроена между аминокислотами 745 и 746 полноразмерного фактора VIII или в соответствующий сайт встраивания фактора VIII с делецией В-домена.

В некоторых вариантах реализации химерный белок согласно настоящему изобретению содержит две полипептидных последовательности:

первую полипептидную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере примерно на 80, 90, 95 или 100% идентичную последовательности, выбранной из FVIII-161 (SEQ ID NO: 101), FVIII-169 (SEQ ID NO: 103), FVIII-170 (SEQ ID NO: 102), FVIII-173 (SEQ ID NO: 104); FVIII-195 (SEQ ID NO: 105); FVIII-196 (SEQ ID NO: 106), FVIII-199 (SEQ ID NO: 107), FVIII-201 (SEQ ID NO: 108); FVIII-203 (SEQ ID NO: 109), FVIII-204 (SEQ ID NO: 110), FVIII-205 (SEQ ID NO: 111), FVIII-266 (SEQ ID NO: 112), FVIII-267 (SEQ ID NO: 113), FVIII-268 (SEQ ID NO: 114), FVIII-269 (SEQ ID NO: 115), FVIII-271 (SEQ ID NO: 116) или FVIII-272 (SEQ ID NO: 117),

и вторую полипептидную последовательность, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере примерно на 80, 90, 95 или 100% идентичную последовательности, выбранной из VWF031 (SEQ ID NO: 118), VWF034 (SEQ ID NO: 119) или VWF-036 (SEQ ID NO: 120).

D) Константная область Ig или ее часть.

VWFфрагмент фактора фон Виллебранда или белок FVIII, связанный с последовательностью XTEN в настоящем изобретении, может дополнительно содержать константную область Ig или ее часть. Указанная константная область Ig или ее часть может улучшать фармакокинетические или фармакодинамические свойства VWFфрагмента фактора фон Виллебранда или белка FVIII в комбинации с последовательностью XTEN. В некоторых вариантах реализации константная область Ig или ее часть увеличивает период полувыведения молекулы, слитой с данной константной областью Ig или ее частью. Константная область Ig состоит из доменов, обозначаемых доменами СН (константные тяжелые) (СН1, СН2 и т.д.). В зависимости от изогиа (т.е. IgG, IgM, IgA, IgD или IgE) константная область может состоять из трех или четырех доменов СН. Константные области некоторых изогиа (например, IgG) также содержат шарнирную область. См. Janeway et al., 2001, Immunobiology, Garland Publishing, N.Y., N.Y. Константная область Ig или ее часть для получения химерного белка согласно настоящему изобретению может быть получена из ряда различных источников. В некоторых вариантах реализации константная область Ig или

ее часть получена из Ig человека. Однако понятно, что константная область Ig или ее часть может быть получена из Ig других видов млекопитающих, включая, например, грызунов (например, мышей, крыс, кроликов, морских свинок) или нечеловекообразных приматов (например, шимпанзе, макак). Более того, константная область Ig или ее часть может быть получена из любого класса Ig, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа Ig, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В одном из вариантов реализации используют изотип IgG1 человека. Различные последовательности генов константной области Ig (например, последовательности генов константной области человека) доступны в форме общедоступных хранилищ. Может быть выбрана последовательность доменов константной области, имеющая конкретную эффекторную функцию (или с отсутствием конкретной эффекторной функции) или с конкретной модификацией для снижения иммуногенности. Были опубликованы многие последовательности антител и генов, кодирующих антитела, и подходящие последовательности константной области Ig (например, шарнирные последовательности, последовательности CH2 и/или CH3 или их части) могут быть получены из данных последовательностей с использованием методов, известных в данной области техники. Генетический материал, полученный с использованием любого из вышеуказанных методов, может быть затем изменен или синтезирован с получением полипептидов согласно настоящему изобретению. Также очевидно, что в объем настоящего изобретения включены аллели, варианты и мутации последовательностей ДНК константной области.

Последовательности константной области Ig или ее части могут быть клонированы, например, с использованием полимеразной цепной реакции и праймеров, выбранных для амплификации представляющего интерес домена. Для клонирования последовательности константной области Ig или ее части из антитела, мРНК может быть выделена из гибридомы, селезенки или лимфоцитов, обратно транскрибирована в ДНК и гены антител амплифицированы путем ПЦР. Методы ПЦР-амплификации подробно описаны в патентах США № 4683195; 4683202; 4800159; 4965188; и, например, в "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Innis et al., eds., Academic Press, San Diego, CA (1990); Ho et al., 1989, *Gene* 77:51; Horton et al., 1993, *Methods Enzymol.*, 217:270. ПНР может быть инициирована консенсусными праймерами константной области или более специфическими праймерами на основе опубликованных ДНК- и аминокислотных последовательностей тяжелой и легкой цепи. Как рассмотрено выше, ПЦР также можно использовать для выделения клонов ДНК, кодирующих легкую и тяжелую цепь антител. В данном случае может быть проведен скрининг библиотек с помощью консенсусных праймеров или более крупных гомологичных зондов, таких как зонды константной области мыши. В данной области техники известны многочисленные наборы праймеров, подходящие для амплификации генов антител (например, 5' праймеры на основе N-концевой последовательности очищенных антител (Benhar and Pastan, 1994, *Protein Engineering*, 7:1509); быстрая амплификация концов кДНК (Ruberti, F. et al., 1994, *J. Immunol. Methods*, 173:33); лидерные последовательности антител (Larrick et al., 1989, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160:1250)). Клонирование последовательностей антител также описано у Newman et al., патент США № 5658570, зарегистрированный 25 января 1995 г., содержание которого включено в настоящее описание посредством ссылки. Константная область Ig, используемая согласно настоящему изобретению, может содержать все домены и шарнирную область или их части. В одном из вариантов реализации константная область Ig или ее часть содержит домен CH2, домен CH3 и шарнирную область, т.е. область Fc или партнер по связыванию FcRn. В настоящем описании термин "область Fc" определяется как часть полипептида, соответствующая области Fc нативного Ig, т.е. как образованная путем димерной ассоциации соответствующих доменов Fc двух тяжелых цепей. Нативная область Fc образует гомодимер с другой областью Fc. В отличие от этого, в настоящем описании термин "генетически слитая область Fc" или "однопочечная область Fc" (область scFc) относится к синтетической димерной области Fc, состоящей из доменов Fc, генетически связанных в пределах одной полипептидной цепи (т.е. закодированных в одной непрерывной генетической последовательности).

В одном из вариантов реализации термин "область Fc" относится к части одной тяжелой цепи Ig, начинающейся в шарнирной области непосредственно выше сайта расщепления папаином (т.е. остаток 216 в IgG, принимая первый остаток константной области тяжелой цепи за 114) и заканчивающейся на C-конце антитела. Соответственно, полный домен Fc содержит по меньшей мере шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3. Область Fc константной области Ig в зависимости от изотипа Ig может включать домены CH2, CH3 и CH4, а также шарнирную область. Химерные белки, содержащие область Fc Ig, приобретают некоторые желаемые свойства, включая повышенную стабильность, увеличенный период полувыведения из сыворотки (см. Caron et al., 1989, *Nature*, 337:525), а также связывание с рецепторами Fc, такими как неонатальный рецептор Fc (FcRn) (патенты США № 6086875, 6485726, 6030613; WO 03/077834; US 2003-0235536 A1, полное содержание которых включено в настоящее описание посредством ссылки).

Константная область Ig или ее часть может являться партнером по связыванию FcRn. FcRn активен в эпителиальных тканях взрослых и экспрессируется в полости кишечника, легочных дыхательных путях, носовых поверхностях, вагинальных поверхностях, поверхностях толстой и прямой кишки (патент США № 6485726). Партнер по связыванию FcRn представляет собой часть Ig, которая связывается с FcRn. Рецептор FcRn был выделен из нескольких видов млекопитающих, включая людей. Известны по-

следовательности FcRn человека, FcRn обезьяны, FcRn крысы и FcRn мыши (Story et al., 1994, J. Exp. Med., 180:2377). Рецептор FcRn связывает IgG (но не другие классы Ig, такие как IgA, IgM, IgD и IgE) при относительно низком pH, активно переносит IgG трансцитотическим путем по направлению от просвета органа к серозной оболочке, а затем высвобождает IgG при относительно более высоком pH, обнаруживаемом в интерстициальных жидкостях. Он экспрессируется в эпителиальной ткани взрослых (патенты США № 6485726, 6030613, 6086875; WO 03/077834; US 2003-0235536 A1), включая эпителий легких и кишечника (Israel et al., 1997, Immunology, 92:69), эпителий проксимальных почечных канальцев (Kobayashi et al., 2002, Am. J. Physiol. Renal. Physiol., 282:F358), а также эпителий носовой полости, вагинальные поверхности и поверхности желчного дерева.

Партнеры по связыванию FcRn, подходящие для настоящего изобретения, включают молекулы, которые могут быть специфично связаны рецептором FcRn, включая целый IgG, Fc-фрагмент IgG и другие фрагменты, которые содержат полную область связывания рецептора FcRn. Область Fc-части IgG, которая связывается с рецептором FcRn, была описана на основе рентгеновской кристаллографии (Burmeister et al., 1994, Nature, 372:379). Основная область контакта Fc с FcRn располагается вблизи соединения доменов CH2 и CH3. Все контакты Fc-FcRn происходят в пределах одной тяжелой цепи Ig. Партнеры по связыванию FcRn включают полный IgG, Fc-фрагмент IgG и другие фрагменты, которые содержат полную область связывания FcRn. Основные контактные участки включают аминокислотные остатки 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 и 314 домена CH2, и аминокислотные остатки 385-387, 428 и 433-436 домена CH3. Все ссылки на нумерацию аминокислот Ig или фрагментов, или областей Ig приведены на основе Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md.

Области Fc или партнеры по связыванию FcRn, связанные с FcRn, могут эффективно "курсировать" через эпителиальные барьеры за счет FcRn, что таким образом обеспечивает неинвазивные способы системного введения желаемой терапевтической молекулы. Кроме того, гибридные белки, содержащие область Fc или партнер по связыванию FcRn, подвергаются эндоцитозу клетками, экспрессирующими FcRn. Но вместо намеченного распада данные гибридные белки снова возвращаются в кровообращение, что таким образом увеличивает период полувыведения данных белков *in vivo*. В некоторых вариантах реализации части константных областей Ig представляют собой область Fc или партнер по связыванию FcRn, который, как правило, ассоциирует через дисульфидные связи и другие неспецифические взаимодействия с другой областью Fc или другим партнером по связыванию FcRn с образованием димеров и мультимеров более высокого порядка.

Два рецептора FcRn могут связывать одну молекулу Fc. Кристаллографические данные позволяют предположить, что каждая молекула FcRn связывает один полипептид гомодимера Fc. В одном из вариантов реализации связывание партнера по связыванию FcRn, например Fc-фрагмента IgG, с биологически активной молекулой позволяет доставлять указанную биологически активную молекулу перорально, трансбуккально, сублингвально, ректально, вагинально, в виде аэрозоля, вводимого назально, или легочным путем, или глазным путем. В другом варианте реализации химерный белок может быть введен инвазивным путем, например подкожно, внутривенно.

Область, являющаяся партнером по связыванию FcRn, представляет собой молекулу или ее часть, которая может быть специфично связана рецептором FcRn с последующим активным переносом рецептором FcRn области Fc. Термин "специфично связанный" относится к двум молекулам, образующим комплекс, который является относительно стабильным в физиологических условиях. Специфическое связывание характеризуется высокой аффинностью и способностью от низкой до умеренной в отличие от неспецифического связывания, которое обычно имеет низкую аффинность и способность от умеренной до высокой. Как правило, связывание считается специфическим, когда константа аффинности KA больше $10^6 M^{-1}$ или больше $10^8 M^{-1}$. При необходимости неспецифическое связывание может быть уменьшено по существу без влияния на специфическое связывание путем варьирования условий связывания. Соответствующие условия связывания, такие как концентрация молекул, ионная сила раствора, температура, время, отведенное на связывание, концентрация блокирующего агента (например, сывороточного альбумина, казеина молока) и т.д., могут быть оптимизированы специалистом в данной области техники с использованием обычных способов. В некоторых вариантах реализации химерный белок согласно настоящему изобретению содержит одну или более укороченных областей Fc, которые однако при этом являются достаточными для придания области Fc связывающих свойств в отношении рецептора Fc (FcR). Например, часть области Fc, которая связывается с FcRn (т.е. FcRn-связывающая часть) содержит аминокислоты примерно 282-438 IgG1, система нумерации ЕС (первичными контактными сайтами являются аминокислоты 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 и 314 домена CH2 и аминокислотные остатки 385-387, 428 и 433-436 домена CH3). Таким образом, область Fc согласно настоящему изобретению может содержать или состоять из FcRn-связывающей части. FcRn-связывающие части могут быть получены из тяжелых цепей любого изотипа, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В одном из вариантов реализации используют FcRn-связывающую часть антитела изотипа IgG1 человека. В другом варианте реализации используют FcRn-связывающую часть антитела изотипа IgG4 человека.

В другом варианте реализации "область Fc" включает аминокислотную последовательность домена

Fc или полученную из домена Fc. В некоторых вариантах реализации область Fc содержит по меньшей мере один из: шарнирный (например, верхняя, средняя и/или нижняя шарнирная область) домен (аминокислоты примерно 216-230 области Fc антитела в соответствии с нумерацией ЕС), домен CH2 (аминокислоты примерно 232-340 области Fc антитела в соответствии с нумерацией ЕС), домен CH3 (аминокислоты примерно 341-438 области Fc антитела в соответствии с нумерацией ЕС), домен CH4 или их вариант, часть или фрагмент. В других вариантах реализации область Fc содержит полный домен Fc (т.е. шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3). В некоторых вариантах реализации область Fc содержит, по существу состоит из или состоит из шарнирного домена (или его части), слитого с доменом CH3 (или его частью), шарнирного домена (или его части), слитого с доменом CH2 (или его частью), домена CH2 (или его части), слитого с доменом CH3 (или его частью), домена CH2 (или его части), слитого как с шарнирным доменом (или его частью), так и с доменом CH3 (или его частью). В других вариантах реализации область Fc не содержит по меньшей мере часть домена CH2 (например, весь или часть домена CH2). В конкретном варианте реализации область Fc содержит или состоит из аминокислот, соответствующих номерам ЕС с 221 по 447. Области Fc, обозначаемые в настоящем описании F, F1 или F2, могут быть получены из ряда различных источников. В одном из вариантов реализации область Fc полипептида получена из Ig человека. Однако понятно, что область Fc может быть получена из Ig других видов млекопитающих, включая, например, грызунов (например, мышей, крыс, кроликов или морских свинок) или нечеловекообразных приматов (например, шимпанзе, макак). Более того, полипептид доменов Fc или их частей может быть получен из любого класса Ig, включая IgM, IgG, IgD, IgA и IgE, и любого изотипа Ig, включая IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В другом варианте реализации используют изотип IgG1 человека. В некоторых вариантах реализации вариант Fc обеспечивает изменение по меньшей мере одной эффекторной функции, наделенной областью Fc, содержащей указанный домен Fc дикого типа (например, улучшение или снижение способности области Fc связываться с рецепторами Fc (например, FcγRI, FcγRII или FcγRIII) или белками комплемента (например, C1q), или запускать антителозависимую цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз или комплементзависимую цитотоксичность (CDCC)). В других вариантах реализации вариант Fc обеспечивает встроенный остаток цистеина. В областях Fc согласно настоящему изобретению можно использовать известные в данной области техники варианты Fc, которые, как известно, придают изменение (например, увеличение или уменьшение) эффекторной функции и/или связывания FcR или FcRn. В частности, связывающая молекула согласно настоящему изобретению может содержать, например, изменение (например, замену) в одном или более положениях аминокислот, описанных в международных публикациях PCT WO 88/07089 A1, WO 96/14339 A1, WO 98/05787 A1, WO 98/23289 A1, WO 99/51642 A1, WO 99/58572 A1, WO 00/09560 A2, WO 00/32767 A1, WO 00/42072 A2, WO 02/44215 A2, WO 02/060919 A2, WO 03/074569 A2, WO 04/016750 A2, WO 04/029207 A2, WO 04/035752 A2, WO 04/063351 A2, WO 04/074455 A2, WO 04/099249 A2, WO 05/040217 A2, WO 04/044859, WO 05/070963 A1, WO 05/077981 A2, WO 05/092925 A2, WO 05/123780 A2, WO 06/019447 A1, WO 06/047350 A2 и WO 06/085967 A2; публикациях патента США № US 2007/0231329, US 2007/0231329, US 2007/0237765, US 2007/0237766, US 2007/0237767, US 2007/0243188, US 20070248603, US 20070286859, US 20080057056; или патентах США 5648260; 5739277; 5834250; 5869046; 6096871; 6121022; 6194551; 6242195; 6277375; 6528624; 6538124; 6737056; 6821505; 6998253; 7083784; 7404956 и 7317091, содержание каждого из которых включено в настоящее описание посредством ссылки. В одном из вариантов реализации может быть произведено конкретное изменение (например, конкретная замена одной или более аминокислот, описанная в данной области техники) в одном или более из описанных положений аминокислот. В другом варианте реализации может быть произведено другое изменение в одном или более из описанных положений аминокислот (например, другая замена одного или более положений аминокислот, описанная в данной области техники). Область Fc или партнер по связыванию FcRn IgG может быть модифицирован в соответствии с хорошо известными процедурами, такими как сайт-направленный мутагенез и т.п., с получением модифицированных фрагментов IgG или Fc, или их частей, которые будут связывать FcRn. Такие модификации включают модификации, удаленные от контактных сайтов FcRn, а также модификации в пределах контактных сайтов, которые сохраняют или даже увеличивают связывание с FcRn. Например, следующие единичные аминокислотные остатки в Fc IgG1 человека (Fcγ1) могут быть заменены без значительной потери аффинности связывания Fc в отношении

FcRn: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, P331A, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A и K447A,

где, например, P238A представляет собой замену пролина дикого типа аланином в положении номер 238. В качестве примера конкретный вариант реализации включает мутацию N297A, позволяющую удалить высококонсервативный сайт N-гликозилирования. В дополнение к аланину другие аминокислоты могут заменять аминокислоты дикого типа в положениях, указанных выше. Мутации могут быть введены в Fc по отдельности, что приводит к образованию более ста областей Fc, отличных от нативной Fc. Кроме того, комбинации двух, трех или более данных отдельных мутаций могут быть введены совместно, что приводит к образованию еще сотен областей Fc. Более того, одна из областей Fc конструкции согласно настоящему изобретению может быть мутирована, а другая область Fc указанной конструкции может быть совсем не мутирована или они обе могут быть мутированы, но с использованием разных мутаций.

Некоторые из вышеуказанных мутаций могут придавать области Fc или партнеру по связыванию FcRn новую функциональность. Например, один из вариантов реализации включает N297A, позволяющую удалить высококонсервативный сайт N-гликозилирования. Влияние данной мутации заключается в снижении иммуногенности и тем самым увеличении периода полувыведения области Fc из крови, и в приведении области Fc в состояние неспособности связываться с Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB и Fc γ RIIA, не нарушая при этом аффинности в отношении FcRn (Routledge et al., 1995, Transplantation 60:847; Friend et al., 1999, Transplantation, 68:1632; Shields et al., 1995, J. Biol. Chem., 276:6591). Другим примером новой функциональности, являющейся результатом мутаций, описанных выше, является возможность увеличения аффинности в отношении FcRn, которая в некоторых случаях будет выше аффинности дикого типа. Данная увеличенная аффинность может отражать повышенную скорость ассоциации, пониженную скорость диссоциации или как повышенную скорость ассоциации, так и пониженную скорость диссоциации. Примеры мутаций, которые, как считается, наделяют повышенной аффинностью в отношении FcRn, включают T256A, T307A, E380A и N434A (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem., 276:6591). Кроме того, по меньшей мере три гамма-рецептора Fc человека, по-видимому, распознают сайт связывания в IgG в пределах нижней шарнирной области, как правило, аминокислоты 234-237. Следовательно, другой пример новой функциональности и возможно пониженной иммуногенности может являться результатом мутаций данной области, например, путем замены аминокислот 233-236 "ELLG" IgG1 человека на соответствующую последовательность "PVA" IgG2 (с делецией одной аминокислоты). Было показано, что Fc γ RI, Fc γ RII и Fc γ RIII, которые опосредуют различные эффекторные функции, не будут связываться с IgG1, когда введены такие мутации. Ward and Ghetie, 1995, Therapeutic Immunology, 2:77; и Armour et al., 1999, Eur. J. Immunol., 29:2613. В одном из вариантов реализации константная область Ig или ее часть, например область Fc, представляет собой полипептид, содержащий последовательность PKNSSMISNTP (SEQ ID NO: 52) и возможно дополнительно содержащий последовательность, выбранную из HQLSLGTQ (SEQ ID NO: 53), HQLNSDGG (SEQ ID NO: 54), HQNISDGG (SEQ ID NO: 55) или VISSHLGQ (SEQ ID NO: 56) (патент США № 5739277).

В другом варианте реализации константная область иммуноглобулина или ее часть содержит аминокислотную последовательность в шарнирной области или ее часть, которая образует одну или более дисульфидных связей с другой константной областью иммуноглобулина или ее частью. Дисульфидная связь, образованная константной областью иммуноглобулина или ее частью, располагает первый полипептид, содержащий FVIII, и второй полипептид, содержащий VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, вместе, так что эндогенный VWF не заменяет VWFфрагмент фактора фон Виллебранда и не связывается с FVIII. Следовательно, дисульфидная связь между первой константной областью иммуноглобулина или ее частью и второй константной областью иммуноглобулина или ее частью предотвращает взаимодействие между VWFэндогенным фактором фон Виллебранда и белком FVIII. Данное ингибирование взаимодействия между VWF и белком FVIII позволяет периоду полувыведения белка FVIII превысить двукратный предел. Шарнирная область или ее часть также может быть связана с одним или более доменами CH1, CH2, CH3, их фрагментом и их любыми комбинациями. В конкретном варианте реализации константная область иммуноглобулина или ее часть представляет собой шарнирную область и CH2.

В некоторых вариантах реализации константная область Ig или ее часть является полугликозилированной. Например, химерный белок, содержащий две области Fc или партнера по связыванию FcRn, может содержать первую гликозилированную область Fc (например, гликозилированную область CH2) или партнер по связыванию FcRn, и вторую агликозилированную область Fc (например, агликозилированную область CH2) или партнер по связыванию FcRn. В одном из вариантов реализации линкер может быть помещен между гликозилированной и агликозилированными областями Fc. В другом варианте реализации область Fc или партнер по связыванию FcRn является полностью гликозилированной, т.е. все области Fc являются гликозилированными. В других вариантах реализации область Fc может быть агликозилированной, т.е. ни один из фрагментов Fc не является гликозилированным.

В некоторых вариантах реализации химерный белок согласно настоящему изобретению содержит замену аминокислоты в константной области Ig или ее части (например, варианты Fc), которая изменяет антигеннезависимые эффекторные функции константной области Ig, в частности, период полувыведения белка из крови. Такие белки демонстрируют либо повышенное, либо пониженное связывание с FcRn по сравнению с белками, не содержащими данные замены, и, следовательно, имеют увеличенный или уменьшенный период полувыведения из сыворотки соответственно. Варианты Fc с повышенной аффинностью в отношении FcRn, как ожидается, имеют более длительные периоды полувыведения из сыворотки, и такие молекулы имеют полезное применение в способах лечения млекопитающих, когда желаемым является длительный период полувыведения вводимого полипептида, например, для лечения хронического заболевания или нарушения (см., например, патенты США 7348004, 7404956 и 7862820). В отличие от этого варианты Fc с пониженной аффинностью связывания в отношении FcRn, как ожидается, имеют более короткие периоды полувыведения и такие молекулы также являются полезными, например, для введения млекопитающему, когда может быть предпочтительным сокращенное время в кровообращении, например, для диагностической визуализации *in vivo* или в ситуациях, когда исходный полипептид обладает токсическими побочными эффектами при нахождении в кровообращении в течение длительных периодов времени. Кроме того, варианты Fc с пониженной аффинностью связывания в отношении FcRn с меньшей вероятностью проходят через плаценту и, таким образом, также подходят для лечения заболеваний или нарушений у беременных женщин. Кроме того, другие виды применения, при которых может быть желательной пониженная аффинность связывания в отношении FcRn, включают те виды применения, при которых желательной является локализация в головном мозге, почках и/или печени. В одном из типичных вариантов реализации химерный белок согласно настоящему изобретению демонстрирует пониженный транспорт через эпителий почечных клубочков из сосудистой сети. В другом варианте реализации химерный белок согласно настоящему изобретению демонстрирует пониженный транспорт через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) из головного мозга в сосудистое пространство. В одном из вариантов реализации белок с измененным связыванием FcRn содержит по меньшей мере одну область Fc или партнер по связыванию FcRn (например, одну или две области Fc или партнера по связыванию FcRn), содержащий одну или более замен аминокислот в пределах "FcRn-связывающей петли" константной области Ig. FcRn-связывающая петля состоит из аминокислотных остатков 280-299 (в соответствии с нумерацией ЕС) полноразмерной области Fc дикого типа. В других вариантах реализации константная область Ig или ее часть в химерном белке согласно настоящему изобретению, обладающая измененной аффинностью связывания в отношении FcRn, содержит по меньшей мере одну область Fc или партнер по связыванию FcRn, содержащий одну или более замен аминокислот в пределах 15 Å "зоны контакта" FcRn. В настоящем описании термин 15 Å "зона контакта" FcRn включает остатки в следующих положениях полноразмерного фрагмента Fc дикого типа: 243-261, 275-280, 282-293, 302-319, 336-348, 367, 369, 372-389, 391, 393, 408, 424, 425-440 (нумерация ЕС). В других вариантах реализации константная область Ig или ее часть согласно настоящему изобретению, обладающая измененной аффинностью связывания в отношении FcRn, содержит по меньшей мере одну область Fc или партнер по связыванию FcRn, содержащий одну или более замен аминокислот в положении аминокислоты, соответствующем любому из следующих положений согласно ЕС: 256, 277-281, 283-288, 303-309, 313, 338, 342, 376, 381, 384, 385, 387, 434 (например, N434A или N434K) и 438. Типичные замены аминокислот, которые изменяли связывающую активность в отношении FcRn, описаны в международной публикации РСТ № WO 05/047327, содержание которой включено в настоящее описание посредством ссылки.

Область Fc или партнер по связыванию FcRn, используемый в настоящем изобретении, также может содержать известную в данной области техники замену аминокислоты, которая изменяет гликозилирование химерного белка. Например, область Fc или партнер по связыванию FcRn химерного белка, связанный с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда или белком FVIII, может включать область Fc, содержащую мутацию, приводящую к уменьшению гликозилирования (например, N- или O-связанного гликозилирования), или может включать измененную гликоформу фрагмента Fc дикого типа (например, гликан с низким содержанием фукозы или гликан, не содержащий фукозы). В одном из вариантов реализации неспроцессированный химерный белок согласно настоящему изобретению может содержать генетически слитую область Fc (т.е. область scFc), содержащую две или более составляющих константных областей Ig или их частей, независимо выбранных из константной области Ig или ее части, описанной в настоящем документе. В одном из вариантов реализации области Fc димерной Fc области являются оди-

наковыми. В другом варианте реализации по меньшей мере две из областей Fc являются разными. Например, области Fc или партнеры по связыванию FcRn белков согласно настоящему изобретению содержат одинаковое количество аминокислотных остатков или они могут отличаться по длине на один или более аминокислотных остатков (например, на примерно 5 аминокислотных остатков (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных остатков), примерно 10 остатков, примерно 15 остатков, примерно 20 остатков, примерно 30 остатков, примерно 40 остатков или примерно 50 остатков). В других вариантах реализации области Fc или партнеры по связыванию FcRn белка согласно настоящему изобретению могут отличаться последовательностью в одном или более положениях аминокислот. Например, по меньшей мере две из областей Fc или партнеров по связыванию FcRn могут отличаться примерно 5 положениями аминокислот (например, 1, 2, 3, 4 или 5 положениями аминокислот), примерно 10 положениями, примерно 15 положениями, примерно 20 положениями, примерно 30 положениями, примерно 40 положениями или примерно 50 положениями).

Е) Линкеры.

Химерный белок согласно настоящему изобретению содержит также один или более линкеров. Одним из типов линкеров является расщепляемый линкер, который может быть расщеплен под действием различных протеаз при введении субъекту *in vivo*, например, в месте коагуляции. В одном из вариантов реализации расщепляемый линкер обеспечивает отщепление фрагмента, например, VWFфрагмента фактора фон Виллебранда, от химерного белка в месте каскада свертывания крови, что таким образом позволяет активированному FVIII (FVIIIa) обладать активностью FVIIIa. Другим типом линкеров является процессируемый линкер, который содержит сайт внутриклеточного расщепления и, таким образом, может быть расщеплен под действием фермента внутриклеточного процессинга в клетке-хозяине, что обеспечивает подходящую экспрессию полипептида и образование химерного белка.

Один или более линкеров могут присутствовать между любыми двумя белками в химерном белке. В одном из вариантов реализации химерный белок содержит

- (i) VWFфрагмент фактора фон Виллебранда;
- (ii) последовательность XTEN; и
- (iii) белок FVIII,

при этом VWFфрагмент фактора фон Виллебранда связан с последовательностью XTEN линкером, например расщепляемым линкером, и последовательность XTEN также связана с белком FVIII (т.е. V-L-X-FVIII).

В другом варианте реализации химерный белок содержит

- (i) VWFфрагмент фактора фон Виллебранда;
- (ii) последовательность XTEN; и
- (iii) белок FVIII,

при этом VWFфрагмент фактора фон Виллебранда связан с последовательностью XTEN и последовательность XTEN связана с белком FVIII линкером, например расщепляемым линкером (т.е. V-X-L-FVIII).

В некоторых вариантах реализации химерный белок содержит

- (i) VWFфрагмент фактора фон Виллебранда;
- (ii) последовательность XTEN;
- (iii) первую константную область Ig или ее часть (например, первую область Fc);
- (iv) белок FVIII; и
- (v) вторую константную область Ig или ее часть (например, вторую область Fc),

при этом VWFфрагмент фактора фон Виллебранда связан с последовательностью XTEN необязательным линкером, например расщепляемым линкером.

Последовательность XTEN также может быть связана с первой константной областью Ig или ее частью линкером, например расщепляемым линкером. Белок FVIII (с последовательностью XTEN или без нее) также может быть связан со второй константной областью Ig или ее частью необязательным линкером, например, расщепляемым линкером. В некоторых вариантах реализации химерный белок содержит также один или более линкеров, например процессируемых линкеров, между первой константной областью Ig или ее частью (например, первой областью Fc) и второй константной областью Ig или ее частью (например, второй областью Fc), между VWFфрагментом фактора фон Виллебранда и второй константной областью Ig или ее частью или между белком FVIII и первой константной областью Ig или ее частью (например, первой областью Fc).

В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение включает химерный белок, содержащий

- (i) белок FVIII;
- (ii) последовательность XTEN;
- (iii) первую константную область Ig или ее часть; и
- (iv) вторую константную область Ig или ее часть,

при этом первая константная область Ig или ее часть и вторая константная область Ig или ее часть связаны процессируемым линкером.

Линкер, подходящий для настоящего изобретения, может содержать любую органическую молеку-

лу. В одном из вариантов реализации линкер содержит полимер, например полиэтиленгликоль (ПЭГ) или гидроксипропилкрахмал (ГЭК). В другом варианте реализации линкер содержит аминокислотную последовательность. Линкер может содержать по меньшей мере примерно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 или 2000 аминокислот. Линкер может содержать 1-5 аминокислот, 1-10 аминокислот, 1-20 аминокислот, 10-50 аминокислот, 50-100 аминокислот, 100-200 аминокислот, 200-300 аминокислот, 300-400 аминокислот, 400-500 аминокислот, 500-600 аминокислот, 600-700 аминокислот, 700-800 аминокислот, 800-900 аминокислот или 900-1000 аминокислот. В одном из вариантов реализации линкер содержит последовательность XTEN. Дополнительные примеры XTEN могут быть использованы согласно настоящему изобретению, и они описаны в публикациях патента США № 2010/0239554 A1, 2010/0323956 A1, 2011/0046060 A1, 2011/0046061 A1, 2011/0077199 A1 или 2011/0172146 A1, или международных публикациях патента № WO 2010091122 A1, WO 2010144502 A2, WO 2010144508 A1, WO 2011028228 A1, WO 2011028229 A1 или WO 2011028344 A2. В другом варианте реализации линкер представляет собой последовательность PAS. Линкер, подходящий для настоящего изобретения, может содержать любую органическую молекулу. В одном из вариантов реализации линкер представляет собой полимер, например полиэтиленгликоль (ПЭГ) или гидроксипропилкрахмал (ГЭК). В другом варианте реализации линкер представляет собой аминокислотную последовательность. Линкер может содержать по меньшей мере примерно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900 или 2000 аминокислот. Линкер может содержать 1-5 аминокислот, 1-10 аминокислот, 1-20 аминокислот, 10-50 аминокислот, 50-100 аминокислот, 100-200 аминокислот, 200-300 аминокислот, 300-400 аминокислот, 400-500 аминокислот, 500-600 аминокислот, 600-700 аминокислот, 700-800 аминокислот, 800-900 аминокислот или 900-1000 аминокислот.

Примеры линкеров хорошо известны в данной области техники. В одном из вариантов реализации линкер содержит последовательность G_n . Линкер может содержать последовательность $(GA)_n$. Линкер может содержать последовательность $(GGS)_n$. В других вариантах реализации линкер содержит $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 57). В других вариантах реализации линкер содержит последовательность $(GGS)_n(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO: 58). В данных случаях n может представлять собой целое число 1-100. В других случаях n может представлять собой целое число 1-20, т.е. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20. Примеры линкеров включают, но не ограничиваются перечисленными,

GGG, SGGSGGS (SEQ ID NO: 59), GSGSGSGSGSGSGG (SEQ ID NO: 60),

GGSGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 61), GSGSGSGSGSGSGSGGS (SEQ ID NO: 62)

или GGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 63).

Линкер не устраняет или не снижает активность VWFфрагмента фактора фон Виллебранда или свертывающую активность фактора VIII. Линкер возможно усиливает активность VWFфрагмента фактора фон Виллебранда или свертывающую активность белка, представляющего собой фактор VIII, например, за счет дополнительного снижения влияния стерического препятствия и делая VWFфрагмент фактора фон Виллебранда или часть фактора VIII более доступными для целевого сайта связывания.

В одном из вариантов реализации линкер, подходящий для химерного белка, имеет длину 15-25 аминокислот. В другом варианте реализации линкер, подходящий для химерного белка, имеет длину 15-20 аминокислот. В некоторых вариантах реализации линкер для химерного белка имеет длину 10-25 аминокислот. В других вариантах реализации линкер для химерного белка имеет длину 15 аминокислот. В других вариантах реализации линкер для химерного белка представляет собой $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO: 64), где G представляет собой глицин, S представляет собой серию и n представляет собой целое число 1-20.

F) Сайты расщепления.

Линкер также может включать фрагмент, способный расщепляться либо химически (например, гидролиз сложноэфирной связи), под воздействием ферментов (т.е. включение последовательности, расщепляемой протеазой) или фотолитически (например, хромофор, такой как 3-амино-3-(2-нитрофенил)пропионовая кислота (ANP)), для освобождения одной молекулы от другой.

В одном из вариантов реализации линкер представляет собой расщепляемый линкер. Расщепляемые линкеры могут содержать один или более сайтов расщепления на N-конце, или C-конце, или обоих. В другом варианте реализации расщепляемый линкер по существу состоит из или состоит из одного или более сайтов расщепления. В других вариантах реализации расщепляемый линкер содержит гетерологичные аминокислотные линкерные последовательности, описанные в настоящем документе, или полимеры и один или более сайтов расщепления.

В некоторых вариантах реализации расщепляемый линкер содержит один или более сайтов расщепления, которые могут расщепляться в клетке-хозяине (например, сайты внутриклеточного процессинга). Неограничивающие примеры сайта расщепления включают RRRR (SEQ ID NO: 9), RKRRKR (SEQ ID NO: 10) и RRRRS (SEQ ID NO: 11).

В других вариантах реализации расщепляемый линкер содержит один или более сайтов расщепления, которые расщепляются под действием протеазы после введения химерного белка, содержащего ука-

занный расщепляемый линкер, субъекту. В одном из вариантов реализации сайт расщепления расщепляется под действием протеазы, выбранной из группы, состоящей из фактора XIa, фактора XIIa, калликреина, фактора VIIa, фактора IXa, фактора Xa, фактора IIa (тромбина), эластазы-2, MMP-12, MMP-13, MMP-17 и MMP-20. В другом варианте реализации сайт расщепления выбран из группы, состоящей из сайта расщепления FXIa (например, KLTR↓AET (SEQ ID NO: 65)), сайта расщепления FXIa (например, DFTR↓VVG (SEQ ID NO: 66)), сайта расщепления FXIIa (например, TMTR↓IVGG (SEQ ID NO: 67)), сайта расщепления калликреином (например, SPFR↓STGG (SEQ ID NO: 68)), сайта расщепления FVIIa (например, LQVR↓IVGG (SEQ ID NO: 69)), сайта расщепления FIXa (например, PLGR↓IVGG (SEQ ID NO: 70)), сайта расщепления FXa (например, IEGR↓TVGG (SEQ ID NO: 71)), сайта расщепления FIIa (тромбином) (например, LTPR↓SLLV (SEQ ID NO: 72)), сайта расщепления эластазой-2 (например, LGPV↓SGVP (SEQ ID NO: 73)), сайта расщепления гранзимом-B (например, VAGD↓SLEE (SEQ ID NO: 74)), сайта расщепления MMP-12 (например, GPAG↓LGGA (SEQ ID NO: 75)), сайта расщепления MMP-13 (например, GPAG↓LRGA (SEQ ID NO: 76)), сайта расщепления MMP-17 (например, APLG↓LRLR (SEQ ID NO: 77)), сайта расщепления MMP-20 (например, PALP↓LVAQ (SEQ ID NO: 78)), сайта расщепления TEV (например, ENLYFQ↓G (SEQ ID NO: 79)), сайта расщепления энтерокиназой (например, DDDK↓IVGG (SEQ ID NO: 80)), сайта расщепления протеазой 3C (PRESCISSION™) (например, LEVLFQ↓GP (SEQ ID NO: 81)) и сайта расщепления сортазой A (например, LPKT↓GSES) (SEQ ID NO: 82). В некоторых вариантах реализации сайты расщепления FXIa включают, но не ограничиваются перечисленными: например, TQSFNDFTR (SEQ ID NO: 83) и SVSQTSKLTR (SEQ ID NO: 84).

Неограничивающие типичные сайты расщепления тромбином включают, например, DFLAEGGGVR (SEQ ID NO: 85), TTKIKPR (SEQ ID NO: 86) или LVPRG (SEQ ID NO: 87), и последовательность, содержащую, по существу состоящую из или состоящую из ALRPR (SEQ ID NO: 17) (например, ALRPRVVGGA (SEQ ID NO: 88)).

В конкретном варианте реализации сайт расщепления представляет собой TLDPRSFLLRNPNDKYEPFWEDEEK (SEQ ID NO: 8).

Полинуклеотиды, векторы и клетки-хозяева.

Согласно настоящему изобретению также предложен полинуклеотид, кодирующий

(a) VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, связанный с последовательностью XTEN и белком FVIII;

(b) белок FVIII, связанный с последовательностью XTEN и Fc; или

(c) белок FVIII, связанный с последовательностью XTEN и VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, описанным в настоящем документе.

В случае когда химерный белок представляет собой одну полипептидную цепь (например, F2-L2-X-V-L1-F1-FVIII, где FVIII содержит белок FVIII, F1 содержит первую константную область Ig или ее часть, например, первую область Fc, L1 содержит первый линкер, V содержит VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, X содержит последовательность XTEN, L2 содержит второй линкер и F2 содержит вторую константную область Ig или ее часть, например вторую область Fc), настоящее изобретение относится к одной полинуклеотидной цепи, кодирующей указанную одну полипептидную цепь. В случае когда химерный белок содержит первую и вторую полипептидные цепи (F2-L2-X-V:FVIII-F1):

первую полипептидную цепь, содержащую VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, связанный с последовательностью XTEN, который также связан с первой константной областью Ig или ее частью (например, первой областью Fc) расщепляемым линкером (например, F2-L2-X-V); и

вторую полипептидную цепь, содержащую белок FVIII и вторую константную область Ig или ее часть (например, вторую область Fc) (например, FVIII-F1),

при этом первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь ассоциированы друг с другом, полинуклеотид может содержать первую нуклеотидную последовательность и вторую нуклеотидную последовательность.

В одном из вариантов реализации первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь могут кодироваться одной полинуклеотидной цепью. В другом варианте реализации первая полипептидная цепь и вторая полипептидная цепь кодируются двумя разными полинуклеотидами, т.е. первой нуклеотидной последовательностью и второй нуклеотидной последовательностью. В другом варианте реализации первая нуклеотидная последовательность и вторая нуклеотидная последовательность присутствуют в двух разных полинуклеотидах (например, разных векторах). В некоторых вариантах реализации настоящее изобретение относится к группе полинуклеотидов, содержащей первую нуклеотидную цепь и вторую нуклеотидную цепь, при этом первая нуклеотидная цепь кодирует VWFфрагмент фактора фон Виллебранда химерного белка, а вторая нуклеотидная цепь кодирует белок FVIII. В некоторых вариантах реализации химерный белок, содержащий две полипептидные цепи или три полипептидные цепи, может быть кодирован одной полинуклеотидной цепью, а затем процессирован с образованием двух или трех (или более) полипептидных цепей. В других вариантах реализации химерный белок, содержащий данные полипептидные цепи, может быть кодирован двумя или тремя полинуклеотидными цепями. В других

вариантах реализации группа полинуклеотидов также содержит дополнительную нуклеотидную цепь (например, вторую нуклеотидную цепь, когда химерный полипептид кодируется одной полинуклеотидной цепью, или третью нуклеотидную цепь, когда химерный белок кодируется двумя полинуклеотидными цепями), которая кодирует протеинконвертазу. Протеинконвертаза может быть выбрана из группы, состоящей из пропротеинконвертазы субтилизин/кексинового типа 5 (PCSK5 или PC5), пропротеинконвертазы субтилизин/кексинового типа 7 (PCSK7 или PC5), Kex 2 дрожжей, пропротеинконвертазы субтилизин/кексинового типа 3 (PACE или PCSK3) и их двух или более комбинаций. В некоторых вариантах реализации протеинконвертаза представляет собой PACE, PC5 или PC7. В конкретном варианте реализации протеинконвертаза представляет собой PC5 или PC7. См. международную заявку № PCT/US2011/043568.

В настоящем описании термин "вектор экспрессии" относится к любой конструкции нуклеиновой кислоты, которая содержит элементы, необходимые для транскрипции и трансляции встроенной кодирующей последовательности, или в случае РНК-вирусного вектора - элементы, необходимые для репликации и трансляции, при введении в соответствующую клетку-хозяина. Векторы экспрессии могут включать плазмиды, фагмиды, вирусы и их производные.

Векторы экспрессии согласно настоящему изобретению будут включать полинуклеотиды, кодирующие химерный белок, описанный в настоящем документе. В одном из вариантов реализации одна или более кодирующих последовательностей для VWFфрагмента фактора фон Виллебранда и XTEN, белка FVIII и XTEN или тех и других, функционально связаны с последовательностью, контролирующей экспрессию. В настоящем изобретении две последовательности нуклеиновых кислот являются функционально связанными, когда они ковалентно связаны таким образом, чтобы обеспечивать сохранение функциональности каждого компонента, представляющего собой последовательность нуклеиновой кислоты. Говорят, что кодирующая последовательность и последовательность, контролирующая экспрессию генов, являются функционально связанными, когда они ковалентно связаны таким образом, чтобы экспрессия или транскрипция и/или трансляция кодирующей последовательности находилась под влиянием или контролем последовательности, контролирующей экспрессию генов. Говорят, что две последовательности ДНК являются функционально связанными, если индукция промотора на 5'-конце последовательности для экспрессии генов приводит к транскрипции кодирующей последовательности, и если природа связи между двумя последовательностями ДНК

(1) не приводит к введению мутации со сдвигом рамки;

(2) не нарушает способность промоторной области направлять транскрипцию кодирующей последовательности; или

(3) не нарушает способность соответствующего РНК-транскрипта транслироваться в белок.

Таким образом, последовательность для экспрессии генов была бы функционально связана с кодирующей последовательностью нуклеиновой кислоты, если бы указанная последовательность для экспрессии генов была способна осуществлять транскрипцию данной кодирующей последовательности нуклеиновой кислоты так, чтобы полученный транскрипт транслировался в желаемый белок или полипептид. В настоящем описании последовательность, контролирующая экспрессию генов, представляет собой любую регуляторную нуклеотидную последовательность, такую как промоторная последовательность или комбинация промотор-энхансер, которая способствует эффективной транскрипции и трансляции кодирующей нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана. Последовательность, контролирующая экспрессию генов, может, например, представлять собой промотор млекопитающего или вирусный промотор, такой как конститутивный или индуцируемый промотор. Конститутивные промоторы млекопитающих включают, но не ограничиваются перечисленными, промоторы для следующих генов: гипоксантинфосфорибозилтрансфераза (HPRT), аденозиндеаминаза, пируваткиназа, промотор бета-актина и другие конститутивные промоторы. Типичные вирусные промоторы, которые конститутивно функционируют в эукариотических клетках, включают, например, промоторы цитомегаловируса (CMV), обезьяньего вируса (например, SV40), вируса папилломы, аденовируса, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), вируса саркомы Рауса, цитомегаловируса, длинные концевые повторы (LTR) вируса лейкоза Молони и других ретровирусов, и тимидинкиназный промотор вируса простого герпеса. Другие конститутивные промоторы известны специалисту в данной области техники. Промоторы, подходящие в качестве последовательностей для экспрессии генов согласно настоящему изобретению, также включают индуцируемые промоторы. Индуцируемые промоторы экспрессируются в присутствии индуцирующего агента. Например, промотор металлопротеина индуцируется для того, чтобы способствовать транскрипции и трансляции, в присутствии некоторых ионов металла. Другие индуцируемые промоторы известны специалисту в данной области техники.

В целом последовательность, контролирующая экспрессию генов, будет включать при необходимости 5' нетранскрибируемые и 5' нетранслируемые последовательности, вовлеченные в инициацию транскрипции и трансляции соответственно, такие как ТАТА-бокс, копирующая последовательность, последовательность СААТ и т.п. В частности, такие 5' нетранскрибируемые последовательности будут включать промоторную область, которая включает промоторную последовательность для транскрипционного контроля функционально присоединенной кодирующей нуклеиновой кислоты. Последовательности для экспрессии генов возможно включают энхансерные последовательности или вышележащие активирующие

последовательности, при необходимости. Вирусные векторы включают, но не ограничиваются перечисленными, последовательности нуклеиновых кислот следующих вирусов: ретровирус, такой как вирус лейкоза Молони мышей, вирус саркомы Харви мышей, вирус опухоли молочной железы мышей и вирус саркомы Рауса; аденовирус, аденоассоциированный вирус; вирусы типа SV40; полиомавирусы; вирусы Эпштейна-Барра; вирусы папилломы; вирус герпеса; вирус осповакцины; полиовирус; и РНК-вирус, такой как ретровирус. Можно легко использовать другие векторы, хорошо известные в данной области техники. Некоторые вирусные векторы основаны на нецитопатических эукариотических вирусах, в которых нежизненно важные гены были заменены представляющим интерес геном. Нецитопатические вирусы включают ретровирусы, в жизненный цикл которых вовлечена обратная транскрипция геномной вирусной РНК в ДНК с последующей провирусной интеграцией в ДНК клетки-хозяина. Ретровирусы были одобрены для исследований генной терапии человека. Наиболее подходящими являются те ретровирусы, которые являются дефектными по репликации (т.е. способны направлять синтез желаемых белков, но не способны производить инфекционные частицы). Такие генетически измененные ретровирусные векторы экспрессии в целом применимы для высокоэффективной трансдукции генов *in vivo*. Стандартные протоколы получения дефектных по репликации ретровирусов (включая этапы включения экзогенного генетического материала в плазмиду, трансфекции пакующей линии клеток плазмидой, выработки рекомбинантных ретровирусов пакующей линией клеток, сбора вирусных частиц из сред для культивирования ткани и инфицирования целевых клеток вирусными частицами) приведены в Kriegler, M., *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, W.H. Freeman Co., New York (1990); и Murry, E.J., *Methods in Molecular Biology*, vol. 7, Humana Press, Inc., Clifton, N.J. (1991). В одном из вариантов реализации вирус представляет собой аденоассоциированный вирус, двухцепочечный ДНК-вирус. Аденоассоциированный вирус может быть создан дефектным по репликации и способным инфицировать широкий диапазон типов и видов клеток. Он также обладает такими преимуществами, как термостабильность и стабильность в отношении липидных растворителей; высокая частота трансдукции в клетках различных линий, включая гемопоэтические клетки; и отсутствие ингибирования суперинфекции, что таким образом обеспечивает множественные серии трансдукции. По сообщениям, аденоассоциированный вирус может интегрироваться в клеточную ДНК человека сайт-специфическим способом, что тем самым минимизирует возможность инсерционного мутагенеза и вариабельность экспрессии встроенных генов, характерную для ретровирусной инфекции. Кроме того, инфекции аденоассоциированного вируса дикого типа прослеживались в тканевой культуре более чем через 100 пересевов в отсутствие селективного давления, что позволяет предположить, что геномная интеграция аденоассоциированного вируса является относительно стабильной.

Аденоассоциированный вирус также может функционировать экстрахромосомным способом.

Другие векторы включают плазмидные векторы. Плазмидные векторы подробно описаны в данной области техники и хорошо известны специалисту. См., например, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. В последние несколько лет было обнаружено, что плазмидные векторы особенно предпочтительны для доставки генов в клетки *in vivo* из-за их неспособности в них реплицироваться и интегрироваться в геном хозяина. Однако данные плазмиды, содержащие промотор, совместимый с клеткой-хозяином, могут экспрессировать пептид с гена, функционально кодированного в плазмиде. Некоторые широко используемые плазмиды, доступные от коммерческих поставщиков, включают pBR322, pUC18, pUC19 различные плазмиды pcDNA, pRC/CMV, различные плазмиды pCMV, pSV40 и pBlueScript. Дополнительные примеры конкретных плазмид включают pcDNA3.1, номер по каталогу V79020; pcDNA3.1/hygro, номер по каталогу V87020; pcDNA4/myc-His, номер по каталогу V86320; и pBudCE4.1, номер по каталогу V53220, все от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния). Другие плазмиды хорошо известны специалисту в данной области техники. Кроме того, плазмиды могут быть индивидуально разработаны с использованием стандартных методов молекулярной биологии для удаления и/или добавления конкретных фрагментов ДНК.

В одной из систем экспрессии у насекомых, которую можно использовать для получения белков согласно настоящему изобретению, используют вирус ядерного полигиброза *Autographa californica* (AcNPV) в качестве вектора для экспрессии чужеродных генов. Указанный вирус выращивают в клетках *Spodoptera frugiperda*. Кодированная последовательность может быть клонирована в нежизненно важные области (например, ген polyhedron) вируса и помещена под контроль промотора ACNPV (например, промотор polyhedron). Успешное встраивание кодирующей последовательности приведет к инактивации гена polyhedron и образованию "невкрапленного" рекомбинантного вируса (т.е. вируса, у которого отсутствует белковоподобная оболочка, кодируемая геном polyhedron). Затем данные рекомбинантные вирусы используют для инфицирования клеток *Spodoptera frugiperda*, в которых экспрессируется встроенный ген (см., например, Smith et al. (1983), *J. Virol.*, 46:584; патент США № 4215051). Дополнительные примеры данной системы экспрессии можно найти в Ausubel et al., eds. (1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. 2, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience.

Другая система, которую можно использовать для экспрессии белков согласно настоящему изобретению, представляет собой систему экспрессии гена глутаминсинтетазы, также называемую "системой экспрессии GS" (Lonza Biologics PLC, Беркшир, Соединенное Королевство). Данная система экспрессии

подробно описана в патенте США № 5981216.

В клетках-хозяевах млекопитающих можно использовать ряд систем экспрессии на основе вирусов. В случаях когда в качестве вектора экспрессии используют аденовирус, кодирующая последовательность может быть лигирована с комплексом контроля транскрипции/трансляции аденовируса, например поздним промотором и состоящей из трех частей лидерной последовательностью. Затем данный химерный ген может быть встроен в аденовирусный геном путем рекомбинации *in vitro* или *in vivo*. Встраивание в нежизненно важную область вирусного генома (например, область E1 или E3) приведет к рекомбинантному вирусу, который является жизнеспособным и способен экспрессировать пептид в инфицированных хозяевах (см., например, Logan & Shenk (1984), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81:3655). В качестве альтернативы, можно использовать промотор осповакцины 7.5 К. См., например, Mackett et al. (1982), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79:7415; Mackett et al. (1984), J. Virol., 49:857; Panicali et al. (1982), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79:4927.

Для повышения эффективности получения могут быть разработаны полинуклеотиды, кодирующие многочисленные единицы белка согласно настоящему изобретению, разделенные сайтами ферментативного расщепления. Полученный полипептид может быть расщеплен (например, путем обработки соответствующим ферментом) с получением полипептидных единиц. Это может увеличивать выход полипептидов, управляемых одним промотором. При использовании в соответствующих вирусных системах экспрессии направление трансляции каждого полипептида, кодируемого мРНК, происходит внутри транскрипта, например, участком внутренней посадки рибосомы, IRES. Таким образом, полицистронная конструкция направляет транскрипцию одной крупной полицистронной мРНК, которая, в свою очередь, направляет трансляцию многочисленных отдельных полипептидов. Данный подход исключает образование и ферментативный процессинг полипротеинов и может значительно увеличивать выход полипептидов под управлением одного промотора. Векторы, используемые для трансформации, как правило, будут содержать селективируемый маркер, используемый идентификации трансформантов. В бактериальных системах он может включать ген резистентности к антибиотику, такому как ампициллин или канамицин. Селективируемые маркеры для применения в культивируемых клетках млекопитающих включают гены, которые придают резистентность к лекарственным средствам, таким как неомицин, гиромоцин и метотрексат. Селективируемый маркер может представлять собой амплифицируемый селективируемый маркер. Одним из амплифицируемых селективируемых маркеров является ген дигидрофолатредуктазы (DHFR). Simonsen C.C. et al. (1983), Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80:2495-9. Селективируемые маркеры рассмотрены Thilly (1986), Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, Mass., и выбор селективируемых маркеров находится в рамках компетенции специалиста в данной области техники.

Селективируемые маркеры могут быть введены в клетку в отдельной плазмиде одновременно с представляющим интерес геном или они могут быть введены в той же плазмиде. В случае одной плазмиды селективируемый маркер и представляющий интерес ген могут находиться под контролем разных промоторов или одного и того же промотора, в случае последнего расположения образуется полицистронная мРНК. Конструкции данного типа известны в данной области техники (например, патент США № 4713339). Векторы экспрессии могут кодировать метки, которые позволяют легко очищать полученный рекомбинантным способом белок. Примеры включают, но не ограничиваются перечисленными, вектор pUR278 (Ruther et al. (1983), EMBO J., 2:1791), в котором кодирующие последовательности для экспрессируемого белка могут быть лигированы в вектор в рамке с lac z-кодирующей областью, так что образуется меченый гибридный белок; векторы pGEX могут быть использованы для экспрессии белков согласно настоящему изобретению с меткой в виде глутатион-S-трансферазы (GST). Данные белки обычно являются растворимыми и могут быть легко очищены от клеток путем адсорбции на глутатион-агарозных гранулах с последующим элюированием в присутствии свободного глутатиона. Векторы содержат сайты расщепления (протеаза, представляющая собой тромбин или фактор Ха, или PRESSION PROTEASE™ (Pharmacia, Пипак, Нью-Джерси)) для легкого удаления метки после очистки.

Затем вектор или векторы экспрессии трансфицируют или совместно трансфицируют в подходящую целевую клетку, которая будет экспрессировать полипептиды. Методы трансфекции, известные в данной области техники, включают, но не ограничиваются перечисленными: осаждение фосфатом кальция (Wigler et al. (1978), Cell, 14:725), электропорацию (Neumann et al. (1982), EMBO J., 1:841) и реагенты на основе липосом. Для экспрессии белков, описанных в настоящем документе, можно применять различные векторные системы, использующие механизмы экспрессии хозяина, включая как прокариотические, так и эукариотические клетки. Данные системы включают, но не ограничиваются перечисленными, микроорганизмы, такие как бактерии (например, *E. coli*), трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии из ДНК бактериофага или плазмидной ДНК, содержащими соответствующую кодирующую последовательность;

дрожжевые или мицелиальные грибы, трансформированные рекомбинантными векторами экспрессии дрожжей или грибов, содержащими соответствующую кодирующую последовательность;

системы клеток насекомых, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии (например, бакуловирусом), содержащими соответствующую кодирующую последовательность;

системы клеток растений, инфицированные рекомбинантными вирусными векторами экспрессии

(например, вирус мозаики цветной капусты или вирус табачной мозаики) или трансформированные рекомбинантными плазмидными векторами экспрессии (например, Ti-плазида), содержащими соответствующую кодирующую последовательность; или

системы клеток животных, включая клетки млекопитающих (например, клетки НЕК293, CHO, Cos, HeLa, HKB11 и ВНК).

В одном из вариантов реализации клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку. В настоящем описании термин "эукариотическая клетка" относится к любой клетке животного или растения, содержащей характерное ядро. Эукариотические клетки животных включают клетки позвоночных, например, млекопитающих и клетки беспозвоночных, например, насекомых. Эукариотические клетки растений, в частности, могут включать без ограничения клетки дрожжей. Эукариотическая клетка отличается от прокариотической клетки, например, бактерий.

В некоторых вариантах реализации эукариотическая клетка представляет собой клетку млекопитающего. Клетка млекопитающего представляет собой любую клетку, полученную от млекопитающего. Клетки млекопитающих, в частности, включают, но не ограничиваются перечисленными, линии клеток млекопитающих. В одном из вариантов реализации клетка млекопитающего представляет собой клетку человека. В другом варианте реализации клетка млекопитающего представляет собой клетку НЕК293, которая представляет собой линию клеток мезонефроса человека. Клетки НЕК293 доступны в виде CRL-1533 от Американской коллекции типовых культур, Манассас, Вирджиния, и в виде клеток 293-H, номер по каталогу 11631-017, или клеток 293-F, номер по каталогу 11625-019 от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния). В некоторых вариантах реализации клетка млекопитающего представляет собой клетку PER.C6, которая представляет собой линию клеток человека, полученную из сетчатки. Клетки PER.C6 доступны от Scusell (Лейден, Нидерланды). В других вариантах реализации клетка млекопитающего представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO). Клетки CHO доступны от Американской коллекции типовых культур, Манассас, Вирджиния (например, CHO-K1; CCL-61). В других вариантах реализации клетка млекопитающего представляет собой клетку почки новорожденного хомяка (ВНК). Клетки ВНК доступны от Американской коллекции типовых культур, Манассас, Вирджиния (например, CRL-1632). В некоторых вариантах реализации клетка млекопитающего представляет собой клетку HKB11, которая представляет собой гибридную линию клеток на основе линии клеток НЕК293 и В-клеток человека. Mei et al., *Mol Biotechnol.*, 34(2):165-78 (2006).

В одном из вариантов реализации плазмиду, содержащую последовательность, кодирующую гибридный FVIII(X)-Fc, последовательность, кодирующую гибридный VWFфрагмент фактора фон Виллебранда-L-Fc, или обе последовательности и селективируемый маркер, например, ген резистентности к зеоцину, трансфицируют в клетки НЕК293 для получения химерного белка.

В другом варианте реализации плазмиду, содержащую последовательность, кодирующую гибридный FVIII-Fc, последовательность, кодирующую гибридный VWFфрагмент фактора фон Виллебранда-XTEN-L-Fc, или обе последовательности и селективируемый маркер, например, ген резистентности к зеоцину, трансфицируют в клетки НЕК293 для получения химерного белка.

В других вариантах реализации плазмиду, содержащую последовательность, кодирующую гибридный FVIII(X)-Fc, последовательность, кодирующую Fc, или обе последовательности и селективируемый маркер, например, ген резистентности к зеоцину, трансфицируют в клетки НЕК293 для получения химерного белка.

В некоторых вариантах реализации первую плазмиду, содержащую последовательность, кодирующую гибридный FVIII(X)-Fc и первый селективируемый маркер, например ген резистентности к зеоцину, и вторую плазмиду, содержащую последовательность, кодирующую Fc, или последовательность, кодирующую VWFфрагмент фактора фон Виллебранда-L-Fc и второй селективируемый маркер, например ген резистентности к неомицину, и третью плазмиду, содержащую последовательность, кодирующую протеинконвертазу, и третий селективируемый маркер, например ген резистентности к гигромицину, совместно трансфицируют в клетки НЕК293 для получения химерного белка. Указанная первая и вторая плазмиды могут быть введены в равных количествах (т.е. молярное соотношение 1:1) или они могут быть введены в неравных количествах.

В других вариантах реализации первую плазмиду, содержащую последовательность, кодирующую гибридный FVIII-Fc и первый селективируемый маркер, например ген резистентности к зеоцину, и вторую плазмиду, содержащую последовательность, кодирующую VWFфрагмент фактора фон Виллебранда-XTEN-L-Fc, и второй селективируемый маркер, например ген резистентности к неомицину, и третью плазмиду, содержащую последовательность, кодирующую протеинконвертазу, и третий селективируемый маркер, например ген резистентности к гигромицину, совместно трансфицируют в клетки НЕК293 для получения химерного белка. Указанная первая и вторая плазмиды могут быть введены в равных количествах (т.е. молярное соотношение 1:1) или они могут быть введены в неравных количествах.

В других вариантах реализации первую плазмиду, содержащую последовательность, кодирующую гибридный FVIII(X)-Fc и первый селективируемый маркер, например ген резистентности к зеоцину, и вторую плазмиду, содержащую последовательность, кодирующую VWFфрагмент фактора фон Виллебранда-XTEN-L-Fc, и второй селективируемый маркер, например ген резистентности к неомицину, и третью плазмиду,

миду, содержащую последовательность, кодирующую протеинконвертазу, и третий селективируемый маркер, например ген резистентности к гигромицину, совместно трансфицируют в клетки НЕК293 для получения химерного белка. Указанная первая и вторая плазмиды могут быть введены в равных количествах (т.е. молярное соотношение 1:1) или они могут быть введены в неравных количествах.

В некоторых вариантах реализации первую плазмиду, содержащую последовательность, кодирующую химерный белок FVIII (с или без XTEN)-F1-L1-V-XTEN-L2-F2 и первый селективируемый маркер, например ген резистентности к зеоцину, и вторую плазмиду, содержащую последовательность, кодирующую протеинконвертазу, и второй селективируемый маркер, например ген резистентности к гигромицину, совместно трансфицируют в клетки НЕК293 для получения химерного белка. Промоторы для последовательности, кодирующей FVIII(X)-Fc, и последовательности, кодирующей VWF-XTEN-Fc, могут быть разными или они могут быть одинаковыми.

В других вариантах реализации трансфицированные клетки являются стабильно трансфицированными. Данные клетки можно отбирать и хранить в виде стабильной линии клеток с использованием обычных методов, известных специалисту в данной области техники.

Клетки-хозяева, содержащие ДНК-конструкции белка, выращивают в соответствующей питательной среде. В настоящем описании термин "соответствующая питательная среда" означает среду, содержащую питательные вещества, необходимые для роста клеток. Питательные вещества, необходимые для роста клеток, могут включать источник углерода, источник азота, незаменимые аминокислоты, витамины, минералы и факторы роста. Среда может содержать один или более факторов отбора. Среда может содержать телячью сыворотку или фетальную телячью сыворотку (FCS). В одном из вариантов реализации среды по существу не содержат IgG. Питательная среда, как правило, будет обеспечивать отбор клеток, содержащих ДНК-конструкцию, например, путем отбора по чувствительности к лекарственному средству или дефициту незаменимого питательного вещества, который дополняет селективируемый маркер в ДНК-конструкции или совместно трансфицированный с ДНК-конструкцией. Культивируемые клетки млекопитающих обычно выращивают в коммерчески доступных содержащих сыворотку или бессывороточных средах (например, MEM, DMEM, DMEM/F12). В одном из вариантов реализации среда представляет собой CD293 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния). В другом варианте реализации среда представляет собой CD17 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния). Выбор среды, подходящей для конкретной линии клеток, находится в рамках компетенции специалиста в данной области техники.

Для совместной экспрессии двух полипептидных цепей химерного белка клетки-хозяева культивируют в условиях, обеспечивающих экспрессию обеих цепей. В настоящем описании термин "культивирование" относится к выдерживанию живых клеток *in vitro* в течение по меньшей мере определенного времени. Выдерживание может включать, но не обязательно включает, увеличение популяции живых клеток. Например, популяция клеток, выдерживаемых в культуре, может не меняться, но они по-прежнему являются жизнеспособными и способны продуцировать желаемый продукт, например, рекомбинантный белок или рекомбинантный гибридный белок. Подходящие условия для культивирования эукариотических клеток хорошо известны в данной области техники и включают соответствующий выбор питательных сред, добавок в питательные среды, температуры, pH, насыщения кислородом и т.п. Для коммерческих целей культивирование может включать использование любого из различных типов систем увеличения масштаба, включая шейкерные колбы, роллерные флаконы, биореакторы с полыми волокнами, биореакторы с механическим перемешиванием, эрлифтные биореакторы, волновые биореакторы и другие.

Условия для культивирования клеток также выбирают таким образом, чтобы обеспечить ассоциацию VWFфрагмента фактора фон Виллебранда с белком FVIII.

Условия, обеспечивающие экспрессию VWFфрагмента фактора фон Виллебранда и/или белка FVIII, могут включать присутствие источника витамина К. Например, в одном из вариантов реализации стабильно трансфицированные клетки НЕК293 культивируют в средах CD293 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) или средах OptiCHO (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния) с добавлением 4 мМ глутамин.

Один из аспектов настоящего изобретения относится к способу экспрессии, получения или продуцирования химерного белка согласно настоящему изобретению, включающему

- а) трансфекцию клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид, кодирующий химерный белок; и
- б) культивирование клетки-хозяина в культуральной среде в условиях, подходящих для экспрессии химерного белка, при которых происходит экспрессия химерного белка.

В других вариантах реализации белковый продукт, содержащий VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, связанный с последовательностью XTEN, или белок FVIII, связанный с последовательностью XTEN, секретируется в среды. Среда отделяют от клеток, концентрируют, фильтруют, а затем пропускают через две или три колонки для аффинной хроматографии, например колонку с белком А и одну или две анионообменные колонки.

Некоторые аспекты настоящего изобретения относятся к химерному белку, получаемому способами, описанными в настоящем документе.

Получение *in vitro* позволяет увеличивать масштаб для получения больших количеств желаемых измененных полипептидов согласно настоящему изобретению.

Методы культивирования клеток млекопитающих в условиях культивирования тканей известны в данной области техники и включают однородную суспензионную культуру, например, в эрлифтном реакторе или в реакторе с непрерывным перемешиванием, или культуру иммобилизованных или "захваченных" клеток, например, в полых волокнах, микрокапсулах, на агарозных микрогранулах или керамических картриджах. При необходимости и/или желании растворы полипептидов могут быть очищены обычными методами хроматографии, например, гель-фильтрации, ионообменной хроматографии, гидрофобной хроматографии (HIC), хроматографии на DEAE-целлюлозе или аффинной хроматографии.

Фармацевтическая композиция.

Композиции, содержащие химерный белок согласно настоящему изобретению, могут содержать подходящий фармацевтически приемлемый носитель. Например, они могут содержать вспомогательные вещества и/или дополнительные вещества, которые облегчают переработку активных соединений в препараты, предназначенные для доставки к месту действия.

Фармацевтическая композиция может быть представлена в форме для парентерального введения (т.е. внутривенного, подкожного или внутримышечного) путем болюсной инъекции. Составы для инъекции могут быть представлены в единичной лекарственной форме, например в ампулах или в многодозовых емкостях с добавлением консерванта. Композиции могут принимать такие формы, как суспензии, растворы или эмульсии в масляных или водных носителях, и могут содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие вещества. В качестве альтернативы, активный ингредиент может находиться в форме порошка для восстановления подходящим носителем, например, апиrogenной водой. Подходящие составы для парентерального введения также включают водные растворы активных соединений в водорастворимой форме, например водорастворимые соли. Кроме того, могут быть введены суспензии активных соединений в виде соответствующих масляных суспензий для инъекций. Подходящие липофильные растворители или носители включают жирные масла, например кунжутное масло, или синтетические эфиры жирных кислот, например этилолеат или триглицериды. Водные суспензии для инъекций могут содержать вещества, повышающие вязкость суспензии, включая, например, натрийкарбоксиметилцеллюлозу, сорбитол и декстран. Суспензия также может содержать стабилизаторы. Липосомы также можно использовать для инкапсулирования молекул согласно настоящему изобретению для доставки в клетки или интерстициальные пространства. Типичными фармацевтически приемлемыми носителями являются физиологически совместимые растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты, изотонические и замедляющие абсорбцию агенты, вода, физиологический раствор, фосфатный буферный раствор, декстроза, глицерин, этанол и т.п. В некоторых вариантах реализации композиция содержит изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как маннитол, сорбитол, или хлорид натрия. В других вариантах реализации композиции содержат фармацевтически приемлемые вещества, такие как смачивающие агенты, или незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие агенты или эмульгаторы, консерванты или буферы, которые увеличивают срок хранения или эффективность активных ингредиентов.

Композиции согласно настоящему изобретению могут находиться в различных формах, включая, например, жидкие лекарственные формы (например, растворы для инъекций и инфузий), дисперсии, суспензии, полужидкие и твердые лекарственные формы. Предпочтительная форма зависит от способа введения и терапевтического применения. Композиция может быть представлена в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или другой упорядоченной структуры, подходящей для высокой концентрации лекарственного средства. Стерильные растворы для инъекций могут быть приготовлены путем включения активного ингредиента в требуемом количестве в соответствующий растворитель с одним ингредиентом или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, при необходимости с последующей стерилизацией путем фильтрации. Как правило, дисперсии готовят путем включения активного ингредиента в стерильный носитель, содержащий основную дисперсионную среду и другие требуемые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных растворов для инъекций, предпочтительные способы получения представляют собой вакуумную сушку и сушку методом сублимации, которые позволяют получить порошок активного ингредиента, а также любого желаемого дополнительного ингредиента из предварительно стерилизованного путем фильтрации раствора. Необходимая текучесть раствора может быть сохранена, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии или путем использования поверхностно-активных веществ. Пролонгированную абсорбцию композиций для инъекций можно вызвать путем включения в композицию агента, который отсрочивает абсорбцию, например, моностеаратных солей и желатина. Активный ингредиент может быть включен в состав или устройство с контролируемым высвобождением. Примеры таких составов и устройств включают имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Могут быть использованы биоразлагаемые биосовместимые полимеры, например, этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфиры и полимолочная кислота. Способы получения таких составов и устройств известны в данной области техники. См., например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Депо-составы для инъекций могут быть получены путем образования микроинкапсулированных матриц лекарственного средства в биоразлагаемых полимерах, таких как полилактид-полигликолид. В зависимости от соотношения лекарственного средства и полимера, и природы используемого полимера, можно контролировать скорость высвобождения лекарственного средства. Другие типичные биоразлагаемые полимеры представляют собой полиортоэфиры и полиангидриды. Депо-составы для инъекций также могут быть получены путем включения лекарственного средства в липосомы или микроэмульсии.

В композиции могут быть включены дополнительные активные соединения. В одном из вариантов реализации химерный белок согласно настоящему изобретению включают в состав совместно с другим фактором свертывания крови или его вариантом, фрагментом, аналогом или производным. Например, фактор свертывания крови включает, но не ограничивается ими, фактор V, фактор VII, фактор VIII, фактор IX, фактор X, фактор XI, фактор XII, фактор XIII, протромбин, фибриноген, фактор фон Виллебранда или рекомбинантный растворимый тканевой фактор (rsTF), или активированные формы любого из предшествующих. Фактор свертывания крови гемостатического средства также может включать антифибринолитические лекарственные средства, например, эписилон-аминокапроновую кислоту, транексамовую кислоту.

Режимы дозирования можно корректировать для обеспечения оптимального желаемого ответа. Например, можно вводить однократную болюсную дозу, можно вводить несколько отдельных доз в течение некоторого времени или дозу можно пропорционально уменьшать или увеличивать в зависимости от обстоятельств терапевтической ситуации. Предпочтительным является получение композиций для парентерального введения в единичной лекарственной форме для удобства введения и однородности дозы. См., например, Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, Pa., 1980). В дополнение к активному соединению жидкая лекарственная форма может содержать инертные ингредиенты, такие как вода, этиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, диметилформамид, масла, глицерин, тетрагидрофуруриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры сорбитана и жирных кислот.

Неограничивающие примеры подходящих фармацевтических носителей также описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, E. W. Martin. Некоторые примеры вспомогательных веществ включают крахмал, глюкозу, лактозу, сахарозу, желатин, солод, рис, муку, мел, силикагель, стеарат натрия, моностеарат глицерина, тальк, хлорид натрия, сухое обезжиренное молоко, глицерин, пропиленгликоль, воду, этанол и т.п. Композиция также может содержать рН буферные реагенты и смачивающие агенты или эмульгаторы. Для перорального введения фармацевтическая композиция может принимать форму таблеток или капсул, полученных обычными способами. Композиция также может быть получена в виде жидкости, например, сиропа или суспензии. Указанная жидкость может содержать суспендирующие агенты (например, сорбитовый сироп, производные целлюлозы или гидрогенизированные пищевые жиры), эмульгаторы (лецитин или камедь), неводные носители (например, миндальное масло, масляные сложные эфиры, этиловый спирт или фракционированные растительные масла) и консерванты (например, метил- или пропил-п-гидроксibenзоаты или сорбиновая кислота). Препараты также могут содержать ароматизаторы, красители и подсластители. В качестве альтернативы, композиция может быть представлена в виде сухого продукта для восстановления водой или другим подходящим носителем.

Для трансбуккального введения композиция может принимать форму таблеток или пастилок в соответствии с традиционными протоколами.

Для введения путем ингаляции соединения для применения согласно настоящему изобретению удобным образом доставляют в форме распыляемого аэрозоля, содержащего или не содержащего вспомогательные вещества, или в форме спрея-аэрозоля из находящейся под давлением упаковки или распылителя возможно с использованием пропеллента, например, дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана, диоксида углерода или другого подходящего газа. В случае аэрозоля, находящегося под давлением, единицу дозирования можно определять путем снабжения клапаном для доставки отмеренного количества. Могут быть получены капсулы и картриджи, например, из желатина для применения в ингаляторе или инсуффляторе, содержащие порошковую смесь соединения и подходящей порошковой основы, такой как лактоза или крахмал. Фармацевтическая композиция также может быть получена в форме для ректального введения в виде суппозитория или удерживающей клизмы, например, содержащей традиционные основы для суппозиторий, такие как масло какао или другие глицериды.

В одном из вариантов реализации фармацевтическая композиция содержит химерный белок, полинуклеотид, кодирующий указанный химерный белок, вектор, содержащий полинуклеотид, или клетку-хозяина, содержащую вектор, и фармацевтически приемлемый носитель. Белок FVIII в химерном белке имеет увеличенный период полувыведения по сравнению с белком FVIII дикого типа или соответствующим белком FVIII, не содержащим VWFфрагмент фактора фон Виллебранда. В одном из вариантов реализации период полувыведения белка FVIII по меньшей мере примерно в 1,5 раза, по меньшей мере примерно в 2 раза, по меньшей мере примерно в 2,5 раза, по меньшей мере примерно в 3 раза, по меньшей мере примерно в 4 раза, по меньшей мере примерно в 5 раз, по меньшей мере примерно в 6 раз, по меньшей мере примерно в 7 раз, по меньшей мере примерно в 8 раз, по меньшей мере примерно в 9 раз, по меньшей мере примерно в 10 раз, по меньшей мере примерно в 11 раз или по меньшей мере примерно

в 12 раз больше чем у FVIII дикого типа. В другом варианте реализации период полувыведения фактора VIII составляет по меньшей мере примерно 17 ч, по меньшей мере примерно 18 ч, по меньшей мере примерно 19 ч, по меньшей мере примерно 20 ч, по меньшей мере примерно 21 ч, по меньшей мере примерно 22 ч, по меньшей мере примерно 23 ч, по меньшей мере примерно 24 ч, по меньшей мере примерно 25 ч, по меньшей мере примерно 26 ч, по меньшей мере примерно 27 ч, по меньшей мере примерно 28 ч, по меньшей мере примерно 29 ч, по меньшей мере примерно 30 ч, по меньшей мере примерно 31 ч, по меньшей мере примерно 32 ч, по меньшей мере примерно 33 ч, по меньшей мере примерно 34 ч, по меньшей мере примерно 35 ч, по меньшей мере примерно 36 ч, по меньшей мере примерно 48 ч, по меньшей мере примерно 60 ч, по меньшей мере примерно 72 ч, по меньшей мере примерно 84 ч, по меньшей мере примерно 96 ч или по меньшей мере примерно 108 ч. В некоторых вариантах реализации композицию вводят путем, выбранным из группы, состоящей из топического введения, внутриглазного введения, парентерального введения, интратекального введения, субдурального введения и перорального введения. Парентеральное введение может представлять собой внутривенное или подкожное введение.

В других вариантах реализации композицию применяют для лечения заболевания или состояния, связанного с кровотечениями, у нуждающегося в этом субъекта. Указанное заболевание или состояние, связанное с кровотечениями, выбрано из группы, состоящей из нарушения свертываемости крови, сопровождающегося повышенной кровоточивостью, гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения в ротовой полости, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в ротовой полости, травмы, травмы головы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшинного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома костей, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве, кровотечения во влагалище подвздошно-поясничной мышцы и их любых комбинаций. В других вариантах реализации субъекту назначено оперативное вмешательство. В других вариантах реализации лечение является профилактическим или по необходимости.

Генная терапия.

Химерный белок согласно настоящему изобретению может быть получен *in vivo* у млекопитающего, например пациента, представляющего собой человека, с использованием подхода на основе генной терапии для лечения заболевания или нарушения, сопровождающегося повышенной кровоточивостью, выбранного из группы, состоящей из нарушения свертываемости крови, сопровождающегося повышенной кровоточивостью, гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения в ротовой полости, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в ротовой полости, травмы, травмы головы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшинного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома костей, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве, кровотечения во влагалище подвздошно-поясничной мышцы. В одном из вариантов реализации заболевание или нарушение, сопровождающееся повышенной кровоточивостью, представляет собой гемофилию. В другом варианте реализации заболевание или нарушение, сопровождающееся повышенной кровоточивостью, представляет собой гемофилию А. Данный подход включает введение подходящей нуклеиновой кислоты, кодирующей химерный белок, функционально связанной с подходящими последовательностями, контролирующими экспрессию. В определенном варианте реализации данные последовательности включены в вирусный вектор. Подходящие вирусные векторы для такой генной терапии включают аденовирусные векторы, лентивирусные векторы, бакуловирусные векторы, векторы на основе вируса Эпштейна-Барра, паповавирусные векторы, векторы на основе вируса осповакцины, векторы на основе вируса простого герпеса и векторы на основе аденоассоциированного вируса (AAV). Вирусный вектор может представлять собой дефектный по репликации вирусный вектор. В других вариантах реализации аденовирусный вектор содержит делецию в гене E1 или гене E3. При использовании аденовирусного вектора млекопитающее могут не подвергать воздействию нуклеиновой кислотой, кодирующей селективируемый маркерный ген. В других вариантах реализации последовательности включают в невирусный вектор, известный специалисту в данной области техники.

Способы применения химерного белка.

Настоящее изобретение относится к способу применения химерного белка, описанного в настоящем документе, для предотвращения или ингибирования связывания VWFэндогенного фактора фон Виллебранда с белком FVIII. Настоящее изобретение также относится к способу применения химерного белка, содержащего белок FVIII, связанный с XTEN и константной областью Ig или ее частью.

Один из аспектов настоящего изобретения относится к предотвращению или ингибированию взаимодействия FVIII с VWFэндогенным фактором фон Виллебранда путем блокировки или защиты сайта VWFсвязывания фактора фон Виллебранда в FVIII от VWFэндогенного фактора фон Виллебранда, и в то же время к увеличению периода полувыведения белка FVIII с использованием последовательности XTEN в комбинации с константной областью Ig или ее частью, которая также может представлять собой "увеличитель" периода полувыведения. Один из вариантов реализации настоящего изобретения относится к способу конструирования белка FVIII, имеющего более длительный период полувыведения, чем FVIII дикого типа. В одном из вариантов реализации последовательность XTEN ингибирует или предот-

вращает взаимодействие белка FVIII в химерном белке с VWFЭндогенным фактором фон Виллебранда. В другом варианте реализации константная область Ig или ее часть ингибирует или предотвращает взаимодействие белка FVIII с VWFЭндогенным фактором фон Виллебранда. Химерный белок, применяемый в данном способе, включает любой один или более химерных белков, описанных в настоящем документе.

Другой аспект настоящего изобретения включает способ введения нуждающемуся в этом субъекту химерного белка, содержащего белок FVIII, имеющий более длительный период полувыведения, чем FVIII дикого типа, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту химерного белка, описанного в настоящем документе. Один из вариантов реализации настоящего изобретения относится к способу применения последовательности XTEN и константной области Ig или ее части для увеличения периода полувыведения белка FVIII, и VWFфрагмента фактора фон Виллебранда для предотвращения или ингибирования взаимодействия VWFЭндогенного фактора фон Виллебранда с белком FVIII. Белок FVIII, связанный с последовательностью XTEN (например, FVIII(X)), а затем связанный или ассоциированный с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, огражден или защищен от пути клиренса VWF и, таким образом, демонстрирует пониженный клиренс по сравнению с белком FVIII, не связанный с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда. Таким образом, защищенный белок FVIII демонстрирует максимальное увеличение периода полувыведения по сравнению с белком FVIII, не связанным или не ассоциированным с последовательностью XTEN и VWFфрагментом фактора фон Виллебранда. В некоторых вариантах реализации белок FVIII, ассоциированный с или защищенный VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, и связанный с последовательностью XTEN, не выводится рецептором, ответственным за клиренс VWF. В других вариантах реализации белок FVIII, ассоциированный с или защищенный VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, и связанный с последовательностью XTEN, выводится из системы медленнее, чем белок FVIII, который не ассоциирован с или не защищен VWFфрагментом фактора фон Виллебранда и не связан с последовательностью XTEN.

В соответствии с одним из аспектов химерный белок, содержащий белок FVIII, связанный с последовательностью XTEN, или белок FVIII, связанный или ассоциированный с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, связанным с XTEN, демонстрирует пониженный клиренс из кровообращения, поскольку указанный VWFфрагмент фактора фон Виллебранда не содержит сайт связывания с рецептором, ответственным за клиренс VWF. VWFфрагмент фактора фон Виллебранда предотвращает или ингибирует клиренс FVIII, связанного или ассоциированного с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, из системы по пути клиренса VWF. Фрагменты VWF, подходящие для настоящего изобретения, также могут обеспечивать по меньшей мере одно или более защитных свойств в отношении FVIII, подобных VWF, которые обеспечивает эндогенный VWF. В некоторых вариантах реализации VWFфрагмент фактора фон Виллебранда или последовательность XTEN также может маскировать один или более сайтов связывания с рецептором, ответственным за клиренс FVIII, тем самым предотвращая клиренс FVIII по собственному пути клиренса.

В некоторых вариантах реализации предотвращение или ингибирование VWFфрагментом фактора фон Виллебранда или последовательностью XTEN связывания белка FVIII с VWFЭндогенным фактором фон Виллебранда может происходить *in vitro* или *in vivo*.

Также предложен способ увеличения периода полувыведения белка FVIII, включающий введение химерного белка, описанного в настоящем документе, нуждающемуся в этом субъекту. Период полувыведения неактивированного FVIII, связанного или ассоциированного с полноразмерным VWF, составляет от примерно 12 до 14 ч в плазме крови. При болезни фон Виллебранда (БВ) 3 типа, когда в кровообращении почти отсутствует VWF, период полувыведения FVIII составляет лишь примерно шесть часов, что у таких пациентов приводит к симптомам гемофилии А от легкой до умеренной из-за пониженных концентраций FVIII. Период полувыведения белка FVIII, связанного или ассоциированного с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда или последовательностью XTEN, согласно настоящему изобретению может увеличиваться по меньшей мере примерно в 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9 или 4,0 раза по сравнению с периодом полувыведения неактивированного FVIII, связанного или ассоциированного с полноразмерным VWF.

В одном из вариантов реализации период полувыведения белка FVIII, связанного или ассоциированного с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, или связанного с константной областью Ig или ее частью в химерном белке, содержащем последовательность XTEN, увеличивается по меньшей мере примерно в 2, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 7, 8, 9 или 10 раз по сравнению с периодом полувыведения неактивированного FVIII, связанного или ассоциированного с полноразмерным VWF. В другом варианте реализации период полувыведения белка FVIII, связанного или ассоциированного с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда или константной областью Ig или ее частью в химерном белке, содержащем последовательность XTEN, увеличивается от примерно в 2 до примерно в 5 раз, от примерно в 3 до примерно в 10 раз, от примерно в 5 до примерно в 15 раз, от примерно в 10 до примерно в 20 раз, от примерно в 15 до примерно в 25 раз, от примерно в 20 до примерно в 30 раз, от примерно в 25 до примерно в 35 раз, от примерно в 30 до примерно в 40 раз, от примерно в 35 до примерно в 45 раз по сравнению с периодом полувыведения неактивированного FVIII, связанного или ассоциированного с полноразмерным VWF, или FVIII дикого типа. В конкретном варианте реализации период полувыведения бел-

ка FVIII, связанного или ассоциированного с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, или связанного с константной областью Ig в химерного белке, содержащем последовательность XTEN, увеличивается по меньшей мере примерно в 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 или 40 раз по сравнению с периодом полувыведения FVIII дикого типа у мышей с двойным нокаутом FVIII и VWF.

В некоторых вариантах реализации период полувыведения химерного белка, содержащего VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, слитый с первой константной областью Ig или ее частью, например первой областью Fc, и последовательностью XTEN, и белком FVIII, связанным с последовательностью XTEN и второй константной областью Ig или ее частью, например второй областью Fc, больше периода полувыведения FVIII, ассоциированного с VWFэндогенным фактором фон Виллебранда. В других вариантах реализации период полувыведения химерного белка по меньшей мере примерно в 1,5, 2, 2,5, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,5 или 5,0 раз больше периода полувыведения FVIII дикого типа или белка FVIII, ассоциированного с VWFэндогенным фактором фон Виллебранда.

В некоторых вариантах реализации благодаря настоящему изобретению период полувыведения белка FVIII увеличен по сравнению с белком FVIII, не содержащим VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, или FVIII дикого типа. Период полувыведения химерного белка согласно настоящему изобретению по меньшей мере примерно в 1,5 раза, по меньшей мере примерно в 2 раза, по меньшей мере примерно в 2,5 раза, по меньшей мере примерно в 3 раза, по меньшей мере примерно в 4 раза, по меньшей мере примерно в 5 раз, по меньшей мере примерно в 6 раз, по меньшей мере примерно в 7 раз, по меньшей мере примерно в 8 раз, по меньшей мере примерно в 9 раз, по меньшей мере примерно в 10 раз, по меньшей мере примерно в 11 раз или по меньшей мере примерно в 12 раз больше периода полувыведения белка FVIII, не содержащего VWFфрагмент фактора фон Виллебранда, или FVIII дикого типа. В одном из вариантов реализации период полувыведения FVIII от примерно в 1,5 раза до примерно в 20 раз, от примерно в 1,5 раза до примерно в 15 раз или от примерно в 1,5 раза до примерно в 10 раз больше периода полувыведения FVIII дикого типа.

В другом варианте реализации период полувыведения FVIII увеличен от примерно в 2 раза до примерно в 10 раз, от примерно в 2 раза до примерно в 9 раз, от примерно в 2 раза до примерно в 8 раз, от примерно в 2 раза до примерно в 7 раз, от примерно в 2 раза до примерно в 6 раз, от примерно в 2 раза до примерно в 5 раз, от примерно в 2 раза до примерно в 4 раза, от примерно в 2 раза до примерно в 3 раза, от примерно в 2,5 раза до примерно 10 раз, от примерно в 2,5 раза до примерно в 9 раз, от примерно в 2,5 раза до примерно в 8 раз, от примерно в 2,5 раза до примерно в 7 раз, от примерно в 2,5 раза до примерно в 6 раз, от примерно в 2,5 раза до примерно в 5 раз, от примерно в 2,5 раза до примерно в 4 раза, от примерно в 2,5 раза до примерно в 3 раза, от примерно в 3 раза до примерно в 10 раз, от примерно в 3 раза до примерно в 9 раз, от примерно в 3 раза до примерно в 8 раз, от примерно в 3 раза до примерно в 7 раз, от примерно в 3 раза до примерно в 6 раз, от примерно в 3 раза до примерно в 5 раз, от примерно в 3 раза до примерно в 4 раза, от примерно в 4 раза до примерно в 6 раз, от примерно в 5 раз до примерно в 7 раз или от примерно в 6 раз до примерно в 8 раз по сравнению с FVIII дикого типа или белком FVIII, не содержащим VWFфрагмент фактора фон Виллебранда. В других вариантах реализации период полувыведения химерного белка согласно настоящему изобретению составляет по меньшей мере примерно 17 ч, по меньшей мере примерно 18 ч, по меньшей мере примерно 19 ч, по меньшей мере примерно 20 ч, по меньшей мере примерно 21 ч, по меньшей мере примерно 22 ч, по меньшей мере примерно 23 ч, по меньшей мере примерно 24 ч, по меньшей мере примерно 25 ч, по меньшей мере примерно 26 ч, по меньшей мере примерно 27 ч, по меньшей мере примерно 28 ч, по меньшей мере примерно 29 ч, по меньшей мере примерно 30 ч, по меньшей мере примерно 31 ч, по меньшей мере примерно 32 ч, по меньшей мере примерно 33 ч, по меньшей мере примерно 34 ч, по меньшей мере примерно 35 ч, по меньшей мере примерно 36 ч, по меньшей мере примерно 48 ч, по меньшей мере примерно 60 ч, по меньшей мере примерно 72 ч, по меньшей мере примерно 84 ч, по меньшей мере примерно 96 ч или по меньшей мере примерно 108 ч. В других вариантах реализации период полувыведения химерного белка согласно настоящему изобретению составляет от примерно 15 ч до примерно двух недель, от примерно 16 ч до примерно одной недели, от примерно 17 ч до примерно одной недели, от примерно 18 ч до примерно одной недели, от примерно 19 ч до примерно одной недели, от примерно 20 ч до примерно одной недели, от примерно 21 ч до примерно одной недели, от примерно 22 ч до примерно одной недели, от примерно 23 ч до примерно одной недели, от примерно 24 ч до примерно одной недели, от примерно 36 ч до примерно одной недели, от примерно 48 ч до примерно одной недели, от примерно 60 ч до примерно одной недели, от примерно 24 ч до примерно шести дней, от примерно 24 ч до примерно пяти дней, от примерно 24 ч до примерно четырех дней, от примерно 24 ч до примерно трех дней или от примерно 24 ч до примерно двух дней.

В некоторых вариантах реализации средний период полувыведения химерного белка согласно настоящему изобретению у субъекта составляет примерно 15 ч, примерно 16 ч, примерно 17 ч, примерно 18 ч, примерно 19 ч, примерно 20 ч, примерно 21 ч, примерно 22 ч, примерно 23 ч, примерно 24 ч (1 день), примерно 25 ч, примерно 26 ч, примерно 27 ч, примерно 28 ч, примерно 29 ч, примерно 30 ч, примерно 31 ч, примерно 32 ч, примерно 33 ч, примерно 34 ч, примерно 35 ч, примерно 36 ч, примерно 40 ч, примерно 44 ч, примерно 48 ч (2 дня), примерно 54 ч, примерно 60 ч, примерно 72 ч (3 дня), при-

мерно 84 ч, примерно 96 ч (4 дня), примерно 108 ч, примерно 120 ч (5 дней), примерно 6 дней, примерно 7 дней (одна неделя), примерно 8 дней, примерно 9 дней, примерно 10 дней, примерно 11 дней, примерно 12 дней, примерно 13 дней или примерно 14 дней.

Более того, согласно настоящему изобретению предложен способ лечения или предотвращения заболевания или нарушения, сопровождающегося повышенной кровоточивостью, включающий введение эффективного количества химерного белка. В одном из вариантов реализации указанное заболевание или нарушение, сопровождающееся повышенной кровоточивостью, выбрано из группы, состоящей из нарушения свертываемости крови, сопровождающегося повышенной кровоточивостью, гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения в ротовой полости, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в ротовой полости, травмы, травмы головы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшинного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома костей, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве и кровотечения во влагалище подвздошно-поясничной мышцы. В конкретном варианте реализации заболевание или нарушение, сопровождающееся повышенной кровоточивостью, представляет собой гемофилию А. Химерный белок, содержащий последовательность XTEN и константную область Ig или ее часть в комбинации с VWFфрагментом фактора фон Виллебранда, описанным в настоящем документе, который предотвращает или ингибирует взаимодействие белка FVIII с VWFэндогенным фактором фон Виллебранда, полученный в соответствии с настоящим изобретением, имеет множество применений, очевидных для специалиста в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, способы лечения субъекта с нарушением гемостаза и способы лечения субъекта, нуждающегося в общем гемостатическом средстве. Один из вариантов реализации настоящего изобретения относится к способу лечения субъекта с нарушением гемостаза, включающему введение терапевтически эффективного количества химерного белка.

Часть химерного белка, представляющая собой белок FVIII, лечит или предотвращает нарушение гемостаза, выступая в качестве кофактора для фактора IX на отрицательно заряженной фосфолипидной поверхности, тем самым образуя комплекс Xase. Связывание активированных факторов свертывания крови с фосфолипидной поверхностью локализует данный процесс в местах повреждения сосудов. На фосфолипидной поверхности фактор VIIIa увеличивает максимальную скорость активации фактора X фактором IXa приблизительно в 200000 раз, что приводит к значительному второму выбросу тромбина.

Химерный белок согласно настоящему изобретению можно применять для лечения любого нарушения гемостаза. Нарушения гемостаза, которые можно лечить путем введения химерного белка согласно настоящему изобретению, включают, но не ограничиваются перечисленными: гемофилию А, а также дефициты или структурные нарушения, относящиеся к фактору VIII. В одном из вариантов реализации нарушение гемостаза представляет собой гемофилию А.

Химерный белок согласно настоящему изобретению можно применять профилактически для лечения субъекта с нарушением гемостаза. Химерный белок согласно настоящему изобретению можно применять для лечения острого эпизода кровотечения у субъекта с нарушением гемостаза. В другом варианте реализации нарушение гемостаза может являться следствием дефекта фактора свертывания крови, например, фактора фон Виллебранда. В одном из вариантов реализации нарушение гемостаза представляет собой наследственное нарушение. В другом варианте реализации нарушение гемостаза представляет собой приобретенное нарушение. Приобретенное нарушение может являться следствием первичного вторичного заболевания или состояния. Состояние, не связанное с указанным нарушением, может представлять собой, в качестве примера, но без ограничения, рак, аутоиммунное заболевание или беременность. Приобретенное нарушение может возникать вследствие преклонного возраста или лекарственных средств для лечения первичного вторичного заболевания (например, химиотерапия рака).

Настоящее изобретение также относится к способам лечения субъекта, у которого нет врожденного нарушения гемостаза, но который страдает вторичным заболеванием или состоянием, приводящим к "приобретению" нарушения гемостаза, например, вследствие выработки антител анти-FVIII или оперативного вмешательства. Таким образом, настоящее изобретение относится к способу лечения субъекта, нуждающегося в общем гемостатическом средстве, включающему введение терапевтически эффективного количества химерного белка, полученного настоящими способами.

Настоящее изобретение также относится к способам снижения иммуногенности FVIII или индукции меньшей иммуногенности в отношении FVIII, включающим введение эффективного количества химерных белков, описанных в настоящем документе, или полинуклеотидов, кодирующих указанные белки.

В одном из вариантов реализации субъект, нуждающийся в общем гемостатическом средстве, подвергается или вскоре подвергнется оперативному вмешательству. Химерный белок согласно настоящему изобретению может быть введен до, во время или после оперативного вмешательства в качестве профилактического средства. Химерный белок согласно настоящему изобретению может быть введен до, во время или после оперативного вмешательства для контроля острого эпизода кровотечения. Химерный белок согласно настоящему изобретению можно применять для лечения субъекта с острым эпизодом кровотечения, который не страдает нарушением гемостаза. Указанный острый эпизод кровотечения может являться следствием тяжелой травмы, например оперативного вмешательства, автомобильной ката-

строфы, ранения, огнестрельного ранения с разрывом или любого другого травматического случая, приводящего к неконтролируемому кровотечению. Неограничивающие примеры эпизодов кровотечения включают нарушение свертываемости крови, сопровождающееся повышенной кровоточивостью, гемартроз, мышечное кровотечение, кровотечение в ротовой полости, кровоизлияние, кровоизлияние в мышцы, кровоизлияние в ротовой полости, травму, травму головы, желудочно-кишечное кровотечение, внутричерепное кровоизлияние, внутрибрюшинное кровоизлияние, внутригрудное кровоизлияние, перелом костей, кровотечение в центральной нервной системе, кровотечение в заглоточном пространстве, кровотечение в забрюшинном пространстве, кровотечение во влагалище подвздошно-поясничной мышцы и их любые комбинации.

При профилактическом применении одну или более композиций, содержащих химерный белок согласно настоящему изобретению, или их смесь вводят пациенту еще не в состоянии заболевания для повышения резистентности пациента или уменьшения симптомов, связанных с заболеванием или нарушением. Такое количество определяется как "профилактически эффективная доза". При терапевтическом применении иногда требуется относительно высокая доза (например, от примерно 1 до 400 мкг/кг полипептида на дозу, при этом дозы от 5 до 25 мг чаще используют для радиоиммуноконъюгатов, а более высокие дозы - для полипептидов, модифицированных цитотоксическими лекарственными средствами) с относительно короткими интервалами пока не произойдет ослабление или прекращение прогрессирования заболевания и пока пациент не будет демонстрировать частичное или полное уменьшение интенсивности симптомов заболевания. После этого пациент может быть переведен на профилактический режим.

В некоторых вариантах реализации химерный белок или композицию согласно настоящему изобретению применяют для лечения по необходимости, которое включает лечение эпизода кровотечения, гемартроза, мышечного кровотечения, кровотечения в ротовой полости, кровоизлияния, кровоизлияния в мышцы, кровоизлияния в ротовой полости, травмы, травмы головы, желудочно-кишечного кровотечения, внутричерепного кровоизлияния, внутрибрюшинного кровоизлияния, внутригрудного кровоизлияния, перелома костей, кровотечения в центральной нервной системе, кровотечения в заглоточном пространстве, кровотечения в забрюшинном пространстве и кровотечения во влагалище подвздошно-поясничной мышцы. Субъект может нуждаться в профилактике при оперативном вмешательстве, периоперационном ведении или лечении для оперативного вмешательства. Такие оперативные вмешательства включают, например, малое оперативное вмешательство, обширное оперативное вмешательство, удаление зуба, тонзиллэктомия, герниотомия паховой грыжи, синовэктомия, полную замену коленного сустава, краниотомия, остеосинтез, оперативное вмешательство при травме, внутричерепное оперативное вмешательство, внутрибрюшное оперативное вмешательство, внутригрудное оперативное вмешательство или оперативное вмешательство по замене сустава.

В одном из вариантов реализации химерный белок согласно настоящему изобретению вводят внутривенно, подкожно, внутримышечно или через какую-либо поверхность слизистой оболочки, например, перорально, сублингвально, трансбуккально, интраназально, ректально, вагинально или через легкие. Химерный белок, содержащий VWFфрагмент фактора фон Виллебранда и белок FVIII, согласно настоящему изобретению может быть внедрен или связан с твердой биополимерной подложкой, которая обеспечивает медленное высвобождение химерного белка в место кровотечения, или внедрен в бинт/перевязочный материал. Доза химерного белка будет варьироваться в зависимости от субъекта и от конкретного используемого пути введения. Дозы могут находиться в диапазоне от 0,1 до 100000 мкг/кг массы тела. В одном из вариантов реализации диапазон доз составляет 0,1-1000 мкг/кг. В другом варианте реализации диапазон доз составляет 0,1-500 мкг/кг. Белок можно вводить непрерывно или с конкретными установленными интервалами. Для определения оптимальных диапазонов доз и/или режимов введения можно использовать анализы *in vitro*. Анализы *in vitro* для измерения активности факторов свертывания крови известны в данной области техники, например, анализ свертывания STA-CLOT VHa-rTF или анализ свертывания ROTEM. Кроме того, эффективные дозы могут быть экстраполированы из кривых доза-ответ, полученных в моделях у животных, например, собаки, страдающей гемофилией (Mount et al., 2002, Blood, 99(8):2670).

После подробного описания настоящего изобретения оно станет более понятным со ссылкой на следующие примеры, которые включены только в целях иллюстрации и не ограничивают настоящее изобретение. Содержание всех патентов, публикаций и статей, указанных в настоящем документе, явным образом и определенно включено в настоящее описание посредством ссылки.

Примеры

В примерах использовали следующие материалы и способы, если не указано иное.

Материалы и способы.

В целом при осуществлении настоящего изобретения использовали, если не указано иное, общепринятые методики химии, биофизики, молекулярной биологии, технологии рекомбинантных ДНК, иммунологии (в особенности, например, технологии антител) и стандартные методики электрофореза. См., например, Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); Antibodies:

A Laboratory Manual, Harlow et al., C.S.H.L. Press, Pub. (1999); и Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992).

Пример 1. Клонирование различных доменов VWF (фиг. 1).

(а) Клонирование pSYN-VWF-002.

pSYN-VWF-002 содержит нуклеотидные последовательности, кодирующие фрагмент VWF, представляющий собой аминокислоты 1-477 SEQ ID NO: 100 [белковая последовательность VWF-D'D3]. Нумерация аминокислот представляет собой последовательность зрелого VWF без пропептида и соответствует аминокислотам 764-1240 SEQ ID NO: 2. Конструкт pSYN-VWF-002 содержит сигнальный пептид FVIII на N-конце, который обеспечивает надлежащую секрецию синтезированного белка и за которым следует маркер 6×His на C-конце, который используется для очистки белка. Его синтезировали с применением следующих комбинаций праймеров: ESC48-прямой праймер-VWF-D'D3 с сигнальным пептидом VIII и сайтом BsiWI

TCGCGACGTACGGCCGCCACCATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGC

CTTTGCGATTCTGCTTAGCCTATCCTGTCCGGCCCCCATG (SEQ ID NO: 90)

ESC51-обратный праймер-VWF D'D3 (аминокислоты 1-477) с 6His и сайтом Not I

TGACCTCGAGCGGCCGCTCAGTGGTGATGGTGATGATGCGGCTCCTGGCAGGCTCA

CAGGTGAGGTTGACAAC (SEQ ID NO: 91)

ПЦР в объеме 50 мкл проводили с применением комбинации праймеров ESC 48/ESC 51 и полноразмерной плазмиды VWF в качестве матрицы, используя 2-этапный цикл PCR-амплификации: 2 мин при 94°C; 21 цикл (30 с при 96°C, 2 мин при 68°C). Полосу 1460 п.о. очищали в геле с помощью комплекта для гель-экстракции (Qiagen, Валенсия, штат Калифорния, США) и клонировали в сайтах рестрикции BsiWI и NotI плазмиды pcDNA 4, получая pSYN-VWF 002.

(b) Клонирование pSYN-VWF-010 и 013.

pSYN-VWF-010 конструировали с использованием pSYN-VWF-008 и pSYN-VWF-002. pSYN-VWF-008 содержала полноразмерную последовательность VWF в pcDNA 3.1 (аминокислоты 1-2813 SEQ ID NO: 2), она включала пропептид из 763 аминокислот (т.е. домены D1D2), за которым следовали остальные 2050 аминокислот последовательности зрелого VWF. Сигнальный пептид FVIII в pSYN-VWF-002 заменяли доменами D1D2 из pSYN-VWF-008; полученный конструкт представлял собой pSYN-VWF-010. pSYN-VWF-008 содержал сайт BamHI в положении Arg907 и NotI в конце кодирующей области (после стоп-кодона). pSYN-VWF-008 и 002 гидролизовали с помощью ферментов рестрикции BamHI и NotI. Вставки из pSYN-VWF-002 (1026 п.о.) лигировали с pSYN-VWF-008 (8242 п.о.), гидролизованным BamHI/NotI, получая pSYN-VWF-010 (D1D2D'D3: аминокислоты 1-1240 SEQ ID NO: 2), к C-концу также добавляли маркер 6×His. В трансформированных клетках синтезировали pSYN-VWF-010 с пропептидом, однако вследствие внутриклеточного процессинга секретируемый продукт не содержал пропептида (D1D2). Белок VWF-010 существует в виде димера.

pSYN-VWF-010 использовали для создания pSYN-VWF-013, который содержал две точечные мутации в положениях C336A и C379A, соответствующие SEQ ID NO: 100 (нумерация аминокислот представляла собой последовательность зрелого VWF без домена D1D2 - последовательность VWF 2). Согласно прогнозам, указанные мутации предотвращали димеризацию домена D'D3 VWF.

(с) Клонирование pSYN-VWF-025 и pSYN-VWF-029.

pSYN-VWF-025 содержала последовательности D1D2D'D3 дикого типа из полноразмерного VWF в векторе pLIVE, а pSYN-VWF-029 содержит последовательность D1D2D'D3 с мутациями C336A и C379A. Для клонирования pSYN-VWF-025 использовали следующую комбинацию праймеров:

ESC 89-прямой праймер с сайтом

NheI=CTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCCG (SEQ ID NO: 92)

ESC 91-обратный праймер с сайтом

SalI=CTGGATCCCGGGAGTCTGACTCGTCAGTGGTGATGGTGATGATG (SEQ ID NO: 93)

ПЦР в объеме 50 мкл проводили с применением комбинации праймеров ESC 89/ESC91 и плазмиды pSYN-VWF 010 (для pSYN-VWF-025) или pSYN-VWF 013 (для pSYN-VWF-029) в качестве матрицы, используя 3-этапный цикл PCR-амплификации: 2 мин при 94°C; 21 цикл (30 с при 96°C, 30 с при 55°C, 4 мин при 68°C). Полосу ожидаемого размера (~3800 п.о.) очищали в геле с помощью комплекта для гель-экстракции (Qiagen, Валенсия, штат Калифорния, США) и клонировали в сайтах рестрикции NheI и SalI вектора pLIVE-Mirus (Invitrogen, Карлсбад, штат Калифорния, США), получая pSYN-VWF 025 и 029.

(d) Клонирование pSYN-VWF-031.

pSYN-VWF-031 представлял собой конструкт D1D2D'D3(C336A/C379A)-Fc, содержащий тромбин-расщепляемый линкер длиной 48 аминокислот (8× GGGGS (SEQ ID NO 94)+сайт тромбина) между последовательностями VWF D1D2D'D3(C336A/C379A) и Fc. Для получения этого конструкта область VWF-Fc амплифицировали из конструкта pSYN-FVIII-064 (см. конструкт FVIII-VWF ниже). pSYN-FVIII-VWF расщепляли с помощью XbaI и NheI. Полученную область вставки размером 4165 п.о., содержащую фрагмент VWF и область Fc, использовали в качестве матрицы для амплификации VWF и области

Fc с помощью комбинации праймеров LW 22/LW23.

LW 22-прямой праймер-VWF-D'D3 с сигнальной последовательностью FVIII и сайтом BsiW1
GCGCCGGCCGTACGATGCAAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCG

ATTCTGCTTTAGCCTATCCTGTCGGCCCCCATG (SEQ ID NO: 95)

LW 23-обратный праймер-Fc со стоп-кодоном и сайтом Not1

TCATCAATGTATCTTATCATGTCTGAATTCGCGGCCGCTCATTTACC (SEQ ID NO:96)

Продукт ПЦР, полученный в результате амплификации LW22/LW23 (~2300 п.о.), клонировали в рSYN-VWF-002, гидролизованном с помощью BsiW1/Not1, получая промежуточный конструктор рSYN-VWF-014. рSYN-VWF-014 содержал сигнальный пептид FVIII-D'D3-20-аминокислотный тромбин-расщепляемый линкер с последующей областью Fc.

Для получения конструктора D1D2D'D3-Fc область D1D2D'D3 амплифицировали из рSYN-OB-013 с использованием комбинации праймеров LW24/LW27 и стандартной методики ПЦР.

LW24- прямой праймер- VWF D1D2D'D3 клонируемый олигонуклеотид с сайтом BsiW1
GCGCCGGCCGTACGATGATTCCTGCCAGATTTGCCGGGGTG (SEQ ID NO:97)

LW27-обратный праймер-VWF D'D3 олигонуклеотид с EcoRV

CCACCGCCAGATATCGGCTCCTGGCAGGCTTCACAGGTGAG (SEQ ID NO:98)

Продукт ПЦР, полученный в результате амплификации LW22/LW23 (~3750 п.о.), клонировали в рSYN-VWF-014, расщепленном с помощью BsiW1/EcoRV, получая промежуточный конструктор рSYN-VWF-015. Длину линкера между фрагментом VWF и областью Fc меняли, получая рSYN-VWF-031.

Белковая последовательность VWF-D1D2D'D3 1 (SEQ ID NO: 99).

1 MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFVNTFDGSM
51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVSLSVYLGE FFDIHLFVNG
101 TVTQGDQRVS MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DSGSNFQVLL
151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
201 ERASPPSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
251 EKTLCCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWTDHSA CSPVCPAGME
301 YRQCVPSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTEPC
351 VHS GKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD
401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIETV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
451 LHNSLVKCLKH GAGVAMDQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQM
501 DWDGRGRLLV KLSVPYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
551 NAWKHLHGDCQ DLQKQHSDPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCLE
651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ YVLVQDYCGS
901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE VNVKRPMDKE
951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI
1051 MKQTMVDSSC RILTSDFVD CNKLVDPPEPY LDVCIYDTCS CESIGDCACF
1101 CDTIAAYAHV CAQHGVVTV RTATLCPQSC EERNLRENGY ECEWRYNSCA
1151 PACQVTCQHP EPLACPVCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP*

Белковая последовательность VWF-D'D3 2 (SEQ ID NO: 100).

1 SLSCRPPMVK LVCPADNLRA EGLECTKTCQ NYDLECMMSG CVSGCLCPPG
 51 MVRHENRCVA LERCPCFHQG KEYAPGETVK IGCNTCVCRD RKWNCTDHVC
 101 DATCSTIGMA HYLTFDGLKY LFPGECQYVL VQDYCGSNPG TFRILVGKNG
 151 CSHPSVKCKK RVTILVEGGE IELFDGEVNV KRPMKDETHF EVVESGRYII
 201 LLLGKALSVV WDRHLSISVV LKQTYQEKVC GLCGNFDGIQ NNDLTSSNLQ
 251 VEEDPVDFGN SWKVSSQCAD TRKVPLDSSP ATCHNNIMKQ TMVDSSCRIL
 301 TSDVFQDCNK LVDPEPYLDV CIYDTCSCES IGDCACFCDT IAAYANVCAQ
 351 HGKVVTWRTA TLC PQSCEER NRENGYECE WRYN SCAPAC QVTCQHPEPL
 401 ACPVQCV EGC HANCPPGKIL DELLQTCVDP EDCPVCEVAG RRFASGKKVT
 451 LNPSDPEHCQ ICHCDVVNLT CEACQEP

Пример 2. Влияние гибридного продукта D'D3 и XTEN на увеличение периода полужизни FVIII.

Для оценки возможности увеличения периода полужизни D'D3 FVIII в гибридном белке rFVIII-XTEN димер VWF D'D3 вводили мышам FVIII-VWF DKO мышей путем гидродинамической инъекции соответствующего ДНК-конструкта VWF-025 (пример 1).

После достижения равновесной экспрессии D'D3 (на 5 день после инъекции) вводили разовую дозу 200 МЕ/кг rFVIII-XTEN посредством в/в инъекции. Образцы крови собирали до 120 ч после введения rFVIII-XTEN. Активность FVIII в плазме анализировали посредством хромогенного анализа FVIII. Уровень экспрессии D'D3 измеряли посредством твердофазного ИФА VWF, а ФК-профиль rFVIII Fc анализировали с помощью программы WinNonlin.

Результаты исследования показаны на фиг. 2, а ФК-параметр rFVIII-XTEN с/без D'D3 в кровотоке приведен в табл. 16. t1/2 rFVIII-XTEN для димера D'D3 увеличивалось с 3,4 до 17,8 ч, т.е. в 5 раз. В дополнение к периоду полужизни наблюдали 5-кратное повышение MRT, 3,6-кратное повышение ПИК и 3,8-кратное снижение клиренса.

Авторы изобретения наблюдали синергический эффект фрагмента D'D3 и технологии XTEN; будет выполнена оценка возможности увеличения времени полужизни ряда конструктов FVIII/VWF/XTEN у животных с гемофилией.

Таблица 16

ФК-параметр rFVIII-XTEN с/без D'D3 в кровотоке

Обработка	5-мин восстановление (%)	t1/2 (ч)	MRT (ч)	Cl (мл/ч/кг)	Vss (мл/кг)	ППК_D (ч*кг*мМЕ/мл/мМЕ)
rFVIII-XTEN VWF-025	80	17,8	19,3	3,5	67,4	0,29
rFVIII-XTEN	74	3,4	3,8	13,1	63,68	0,08
Улучшение крат	1,1	5,2	5,1	3,8	0,9	3,6

Очистка белка FVIII-XTEN.

Для данного исследования AE288 XTEN вставляли по С-концу BDD-FVIII. Для очистки данного белка вначале использовали этап тангенциальной проточной фильтрации (TFF) для замены буфера кондиционированной среды. Затем продукты в фильтрате захватывали с помощью ионообменной хроматографии сильных анионов, а затем выполняли дальнейшую очистку с помощью аффинной хроматографии. Чистота молекул была приемлема согласно эксклюзионной ВЭЖХ и дополнительно подтверждалась с помощью вестерн-блоттинга. Удельная активность молекулы была сопоставима с активностью FVIII с удаленным В-доменом согласно измерениям с помощью анализа аЧТВ и твердофазного ИФА.

Хромогенный анализ FVIII.

Активность FVIII измеряли с помощью набора COATEST SP FVIII от DiaPharma (№ партии N089019), все этапы инкубирования проводили на нагревателе планшетов при 37°C и встряхивании.

Диапазон стандартов rFVIII составлял от 100 до 0,78 мМЕ/мл. Контрольные образцы объединенной нормальной плазмы человека и образцы плазмы (разбавленные буфером 1X Coatest) добавляли в 96-луночные планшеты Immulon 2HB в двух повторностях (25 мкл/лунку). Свежеприготовленную смесь IXa/FX/фосфолипид (50 мкл), 25 мкл 25 мМ CaCl₂ и 50 мкл субстрата FXa последовательно добавляли в каждую лунку, после добавления каждого реагента осуществляли инкубирование в течение 5 мин. После инкубирования с субстратом добавляли 25 мкл 20% уксусной кислоты для остановки цветной реакции и измеряли оптическую плотность OD₄₀₅ с помощью прибора SpectraMAX plus (Molecular Devices). Данные

анализировали с помощью программного обеспечения SoftMax Pro (версии 5.2). Нижний предел количественного определения (НПКО) составлял 7,8 мМЕ/мл.

Твердофазный ИФА VWF.

При твердофазном ИФА VWF в качестве иммобилизованного антитела использовали антитело козы против VWF человека (аффинно очищенное, Affinity Biologicals, GAVWF-AP) в количестве 0,5 мкг/лунку, а в качестве обнаруживающего антитела - VWF-EIA-D (Affinity Biologicals, VWF-EIA-D, разбавление 1:100). Твердофазный ИФА выполняли в соответствии со стандартной процедурой твердофазного ИФА; в качестве субстрата ПХ использовали ТМБ, в качестве блокирующего буфера и буфера для связывания - буфер PBST/1,5% БСА/0,5 М NaCl. Стандартный диапазон анализа составлял от 100 до 0,78 нг, нижний предел количественного определения (НПКО) составил 7,8 нг/мл.

Пример 3. Конструирование плазмиды XTEN, содержащей конструкторы FVIII/VWF.

(а) Клонирование pSYN-FVIII-161 (фиг. 3).

Плазида FVIII-161 содержит одноцепочечный каркас Fc (scFc) с сайтами ферментативного расщепления, который подвергается процессингу во время синтеза в клетке. Конструкт содержит домен связывания FVIII из полноразмерного VWF (D'D3). Плазмиду (pSYN-FVIII-161) разработали с целью экспрессии гетеродимеров FVIII-Fc и VWF-Fc, причем домены D'D3 должны связывать FVIII и предотвращать взаимодействие FVIII с фосфолипидами и активированным белком C. Белок pSYN-FVIII-161 экспрессировался в клетке в виде единого полипептида, в котором C-конец субъединицы FVIII-Fc был связан с N-концом субъединицы VWF D'D3-Fc посредством полипептидного линкера 6× (GGGGS) (SEQ ID NO: 64). Кроме того, на 5'- и 3'-концах полипептидного линкера вставили последовательности RRRRS (SEQ ID NO: 11) и RKRRKR (SEQ ID NO: 10), соответственно, с целью внутриклеточного расщепления каждой последовательности пропротеинконвертазами после последнего Arg. Следовательно, клетки могли экспрессировать двуцепочечный гетеродимер FVIII-Fc/D'D3-Fc, в котором цепь FVIII-Fc содержала последовательность RRRRS (SEQ ID NO: 11) на C-конце, однако остальная часть последовательности линкера удалялась. Фрагмент AE288 XTEN, непосредственно за которым следовал полипептид IS{5X(GGGGS)}LVPRGSGG (SEQ ID NO: 122) (содержавший сайт расщепления тромбином) внедряли между доменами VWF и областью Fc для содействия отщепления фрагмента VWF от FVIII при активации гетеродимерного белка FVIII-VWF тромбином, что обеспечивало взаимодействие FVIII с другими факторами свертывания крови.

Белковая последовательность pSYN-FVIII-161 (SEQ ID NO: 101) (положения аминокислот последовательности FVIII - 1-1457; подчеркнутая область представляет собой область Fc; волнистым подчеркиванием обозначен расщепляемый линкер между первым Fc и фрагментом VWF; двойным подчеркиванием обозначен фрагмент VWF; полужирным шрифтом обозначен расщепляемый линкер между фрагментом VWF и Fc.

```

1  MQIELSTCFF  LCLLRFCFSA  TRRYYLGAVE  LSWDYMQSDL
GELPVDARFP
51  PRVPKSFPFN TSVVYKKTFL VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
151 GSHTYVWQVL KENGPMSADP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
251 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TPPEVHSIFL EGHTFLVRNH
301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
401 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDIT LIIFKNQASR PYNIPHGIT
501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
601 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS
701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDY YED SYEDISAYLL
751 SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQREITR TTL QSDQEEIDYD DTISVEMKKE
801 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLNRNAQSG
851 SVPQFKKVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
901 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY FWKVQHMAP

```

951 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGSLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
 1001 FALFFTIFDE TKSIFYFTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
 1051 MDTLPGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL
 1101 YNLYPGVFET VEMPLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
 1151 GMASGHIRDF QITASGQYQG WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
 1201 LAPMIIHGIK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
 1251 FFGNVDSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
 1301 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
 1351 PKEWLQVDFQ KTMKVTVGVT QGVKSLTSM YVKEFLISSS QDGHQWTLFF
 1401 QNGKVKVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
 1451 CEAQDLYDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
 1501 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
 1551 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
 1601 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD
 1651 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGKRRRRSG GGGSGGGGSG
 1701 GGGSGGGGSG GGGSGGGGSR KRRKRSLSCR PPMVKLVCPA DNLRAEGLEC
 1751 TKTCQNYDLE CMSMGCVSGC LCPPGMVRHE NRCVALERCP CFHQGKEYAP
 1801 GETVKIGCNT CVCRRDRKWC TDHVCDATCS TIGMAHYLTF DGLKYLPFGE
 1851 CQYVLVQDYC GSNPGTFRIL VGNKGC SHPS VKCKKRVTL VEGGEIELFD
 1901 GEVNVKRPKM DETHFEVVES GRYIILLGK ALSVVWDRHL SISVVLKQTY
 1951 QEKVCGLCGN FDGIQNNDLT SSNLQVEEDP VDFGNSWKVS SQCADTRKVP
 2001 LDSSPATCHN NIMKQTMVDS SCRILTSDFV QDCNKLVDPE PYLDVCIYDT
 2051 CSCESIGDCA AFCDTIAAYA HVCAQH GKVV TWRTATLCPQ SCEERNLREN
 2101 GYEAEWRYNS CAPACQVTCQ HPEPLACPVQ CVEGCHAHCP PGKILDELLQ
 2151 TCVDPEPCPV CEVAGRRFAS GKKVTLNPSD PEHCQICHCD VVNLTCEACQ
 2201 EPISGTSESA TPESGPGSEP ATSGSETPGT SESATPESGP GSEPATSGSE
 2251 TPGTSESATP ESGPGTSTEP SEGSA PGSPA GSPTSTEEGT SESATPESGP
 2301 GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGSPAGS PTSTEEGSPA GSPTSTEEGT
 2351 STEPSEGSAP GTSESATPES GPGTSESATP ESGPGTSESA TPESGPGSEP
 2401 ATSGSETPGS EPATSGSETP GSPAGSPTST EEGTSTEPSE GSAPGTSTEP
 2451 SEGSA PGSEP ATSGSETPGT SESATPESGP GTSTEPSEGS APDSGGGGSG
 2501 GGGSGGGGSG GGGSGGGGSL VPRGSGGDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF
 2551 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE
 2601 EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP
 2651 REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT
 2701 TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL
 2751 SPGK

(b) Клонирование pSYN-FVIII-168, 175, 172 и 174 (фиг. 4A-4D).

pSYN-FVIII-168, 172, 174 и 175 происходят от pSYN-FVIII-161. В pSYN-FVIII-161 внедрили мутации R1645A/R1648A с целью получения pSYN-FVIII-168, который продуцировал изоформу SC-FVIII, а для дополнительного увеличения периода полужизни к С-концу FVIII-НС непосредственно присоединили AE288 XTEN. Для конструирования pSYN-FVIII-175 из pSYN-FVIII-168 удалили последовательность кодонов D'D3 с целью оценки влияния Fc и технологии XTEN на увеличение периода полужизни FVIII.

Для конструирования pSYN-FVIII-172 к С-концу FVIII-НС непосредственно присоединили AE288 XTEN с целью дополнительного увеличения периода полужизни, а для получения pSYN-FVIII-174 из pSYN-FVIII-172 удалили последовательность кодонов D'D3 с целью оценки влияния Fc и технологии XTEN на увеличение периода полужизни FVIII.

(c) Клонирование pSYN-FVIII-170 (фиг. 4E).

pSYN-FVIII-170 сконструировали для оценки влияния XTEN и фрагмента D'D3 на увеличение периода полужизни FVIII. Последовательность кодонов фрагмента VWF-D1D2D'D3 и BDD-FVIII внедрили по 5'- и 3'-концу экспрессирующей кассеты, последовательность кодонов AE288 XTEN с последующим

35-аминокислотным тромбин-расщепляемым линкером использовали для соединения молекул VWF и FVIII. После внутриклеточного процессинга секретируемые белки содержали полипептид, содержащий фрагмент D'D3 зрелой молекулы VWF, связанный с N-концом зрелого BDD-FVIII посредством AE288 XTEN/35-аминокислотного тромбин-расщепляемого линкера.

Белковая последовательность pSYN-FVIII-170 (SEQ ID NO: 102).

1 SLSCRPPMVK LVCPADNLRA EGLECTKTCQ NYDLECMMSG CVSGCLCPPG
51 MVRHENRCVA LERCPCFHQG KEYAPGETVK IGCNTCVCRD RKNWCTDHVC
101 DATCSTIGMA HYLTFDGLKY LFPGECQYVL VQDYCGSNPG TFRILVGNKG
151 CSHPSVKCKK RVTILVEGGE IELFDGEVNV KRPMKDETHF EVVESGRYII
201 LLLGKALSUV WDRHLSISVV LKQTYQEKVC GLCGNFDGIQ NNDLTSSNLQ
251 VEEDPVDFGN SWKVSSQCAD TRKVPLDSSP ATCHNNIMKQ TMVDSSCRIL
301 TSDVVFQDCNK LVDPEPYLDV CIYDTCSCES IGDCAAFCDT IAAYAHVCAQ
351 HGKVVWTRTA TLC PQSCEER NLTRENGYEA WRYNSCAPAC QVTCQHPEPL
401 ACPVQCVEGC HAHCPPGKIL DELLQTCVDP EDCPVCEVAG RRFASGKKVT
451 LNPSPDPEHCQ ICHCDVVNLT CEACQEPISG TSESATPESG PGSEPATSGS
501 ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG TSTEPSEGSA
551 PGSPAGSPTS TEEGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
601 SPAGSPTS EGSAGSPTS TEEGTSTEPS EGSAPGTS ESATPESGPGTS
651 ESATPESGPG TSESATPESG PGSEPATSGS ETPGSEPATS GSETPGSPAG
701 SPTSTEEGTS TEPSEGSAPG TSTEPSEGSA PGSEPATSGS ETPGTSESAT
751 PESGPGTSTE PSEGSAPDSG GGGSGGGGSG GGGSGGGGSG GGGSLVPRGS
801 GGASATRRYY LGAVELSWDY MQSDLGELPV DARFPPRVPK SFPFNTSVVY
851 KKTLFVEFTD HLFNIAKPRP PWMGLLGPTI QAEVYDTPVVI TLKNMASHPV
901 SLHAVGVSYW KASEGAEYDD QTSQREKEDD KVFPGGSHY VWQVLKENG
951 MASDPLCLTY SYLSHVDLVK DLNSGLIGAL LVCREGLAK EKTQTLHKFI
1001 LLFAVFDEGK SWHSETKNSL MQDRDAASAR AWPKMHTVNG YVNRSLPGLI
1051 GCHRKSVYWH VIGMGTTPEV HSIFLEGHTF LVRNHRQASL EISPITFLTA
1101 QTLLMDLGQF LLFCHISSHQ HDGMEAYVKV DSCPEEPQLR MKNNEEAEDY
1151 DDDLTDSEMD VVRFDDDNPS SFIQIRSVAK KHPKTWVHYI AAEEDWDYA
1201 PLVLAPDDRS YKSQYLNNGP QRIGRKYKKV RFMAYTDEF KTREAIQHS
1251 GILGPLLYGE VGD TLLIIFK NQASRPYNIY PHGITDVRPL YSRRLPKGVK
1301 HLKDFPILPG EIFKYKWTVT VEDGPTKSDP RCLTRYSSV VNMERDLASG
1351 LIGPLLYCYK ESDVQRGNQI MSDKRNILF SVFDENRSWY LTENIQRFLP
1401 NPAGVQLEDP EFQASNIMHS INGYVFDLQ LSVCLHEVAY WYILSIGAQT
1451 DFSLVFFSGY TFKHKMVYED TLTLFPFSGE TVFMSMENPG LWILGCHNSD
1501 FRNRGMTALL KVSSCDKNTG DYYEDSYEDI SAYLLSKNNA IEPRFSQNP
1551 PVLKRHRQREI TRTTLQSDQE EIDYDDTISV EMKKEDFDIY DEDENQSPRS
1601 FQKTRHYFI AAVERLWDYG MSSSPHVLN RAQSGSVPQF KKVVFQEFTD
1651 GSFTQPLYRG ELNEHLGLLG PYIRAEVEDN IMVTFRNQAS RPYSFYSSLI
1701 SYEEDQRQGA EPRKNFVKPN ETKTYFWKVQ HHMAPTKDEF DCKAWAYFSD
1751 VDLEKDVHSG LIGPLLVCHT NTLNPAHGRQ VTVQEFALFF TIFDETKSWY
1801 FTE NMERNCR APCNIQMEDP TFKENYRFHA INGYIMDTLP GLVMAQDQRI
1851 RWYLLSMGSN ENIHSIHFSG HVFTVRKKEE YKMALYNLYP GV FETVEMLP
1901 SKAGIWRVEC LIGEHLHAGM STLFLVYSNK CQTPLGMASG HIRDFQITAS

1951 GQYQWAPKL ARLHYSGSIN AWSTKEPFSW IKVDLLAPMI IHGIKTQGAR
 2001 QKFSSLYISQ FIIMYSLDGK KWQTYRGNST GTLMVFFGNV DSSGIKHNF
 2051 NPPIARYIR LHPHYSIRS TLRMELMGCD LNCSMPLGM ESKAISDAQI
 2101 TASSYFTNMF ATWSPSKARL HLQGRSNAWR PQVNNPKEWL QVDFQKTMKV
 2151 TGVTTQGVKS LLTSMYVKEF LISSSQDGHQ WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF
 2201 TPVVNSLDPP LLTRYLRHP QSWVHQIALR MEVLGCEAQD LY

Пример 4. Гидродинамическая инъекция XTEN-содержащих конструкторов FVIII/VWF мышам с недостаточностью FVIII и VWF.

XTEN-содержащие ДНК-конструкты на фиг. 3 и 4 содержат 2-3 элемента, обеспечивающих увеличение периода полужизни, объединенных друг с другом. Для оценки возможности увеличения периода полужизни FVIII селективную группу ДНК-конструктов, изображенных на фиг. 3 и 4, ввели мышам с двойным нокаутом (DKO) FVIII/VWF путем гидродинамической инъекции (HDI) в дозе 100 мкг/мышь. Затем через 24 ч после HDI собрали образцы крови путем ретроорбитального пробоотбора крови. Активность FVIII в плазме после HDI анализировали посредством хромогенного анализа FVIII; результаты приведены в табл. 17 и на фиг. 5. По сравнению с BDD-FVIII дикого типа, все XTEN-содержащие ДНК-конструкты позволяли получить значительно повышенную активность FVIII в плазме через 24 ч после HDI, что указывало на значительно более продолжительный период полужизни молекул соответствующего циркулирующего белка по сравнению с BDD-FVIII. Затем оценивали применение комбинации указанных элементов, увеличивающих период полужизни, у животных с гемофилией.

Таблица 17

Активность FVIII в плазме через 24 ч после HDI у мышей FVIII/VWF DKO

ДНК-конструкт	BDD-FVIII	FVIII-161	FVIII-168	FVIII-172	BDD-FVIII	FVIII-170
Доза ДНК (мкг/мышь)	100	100	100	100	50	50
Активность FVIII (МЕ/мл)	219 ± 72	2446 ± 1012	2209 ± 609	1671 ± 223	197 ± 21	399 ± 30

Гидродинамическая инъекция.

Гидродинамическая инъекция является эффективным и безопасным способом доставки невирусных генов в печень мелких животных, например, мышей и крыс. Первоначально ее описали как быструю инъекцию раствора депротеинизированной плазмидной ДНК/NaCl, не содержащего эндотоксинов, в объеме одной десятой от массы тела животного в течение приблизительно 5-7 с. Депротеинизированная плазмидная ДНК содержала исследуемый ген, а печень составляет одну десятую от массы тела животного. Белок-мишень продуцировался в печени из введенной ДНК и мог обнаруживаться в течение 24 ч после инъекции. Для исследования терапевтических свойств экспрессированного белка собирали образцы плазмы.

При всех гидродинамических инъекциях, выполненных в рамках настоящего исследования, вводили 2 мл плазмидной ДНК в стерильном 0,9% физиологическом растворе путем внутривенной инъекции в хвостовую вену мышей массой 20-35 г в течение приблизительно 4-7 с. Мышей подвергали тщательному мониторингу в течение первых нескольких часов до возобновления нормальной деятельности. После ретроорбитального отбора образцов крови получали образцы плазмы и хранили их при температуре -80°C для дальнейшего анализа.

Пример 5. Конструирование плазмид для систем совместной трансфекции гетеродимера FVIII_{Fc}-VWF, содержавшего вставки XTEN (фиг. 6).

Для увеличения выхода продукции белка создали две системы совместной трансфекции, содержавшие три ДНК-конструкта. Первый ДНК-конструкт кодировал гибридный белок FVIII-Fc, в котором фрагмент AE288 XTEN был непосредственно присоединен к C-концу тяжелой цепи FVIII, а за ним следовал фрагмент легкой цепи FVIII дикого типа (pSYN-FVIII-173, фиг. 6B) или фрагмент легкой цепи FVIII с мутациями R1645A/R1648A (pSYN-FVIII-169, фиг. 6A), а легкая цепь FVIII была непосредственно присоединена к одиночному Fc-фрагменту. Второй ДНК-конструкт представлял собой pSYN-VWF-031, который кодировал гибридный белок D'D3-Fc (пример 1). Клетки HEK293F трансфицировали двумя плазмидами вместе с третьей плазмидой (PC5) в соотношении 80:15:5. Синтезированные белки секретировались в виде гетеродимера FVIII (XTEN) Fc/D'D3Fc и димера D'D3Fc; гетеродимер FVIII (XTEN) Fc/D'D3Fc отделяли от димера D'D3Fc путем очистки белка.

Зрелая белковая последовательность pSYN-FVIII-169 (SEQ ID NO: 103).

1 ATRRYYLGA V ELSWDYMQSD LGELPVDARF PPRVPKSFPF NTSVVYKKT
51 FVEFTDHLFN IAKPRPPWMG LLGPTIQAEV YDTVVITLKN MASHPVS LHA
101 VGVSYWKASE GAEYDDQTSQ REKEDDKVFP GGSHTYVWQV LKENGPMASD
151 PLCLTYSYLS HVDLVKDLNS GLIGALLVCR EGSLAKEKTQ TLHKFILLFA
201 VFDEGKSWHS ETKNSLMQDR DAASARAWPK MHTVNGYVNR SLPGLIGCHR
251 KSVYWHVIGM GTTPEVHSIF LEGHTFLVRN HRQASLEISP ITFLTAQTL
301 MDLGQFLLFC HISSHQHDGM EAYVKVDSCP EEPQLRMKNN EEAEDYDDDL
351 TDSEMDVVRF DDDNSPSFIQ IRSVAKKHPK TWVHYIAAEE EDWDYAPLVL
401 APDDRSYKSQ YLNNGPQRIG RKYKKVRFMA YDDETFKTRE AIQHESGILG
451 PLYGEVGD TLLIFKNQAS RPYNIYPHGI TDVRPLYSRR LPKGVKHLKD
501 FPILPGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYYSFVNME RDLASGLIGP
551 LLICYKESVD QRGNQIMSDK RNVILFSVFD ENRSWYL TEN IQRFLPNPAG
601 VQLEDPEFQA SNIMHSINGY VFDSLQLSVC LHEVAYWYIL SIGAQTDFLS
651 VFFSGYTFKH KVMYEDTLTL PFSGETVFM SMENPGLWIL GCHNSDFRNR
701 GMTALLKVSS CDKNTGDYEE DSYEDISAYL LSKNNAIEPR SFSQNGAPGT
751 SESATPESGP GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPGTSE
801 SATPESGPGT STEPSEGSAP GSPAGSPTST EEGTSESATP ESGPGSEPAT
851 SGSETPGTSE SATPESGPGS PAGSPTSTEE GSPAGSPTST EEGTSTEPSE
901 GSAPGTSESA TPESGPGTSE SATPESGPGT SESATPESGP GSEPATSGSE
951 TPGSEPATSG SETPGSPAGS PTSTEEGTST EPSEGSAPGT STEPSEGSAP
1001 GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGTSTEP SEGSAPASSP PVLKRHQAEI
1051 TRTTLQSDQE EIDYDDTISV EMKKEDFDIY DEDENQSPRS FQKKTRHYFI
1101 AAVERLWDYG MSSSPHVLRN RAQSGSVPQF KKVVFQEF TD GSFTQPLYRG
1151 ELNEHLGLLG PYIRAEVEDN IMVTFRNQAS RPYSFYSSLI SYEEDQRQGA
1201 EPRKNFVKPN ETKTYFWKVQ HHMAPTKDEF DCKAWAYFSD VDLEKDVHSG
1251 LIGPLLVCHT NTLNPAHGRQ VTVQEFALFF TIFDETKSWY FTENMERNCR
1301 APCNIQMEDP TFKENYRFHA INGYIMDTLP GLVMAQDQRI RWYLLSMGSN
1351 ENIHSIHFSG HVFTVRKKEE YKMALYNLYP GVFEVEMLP SKAGIWRVEC
1401 LIGEHLHAGM STLFLVYSNK CQTPLGMASG HIRDFQITAS GQYGQWAPKL
1451 ARLHYSGSIN AWSTKEPFSW IKVDLLAPMI IHGIKTQGAR QKFSSLYISQ
1501 FIIMYSLDGK KWQTYRGNST GTLMVFFGNV DSSGIKHNI F NPPIIARYIR
1551 LHPHTYSIRS TLRMELMGCD LNCSMPLGM ESKAISDAQI TASSYFTNMF
1601 ATWSPSKARL HLQGRSNAWR PQVNNPKEWL QVDFQKTMKV TGVTTQGVKS
1651 LLTSMYVKEF LISSQDGHQ WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF TPVVNSLDPP
1701 LLTRYLRIHP QSWVHQIALR MEVLGCEAQD LYDKTHTCPP CPAPELLGGP
1751 SVFLFPPKPK DTLMISR TPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK
1801 TKPREEQYNS TYR VVS VLT V LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
1851 AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
1901 NNYKTPPV L DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFCSSVM HEALHNHYTQ
1951 KSLSLSPGK

Зрелая белковая последовательность pSYN-FVIII-173 (SEQ ID NO: 104).

1 ATRRRYYLGAV ELSWDYMQSD LGELPVDARF PPRVPKSF PF NTSVVYKKT L
 51 FVEFTDHLFN IAKPRPPWMG LLGPTIQAEV YDTVVITLKN MASHPVSLHA
 101 VGVSYWKASE GAEYDDQTSQ REKEDDKVFP GGSHTYVWQV LKENGPMASD
 151 PLCLTYSYLS HVDLVKDLNS GLIGALLVCR EGSLAKEKTQ TLHKFILLFA
 201 VFDEGKSWHS ETKNSLMQDR DAASARAWPK MHTVNGYVNR SLPGLIGCHR
 251 KSVYWHVIGM GTTPEVHSIF LEGHTFLVRN HRQASLEISP ITFLTAQTLL
 301 MDLGQFLLC HISSHQHDGM EAYVKVDSCP EEPQLRMKNN EEAEDYDDDL
 351 TDSEMDVVRF DDDNSPSFIQ IRSVAKKHPK TWVHYIAAEE EDWDYAPLVL
 401 APDDRSYKSQ YLNNGPQRIG RKYKKVRFMA YDDETFKTRE AIQHESGILG
 451 PLYGEVGDV LLIIFKNQAS RPYNIYPHGI TDVRLYSRR LPKGVKHLKD
 501 FPILPGEIFK YKWTVTVEDG PTKSDPRCLT RYYSSFVNME RDLASGLIGP
 551 LLICYKESVD QRGNQIMSDK RNVILFSVFD ENRSWYL TEN IQRFLPNPAG
 601 VQLEDPEFQA SNIMHSINGY VFDSLQLSVC LHEVAYWYIL SIGAQTDFLS
 651 VFFSGYTFKH KVMYEDTLTL PPSGETVFM SMENPGLWIL GCHNSDFRNR
 701 GMTALLKVSS CDKNTGDYEE DSYEDISAYL LSKNNAIEPR SFSQNGAPGT
 751 SESATPESGP GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPGTSE
 801 SATPESGPGT STEPSEGSAP GSPAGSPTST EEGTSESATP ESGPGSEPAT
 851 SGSETPGTSE SATPESGPGS PAGSPTSTEE GSPAGSPTST EEGTSTEPSE
 901 GSAPGTSESA TPESGPGTSE SATPESGPGT SESATPESGP GSEPATSGSE
 951 TPGSEPATSG SETPGSPAGS PTSTEEST ST EPSEGSAPGT STEPSEGSAP
 1001 GSEPATSGSE TPGTSESATP ESGPGTSTEP SEGSAPASSP PVLKRHRQREI
 1051 TRTTLQSDQE EIDYDDTISV EMKKEDFDIY DEDENQSPRS FQKKTRHYFI
 1101 AAVERLWDYG MSSSPHVLRN RAQSGSVPQF KKVVFQEF TD GSFTQPLYRG
 1151 ELNEHLGLLG PYIRAEVEDN IMVTFRNQAS RPYSFYSSLI SYEEDQRQGA
 1201 EPRKNFVKPN ETKTYFWKVQ HHMAPTKDEF DCKAWAYFSD VDLEKDVHSG
 1251 LIGPLLVCHT NTLNPAHGRQ VTVQEFALFF TIFDETKSWY FTENMERNCR
 1301 APCNIQMEDP TFKENYRFHA INGYIMDTLP GLVMAQDQRI RWYLLSMGSN
 1351 ENIHSIHFSG HVFTVRKKEE YKMALYNLYP GV FETVEMLP SKAGIWRVEC
 1401 LIGEHLHAGM STLFLVYSNK CQTPLGMASG HIRDFQITAS GQYGGWAPKL
 1451 ARLHYSGSIN AWSTKEPFSW IKVDLLAPMI IHGIKTQGAR QKFSSLYISQ
 1501 FIIMYSLDGK KWQTYRGNST GTLMVFFGNV DSSGIKHNI F NPPIIARYIR
 1551 LHPHYSIRS TLRMELMGCD LNCSMPLGM ESKAISDAQI TASSYFTNMF
 1601 ATWSPSKARL HLQGRSNAWR PQVNNPKEWL QVDFQKTMKV TGVTTQGVKS
 1651 LLTSMYVKEF LISSSQDGHQ WTLFFQNGKV KVFQGNQDSF TPVVNSLDPP
 1701 LLTRYLRIHP QSWVHQIALR MEVLGCEAQD LYDKTHTCPP CPAPELLGGP
 1751 SVFLFPPKPK DTLMISRPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK
 1801 TKPREEQYNS TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK
 1851 AKGQPREPQV YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE
 1901 NNYKTPPVVL DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFCSSVM HEALTHNYHTQ
 1951 KSLSLSPGK

Пример 6. Очистка белка FVIII-169/VWF-031 и FVIII-173/VWF-031.

Для замены буфера осветленной кондиционированной среды использовали этап тангенциальной проточной фильтрации (TFF). Затем гетеродимер FVIII-169/VWF-031 или FVIII-173/VWF-031 очищали с использованием двухступенчатого хроматографического процесса. Использовали анионообменную смолу для слабых анионов, а затем аффинную хроматографию. Конечный очищенный продукт обладал приемлемой чистотой согласно эксклюзионной ВЭЖХ. Удельная активность была совместима с активностью FVIII с удаленным В-доменом согласно измерению с помощью хромогенного анализа FVIII и концентрации A280. Чистоту и присутствие каждого фрагмента указанной молекулы подтверждали с помо-

щью электрофореза в ДСН-ПААГ и вестерн-блоттинга.

Пример 7. Оценка способности FVIII-169/VWF-031 к связыванию VWF с помощью Octet-анализа.

Способность FVIII-169/VWF-031 к связыванию VWF получали с помощью измерений на основе интерферометрии в биологическом слое (BLI) (Octet-анализа) при 25°C с использованием прибора ForteBio Octet 384 и трис-буфера для связывания (50 мМ трис, pH 7,2, 150 мМ NaCl, 5 мМ CaCl₂). Octet-анализ для определения связывания FVIII был основан на гидрофобной иммобилизации фактора фон Виллебранда человека (Haematologic Technologies, № по каталогу HCVWF-0191) на биосенсоре APS с последующим связыванием 1,0% бычьего сывороточного альбумина (Jackson ImmunoResearch, № по каталогу 001-000-161). Вкратце, hvWF (20 мкг/мл) разбавляли трис-буфером и наносили на биосенсор APS в течение 600 с, получая на поверхности реакционных датчиков слой связавшихся молекул толщиной приблизительно 3,0-3,5 нм. На контрольные датчики APS наносили 1,0% БСА в отсутствие hvWF для вычитания сигнала сравнения. После загрузки все датчики инкубировали в трис-буфере в течение 300 с для определения нового исходного уровня. Затем датчики биосенсора инкубировали в растворах FVIII-XTEN 169 или лекарственного вещества FVIII_{Fc} (0, 0,6, 2, 6, 20, 60, 200, 600 МЕ/мл) в течение 5 мин при комнатной температуре с последующим этапом диссоциации в течение 5 мин. С использованием программного обеспечения для анализа данных Octet находили ответ на связывание (нм) из вычитанных данных (реакционный датчик минус датчик сравнения). Для FVIII-169/VWF-031 обнаружено отсутствие связывания с иммобилизованным VWF (фиг. 7), что указывает на полное экранирование FVIII от полноразмерной молекулы VWF фрагментом D'D3.

Пример 8. ФК FVIII-169/VWF-031 у мышей HemA и мышей FVIII/VWF DKO.

ФК-профиль FVIII-169/VWF-031 проверяли на мышах HemA и мышах FVIII/VWF DKO для оценки способности фрагмента D'D3 экранировать молекулу FVIII от эндогенного VWF. Мышей HemA или мышей FVIII/VWF DKO обрабатывали путем внутривенного введения FVIII-169/VWF-031 в разовой дозе 200 МЕ/кг; затем выполняли отбор образцов плазмы через 5 мин, 8, 24, 48 и 72 ч после введения. Активность FVIII в образцах плазмы проверяли с помощью хромогенного анализа FVIII; период полужизни FVIII-169/VWF-031 рассчитывали с помощью программы WinNonlin. Для FVIII-169/VWF-031 с помощью интерферометрии в биологическом слое было продемонстрировано полное ингибирование связывания конструктора с иммобилизованным VWF (фиг. 7). Это означает, что фрагмент D'D3 в составе молекулы успешно блокировал связывание FVIII с нативной молекулой VWF; поэтому в двух различных линиях мышей прогнозировали аналогичный период полужизни FVIII-169/VWF-031. На фиг. 8А и в табл. 18 показано, что, как и ожидалось, FVIII-169/VWF-031 обладал аналогичными ФК-профилями у мышей HemA и мышей FVIII/VWF DKO, что подтвердило независимость периода полужизни гетеродимера FVIII_{Fc}/VWF от периода полужизни эндогенного VWF. Отделение периода полужизни гетеродимера FVIII_{Fc}/VWF от периода полужизни эндогенного VWF устранило верхний предел увеличения периода полужизни FVIII и открыло возможность дальнейшего увеличения периода полужизни FVIII более чем в 2 раза по сравнению с верхним пределом, обусловленным эндогенным VWF.

Таблица 18

ФК FVIII-169/VWF-031 у мышей HemA и мышей FVIII/VWF DKO

Линия мыши. Восстановление.

Линия мышей	Выход (%)	t _{1/2} (ч)	MRT (ч)	C ₁ (мл·ч/кг)	V _{ss} (мл/кг)	ППК (ч*кг*мМЕ/мл/мМЕ)
DKO FVIII/VWF	69	17,94	20,1	4,06	81,69	0,2461
HemA	83	16,65	18,44	3,57	85,72	0,28

Защитную способность вставки XTEN и фрагмента D'D3 по отношению к FVIII оценивали путем сравнения периодов полужизни FVIII-169/VWF-031 с FVIII-169/Fc и FVIII_{Fc} у мышей FVIII/VWF DKO. После разового в/в введения выполняли отбор образцов крови через 5 мин, 8, 24, 48 и 72 ч для FVIII-169/VWF-031, через 5 мин, 8, 24, 32, 48 ч для FVIII-169/Fc и через 5 мин, 1, 2, 4, 6 и 8 ч для FVIII_{Fc}. Активность FVIII в образцах плазмы проверяли с помощью хромогенного анализа FVIII; период полужизни FVIII-155/VWF-031 рассчитывали с помощью программы WinNonlin.

Сводка по результатам исследования представлена на фиг. 8B и в табл. 19; rFVIII_{Fc} обладал 1,6-часовым периодом полужизни у мышей DKO из-за потери защиты от VWF. При внедрении вставки XTEN в молекулу FVIII_{Fc} полученная молекула FVIII-169/Fc обладала 7-часовым периодом полужизни, т.е. вставка XTEN увеличивала период полужизни в 4 раза. Наконец, при внедрении в молекулу фрагмента D'D3 с образованием FVIII-169/VWF-031, наблюдали 17-часовой период полужизни, т.е. фрагмент D'D3 обеспечивал его дополнительное увеличение еще в 2,5 раза. Кроме улучшения периода полужизни, наблюдали улучшение среднего времени пребывания (MRT), клиренса (C₁) и ППК, как показано в табл. 19.

Для FVIII-169/VWF-031 у мышей Нема и мышей FVIII/VWF DKO достигалось $t_{1/2}$, равное 17-18 ч, что представляет собой верхний предел $t_{1/2}$, обусловленный клиренсом VWF. В данную молекулу можно внедрить дополнительные элементы, обеспечивающие увеличение $t_{1/2}$, например вторую вставку XTEN в пределах FVIII. Синергический эффект фрагмента D'D3 и вставок XTEN предоставляет возможность полной защиты FVIII от факторов его клиренса; варианты FVIII_{Fc}/XTEN/VWF могут достичь окончательного прорыва 2-кратного предела увеличения $t_{1/2}$ FVIII.

Таблица 19

ФК FVIII-169/VWF-031 у мышей FVIII/VWF DKO

Линия мыши	Обработка	Восстановление (%)	$t_{1/2}$ (ч)	MRT (ч)	Cl (мл/ч/кг)	V _{ss} (мл/кг)	AUC/D (ч*кг*МЕД/мл/МЕД)
FVIII/VWF DKO	rFVIII _{Fc}	35	1,6	2,1	57,7	120,2	0,0173
	rFVIII-169/ Fc	77	7,0	6,2	6,4	39,2	0,1573
	rFVIII-169/ VWF-031	69	17,9	20,1	4,1	81,7	0,2461

Пример 9. ФК концентрата клеточной среды вариантов FVIII-XTEN у мышей FVIII/VWF DKO, экспрессирующих D'D3.

Способность фрагмента D'D3 увеличивать $t_{1/2}$ FVIII-XTEN оценивали в модели мыши FVIII/VWF DKO, экспрессирующей D'D3 (описанной в примере 2). В данном исследовании вместо использования VWF-025 для внедрения димера D'D3 в кровоток использовали конструктор VWF-029 для внедрения мономера D'D3 в кровоток. Для получения вариантов белка FVIII-XTEN подготовили ограниченный объем (50-100 мл) культуральной среды для временной трансфекции, в день 4 после трансфекции культуру клеток собирали и концентрировали до диапазона активности FVIII 10-20 МЕ/мл, подходящего для исследования ФК. Концентрированную клеточную среду затем использовали для стандартного исследования ФК у мышей FVIII/VWF DKO с D'D3 или без него в кровотоке.

В общей сложности в системе протестировали 6 вариантов FVIII-XTEN, содержащих 1-3 вставки XTEN; сводка по их $t_{1/2}$ приведена в табл. 20, данные типичных вариантов нанесены на график на фиг. 9А.

Для всех вариантов FVIII-XTEN, переносящих фрагмент D'D3 в кровоток, наблюдали увеличенный период полужизни (табл. 20), что продемонстрировало защиту FVIII-XTEN от факторов его клиренса со стороны D'D3. Кроме того, по сравнению с 14-часовым временем полужизни у мышей Нема, LSD0055.021 обладал 20,4-часовым $t_{1/2}$ у мышей с DKO, экспрессирующих D'D3 (фиг. 9В, табл. 20), что указывает на окончательный прорыв 2-кратного предела увеличения периода полужизни для молекул FVIII. За счет дальнейшей модификации молекулы FVIII(XTEN)/VWF потенциально возможно достичь еще более продолжительного $t_{1/2}$ FVIII и обеспечить пациентов с Нема белком FVIII, который требует приема раз в неделю или реже.

Таблица 20

 $t_{1/2}$ FVIII-XTEN у мышей FVIII/VWF DKO, экспрессирующих D'D3

FVIII-XTEN ID	Количество вставок XTEN	Сайты инсерции	Размер XTEN	$t_{1/2}$ (ч) Мыши DKO	$t_{1/2}$ (ч) Мыши pLIVE-D'D3/ DKO	$t_{1/2}$ (ч) Мыши Нема
pSD-0013	1	CT	144	3,3	7,9	
LSD0003.009	2	B*/CT	144/288	9,7	16,4	
LSD0038.015	2	1656/26	144/144	7,8	17,2	
LSD0049.002	3	18/B*/CT	144/144/288	12,6	17,5	
LSD0051.002	3	403/B*/CT	144/144/288	11,1	19,9	
LSD0055.021	3	1900/B*/CT	144/144/288	16	20,4	14

* В указывает, что последовательность XTEN (например, 144) вставлена непосредственно после аминокислотного остатка 745, соответствующего последовательности зрелого FVIII.

Пример 10. Стабильность VWF- и XTEN-содержащих вариантов FVIII в плазме при двойном нокауте (DKO) FVIII/VWF.

Стабильность вариантов белка rFVIII_{Fc} в плазме тестировали в плазме мыши с двойным нокаутом (DKO) FVIII/VWF. Для анализа стабильности клетки HEK293 совместно трансфицировали плазмидами, управляющими экспрессией rFVIII_{Fc} или FVIII-169 (rFVIII_{Fc} с 288 АЕ XTEN, вставленным на стыке В-домена) и плазмидами, управляющими экспрессией IgG-Fc или VWF-031 (области D'D3 VWF, присоединенной к IgG-Fc). На четвертый день после трансфекции собирали культуральную среду и концентри-

ровали ее до 30 МЕ/мл согласно хромогенной активности FVIII. Затем концентрированную культуральную среду добавляли в плазму мыши DKO, получая активность FVIII 5 МЕ/мл, и инкубировали при 37°C. В разные моменты времени выполняли отбор аликвот для измерения активности путем хромогенного анализа. Активность в каждый момент времени измеряли в двух повторностях, и среднюю активность наносили на график зависимости от времени. Активность FVIII_{Fc} - двуцепочечной (дц) молекулы FVIII, в которой тяжелые и легкие цепи удерживаются вместе за счет нековалентных взаимодействий, снижалась в плазме мыши DKO со временем (фиг. 10). Активность FVIII-169:Fc, содержащего вставку 288 АЕ XTEN на стыке В-домена, убывала медленнее по сравнению с rFVIII_{Fc}, что указывает на улучшенную стабильность за счет вставки XTEN. Учитывая, что предлагалось использовать VWF для повышения стабильности FVIII *in vivo*, авторы изобретения выполнили оценку стабильности FVIII-169:VWF-031 в плазме. Эта гетеродимерная молекула, содержащая элемент FVIII и элемент VWF D'D3, объединенные в соответствующие гемидомены Fc, продемонстрировала стабильность в плазме, повышенную по сравнению с FVIII-169:Fc, что указывало на синергическое действие домена VWF D'D3 и XTEN на стабильность rFVIII_{Fc} в плазме.

Пример 11. Влияние гибрида Fc, вставки XTEN и фрагмента D'D3 VWF на период полужизни FVIII.

Для оценки влияния гибрида Fc, вставки XTEN и фрагмента D'D3 VWF на период полужизни FVIII оценивали фармакокинетические свойства рекомбинантного FVIII с удаленным В-доменом (rBDD-FVIII), rFVIII_{Fc}, FVIII-169:Fc и FVIII-169: VWF-031 у мышей с двойным нокаутом (DKO) FVIII/VWF.

Мышей DKO обрабатывали путем разового внутривенного введения белков FVIII в дозе 200 МЕ/кг; в заданные моменты времени выполняли отбор образцов плазмы, как указано на фиг. 11. Активность FVIII в образцах плазмы анализировали с помощью хромогенного анализа FVIII; период полужизни рассчитывали с помощью программы WinNonlin-Phoenix. Фармакокинетические параметры протестированных молекул перечислены в табл. 21. Графики регрессии активности FVIII в плазме от времени для каждого варианта FVIII приведены на фиг. 11.

У мышей DKO немодифицированный BDD-FVIII обладал периодом полужизни, равным 0,23 ч; гибридный белок FVIII_{Fc} обладал увеличенным периодом полужизни, равным 1,66 ч, из-за кругооборота белка FVIII_{Fc} за счет взаимодействия Fc:FcRn. При внедрении 288 остатков полипептида АЕХТЕН в область В-домена FVIII в молекуле FVIII_{Fc} период полужизни полученного белка FVIII169/Fc у мышей DKO увеличился до 7,41 ч. Наконец, при добавлении домена D'D3 VWF период полужизни гетеродимера FVIII169/VWF031 у мышей DKO достиг 17,9 ч (фиг. 11, табл. 21). Кроме периода полужизни, все другие ФК-параметры также пропорционально улучшались с добавлением каждого элемента (табл. 21). FVIII может допускать встраивание нескольких элементов, увеличивающих период полужизни, и это синергическое действие трех элементов на увеличение периода полужизни FVIII обеспечило дальнейшее улучшение периода полужизни гетеродимеров FVIII-XTEN VWF.

Таблица 21

ФК-параметры вариантов FVIII

FVIII	Изоформа FVIII	Вставки XTEN		T _{1/2} (ч)	MRT (ч)	C1 (мл/ч/кг)	Vss (мл/кг)	ППК _D кг*ч/мл
		Сайт	Длина XTEN					
BDD-FVIII	дц			0,23	0,24	407,72	97,42	0,0025
FVIII _{Fc}	дц			1,66	2,06	62,66	128,82	0,0161
FVIII169/Fc	оц	В*	АЕ288	7,41	6,67	6,24	41,61	0,1603
FVIII169/VWF031	оц	В*	АЕ288	17,94	20,1	4,06	81,69	0,2463

* В указывает, что последовательность XTEN (например, 144) вставлена непосредственно после аминокислотного остатка 745, соответствующего последовательности зрелого FVIII.

Пример 12. Фармакокинетические свойства различных гетеродимеров FVIII-XTENVWF.

Для оценки совокупного действия фрагмента VWF-D'D3 и вставок XTEN на период полужизни FVIII протестировали фармакокинетические свойства гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc на мышах НемА и сравнили их со свойствами одноцепочечной изоформы BDD-FVIII (scBDD-FVIII) и FVIII-169:VWF-031 (пример 10). Получили семь новых конструкций FVIII-XTEN-Fc (белковые последовательности приведены в табл. 24). Схемы этих конструкций приведены на фиг. 14А-14Н. FVIII-195 и FVIII-199 соответственно являются двуцепочечной и одноцепочечной изоформами FVIII, и каждая из них содержит две вставки XTEN в положениях 1900 и 1656. FVIII-196 и FVIII-201 соответственно являются двуцепочечной и одноцепочечной изоформами FVIII, и каждая из них содержит три вставки XTEN в положениях 26, 1656 и 1900. FVIII-203, -204 и -205 являются одноцепочечными молекулами FVIII_{Fc} с двумя вставками XTEN на стыке В-домена и в положениях 1900, 403 или 18 соответственно. Каждый конструкт FVIII-XTEN-Fc совместно экспрессировали с VWF-031 в клетках НЕК293, получая гетеродимерные белки FVIII-XTEN-Fc/VWF. На четвертый день после трансфекции собирали культуральную

среду и концентрировали ее до 20 МЕ/мл согласно хромогенной активности FVIII (FVIII-195:VWF-031, FVIII-196:VWF-031, FVIII-199:VWF-031, FVIII-203:VWF-031 и FVIII-204:VWF-031) или очищали (scBDD-FVIII, FVIII-169:VWF-031, FVIII-201:VWF-031 и FVIII-205:VWF-031). После демонстрации полного внутримолекулярного экранирования молекулы FVIII в гетеродимере FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc от эндогенного VWF фрагментом D'D3 (FVIII-169:VWF-031, пример 5) для ФК-оценок выбрали мышей HemA. Очищенный белок или концентрированную культуральную среду вводили мышам HemA в возрасте 8-12 недель путем внутривенного введения в дозе 200 МЕ/10 мл/кг. Отбор образцов плазмы выполняли через 5 мин, 8, 16, 24, 32, 48, 72 и 96 ч после введения. Активность FVIII в образцах плазмы анализировали с помощью хромогенного анализа FVIII; период полужизни рассчитывали с помощью программы WinNonlin-Phoenix. Фармакокинетические параметры протестированных молекул перечислены в табл. 22. Активность FVIII в плазме в выбранные моменты времени для вариантов FVIII-XTEN-Fc/VWF-Fc нанесена на графики на фиг. 12А-12С.

При вставке XTEN в положениях 1900 и 1656 (FVIII-195, FVIII-199) наблюдали умеренное улучшение периода полужизни для изоформы scFVIII (FVIII-199:VWF-031) по сравнению с FVIII-169:VWF-031. Однако изоформа dcFVIII демонстрировала более короткий период полужизни, чем FVIII-169:VWF-031, что указывало на возможность значительно большей стабильности одноцепочечной изоформы по сравнению с соответствующей двуцепочечной изоформой (табл. 22 и фиг. 12А). При внедрении третьей вставки XTEN в FVIII-199 в положении 26 период полужизни полученной молекулы FVIII-201:VWF-031 достигал 24,6 ч, что представляет более чем трехкратное улучшение периода полужизни по сравнению с scBDD-FVIII (табл. 22 и фиг. 12С). Авторы изобретения также протестировали действие второй вставки XTEN в каждом из положений 403 (домен А2), 1900 (домен А3) и 18 (домен А1) на увеличение периода полужизни в комбинации со вставкой XTEN в В-домен. В то время как добавление вставки XTEN в А2 или А3 не давало дополнительного положительного действия на период полужизни (табл. 22, фиг. 12В), добавление вставки А1 увеличивало период полужизни гетеродимера FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc до 29,4 ч (табл. 22, фиг. 12С), что более чем в три раза превышало период полужизни scBDD-FVIII.

При внедрении XTEN в конструктор гетеродимера FVIII-Fc/VWF степень улучшения периода полужизни полученных молекул менялась; очевидной корреляции между периодом полужизни и сайтом или количеством вставок XTEN не наблюдали, что указывает на то, что период полужизни гетеродимера FVIII-XTEN-Fc/VWF определяется целостностью всей молекулы, а не количеством или положением вставок XTEN.

Период полужизни продолжительностью 24,6 и 29,4 ч, наблюдавшийся для гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc/VWF, однозначно превысил 1,6-2-кратное ограничение увеличения периода полужизни FVIII. При переносе этих результатов на пациентов с HemA это даст возможность профилактического приема FVIII раз в неделю или реже.

Таблица 22

ФК-параметры гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc/VWF-Fc

FVIII	Изоформа FVIII	Вставки XTEN		T _{1/2} (ч)	MRT (ч)	C1 (мл/ч/кг)	Vss (мл/кг)	ППК_D кг*ч/мл
		Сайт	Длина XTEN					
scBDD-FVIII	оц			7,16	10,16	4,38	44,44	0,23
FVIII169/VWF031	оц	В*	AE288	16,65	18,44	3,57	65,79	0,28
FVIII195/VWF031	лц	1656/1900	AG144/AE144	12,56	13,88	9,04	125,48	0,11
FVIII199/VWF031	оц	1656/1900	AG144/AE144	18,57	20,09	6,24	125,28	0,16
FVIII201/VWF031	оц	26/1656/1900	AG144/AG144/AE144	24,63	33,67	1,9	63,97	0,53
FVIII203/VWF031	оц	403/В*	AE144/AE288	15,52	18	3,65	65,61	0,27
FVIII204/VWF031	оц	1900/В*	AE144/AE288	16,3	20,63	2,87	59,14	0,35
FVIII205/VWF031	оц	18/В*	AE144/AE288	29,4	37,06	1,82	67,39	0,55

* В указывает, что последовательность XTEN (например, 144) вставлена непосредственно после аминокислотного остатка 745, соответствующего последовательности зрелого FVIII.

Помимо внедрения XTEN в молекулу FVIII, авторы изобретения также оценивали потенциальное положительное действие внедрения XTEN в качестве линкера между D'D3 и фрагментом Fc на увеличение периода полужизни. FVIII-155 (scFVIII-Fc) совместно экспрессировали с VWF-034 (VWF-Fc с AE 288

XTEN и тромбин-расщепляемым линкером из 35 остатков) в клетках HEK293. На 4 день после трансфекции собирали культуральную среду и концентрировали ее до 20 МЕ/мл согласно анализу активности FVIII. Мышам FVIII/VWF DKO вводили концентрированную культуральную среду в дозировке 200 МЕ/10 мл/кг в виде разовой внутривенной инъекции. Отбор образцов плазмы выполняли через 5 мин, 8, 24, 48, 72 и 96 ч после введения. Активность FVIII в образцах плазмы анализировали с помощью хромогенного анализа FVIII и строили график кривой регрессии активности FVIII в плазме в зависимости от времени (фиг. 13). FVIII-155/VWF-034 демонстрировал такое же улучшение периода полужизни, как и FVIII-169/VWF-031, который содержал АЕ 288 XTEN, внедренный в стыке В-домена FVIII, что подтверждается перекрывающимися кривыми регрессии для указанных двух молекул (фиг. 13). Демонстрация того, что вставка XTEN в полипептид VWF-Fc вызывает улучшение периода полужизни, аналогичное по величине улучшению, обусловленному вставкой XTEN на стыке В-домена полипептида FVIII, свидетельствует о возможности дальнейшего улучшения периода полужизни гетеродимерной молекулы с комбинацией внутримолекулярной вставки XTEN в полипептид FVIII и междоменной вставки XTEN между VWF и Fc-элементами полипептида VWF-Fc.

Пример 13А. Фармакокинетические свойства дополнительных гетеродимеров FVIII-XTENVWF.

Помимо гетеродимеров FVIII-XTEN VWF, перечисленных в табл. 22, при NemA проводилось или будет проводиться тестирование фармакокинетических свойств гетеродимеров FVIII-XTEN VWF, содержащих различные композиции вставок XTEN, однопочечную и двупочечную версию FVIII (табл. 23А). Кроме того, ниже описаны различные конструкторы FVIII (табл. 23В) и VWF (табл. 23С). Мышей NemA обрабатывали посредством разового внутривенного введения гетеродимерных белков в дозе 200 МЕ/10 мл/кг. Затем выполняли отбор образцов плазмы через 5 мин, 24, 48, 72, 96 и 120 ч после введения. Активность FVIII в образцах плазмы анализировали с помощью хромогенного анализа FVIII; период полужизни рассчитывали с помощью программы WinNonlin-Phoenix. Белковые последовательности перечисленных гетеродимеров перечислены в табл. 25.

Таблица 23А

Вероятные комбинации гетеродимера
FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc для улучшения ФК и активности

	pSYN VWF-015	pSYN VWF-031	pSYN VWF-034 **	pSYN VWF-036
pSYN FVIII 010	-	$t_{1/2}$ 8,7 ч DKO	Подлежит тестированию	-
pSYN FVIII 155	$t_{1/2}$ 6,3 ч DKO	$t_{1/2}$ 10,8 ч Мыши NemA	$t_{1/2}$ 18,6 ч Мыши NemA	$t_{1/2}$ 13,3 ч Мыши NemA
pSYN FVIII 169 **	-	$t_{1/2}$ 16,7 ч Мыши NemA	$t_{1/2}$ 31,1 ч Мыши NemA	-
pSYN FVIII 173 **	-	$t_{1/2}$ 15,2 ч DKO	$t_{1/2}$ 28,9 ч Мыши NemA	Подлежит тестированию
pSYN FVIII 205	-	$t_{1/2}$ 29,4 ч Мыши NemA	$t_{1/2}$ 32,4 ч Мыши NemA	$t_{1/2}$ 29,7 ч Мыши NemA
pSYN FVIII 266	-	$t_{1/2}$ 24,5 ч Мыши NemA	$t_{1/2}$ 27,4 ч Мыши NemA	-
pSYN FVII 267	-	$t_{1/2}$ 23,0 ч Мыши NemA	$t_{1/2}$ 25,7 ч Мыши NemA	
pSYN FVIII 268	-	Подлежит тестированию	Подлежит тестированию	Подлежит тестированию
Двупочечная изоформа pSYN FVIII 268		Подлежит тестированию	Подлежит тестированию	Подлежит тестированию
**Длину XTEN можно изменять на 72, 144, 288, 324, 333, 576 или 864.				

Таблица 23В

Конструкты FVIII

pSYN FVIII 010	двухцепочечный FVIII _{FC}
pSYN FVIII 169	Одноцепочечный FVIII _{FC} с 288 АЕ ХТЕН в В-домене
pSYN FVIII 173	двухцепочечный FVIII _{FC} с 288 АЕ ХТЕН в В-домене
pSYN FVIII 195	двухцепочечный FVIII _{FC} с двумя 144 ХТЕН в области аминокислот 1656 и 1900
pSYN FVIII 196	двухцепочечный FVIII _{FC} с тремя 144 ХТЕН в области аминокислот 26, 1656 и 1900
pSYN FVIII 199	Одноцепочечный FVIII _{FC} с двумя 144 ХТЕН в области аминокислот 1656 и 1900
pSYN FVIII 201	Одноцепочечный FVIII _{FC} с тремя 144 ХТЕН в области аминокислот 26, 1656 и 1900
pSYN FVIII 203	Одноцепочечный FVIII _{FC} с 144 АЕ ХТЕН в области аминокислоты 1900 и 288 АЕ ХТЕН в В-домене
pSYN FVIII 204	Одноцепочечный FVIII _{FC} с 144 АЕ ХТЕН в области аминокислоты 403 и 288 АЕ ХТЕН в В-домене
pSYN FVIII 205	Одноцепочечный FVIII _{FC} с 144 АЕ ХТЕН в области аминокислоты 18 и 288 АЕ ХТЕН в В-домене
pSYN FVIII 207	Одноцепочечный FVIII (без Fc, без ХТЕН)
pSYN FVIII 266	Одноцепочечный FVIII _{FC} с 42 АЕ ХТЕН в области аминокислоты 18 и 288 АЕ ХТЕН в В-домене
pSYN FVIII 267	Одноцепочечный FVIII _{FC} с 72 АЕ ХТЕН в области аминокислоты 18 и 288 АЕ ХТЕН в В-домене
pSYN FVIII 268	Одноцепочечный FVIII _{FC} с 144 АЕ ХТЕН в области аминокислоты 18
pSYN FVIII 269	Одноцепочечный FVIII _{FC} с 72 АЕ ХТЕН в области аминокислоты 18
pSYN FVIII 271	Одноцепочечный FVIII _{FC} с 42 АЕ ХТЕН в области аминокислоты 18
pSYN FVIII 272	Одноцепочечный FVIII с 144 АЕ ХТЕН в области аминокислоты 18 и 288 АЕ ХТЕН в В-домене (без Fc)

Таблица 23С

Конструкты VWF

pSYN VWF031	VWF-D1D2D'D3 - тромбин-расщепляемый GS-линкер-Fc длиной 48 АК с C1099A/C1142A
pSYN VWF034	VWF-D1D2D'D3- 288АЕ ХТЕН + тромбин-расщепляемый GS-линкер-Fc длиной 35 АК с C1099A/C1142A
pSYN VWF035	VWF-D1D2D'D3- тромбин-расщепляемый GS-линкер-Fc длиной 72 АК с C1099A/C1142A
pSYN VWF036	VWF-D1D2D'D3- тромбин-расщепляемый GS-линкер-Fc длиной 98 АК с C1099A/C1142A
pSYN VWF041	VWF-D1D2D'D3 с 288 АЕ ХТЕН в D3 и тромбин-расщепляемый GS-линкер-Fc длиной 48 АК после D3-Fc с C1099A/C1142A

Пример 13В. Фармакокинетические свойства дополнительных гетеродимеров FVIII-ХТЕНVWF.

Фармакокинетические свойства гетеродимеров FVIII-ХТЕНVWF протестировали на мышцах NemA. Протестированные гетеродимеры представляли собой FVIII169/VWF034, FVIII205/VWF034, FVIII205/VWF036 и FVIII266/VWF031. Мышам NemA вводили разовую внутривенную дозу различных гетеродимерных белков 200 МЕ/10 мл/кг. Отбор образцов плазмы выполняли через 5 мин, 24, 48, 72, 96 и 120 ч после введения. Активность FVIII в образцах плазмы анализировали с помощью хромогенного анализа FVIII; периоды полужизни рассчитывали с помощью программы WinNonlin-Phoenix. Результаты ФК приведены ниже в табл. 24.

Таблица 24

Дополнительные FVIII-XTENVWF - ФК у мышей НемА

Обработка	5-мне восстановление (%)	HL (ч)	MRT (ч)	Cl (мл/ч/кг)	Vss (мл/кг)	ППК_D (ч*кг*мМЕ/ мл/мМЕ)	Кратность увеличения t _{1/2} по сравнению с ScBDD-FVIII
ScBDD- FVIII		7,16	10,16	4,83	44,44	0,23	-
FVIII169/V WF034	76	31,1	34,57	1,73	59,77	0,58	4,3
FVIII205/V WF034	68	32,41	39,79	1,55	61,73	0,64	4,6
FVIII205/V WF036	74	29,71	36,35	1,61	58,43	0,62	4,1
FVIII266/V WF031	66	24,45	22,75	2,67	60,83	0,37	3,4

Нуклеотидная последовательность pSYNFVIII 010 (двучечный FVII-IFc) (SEQ ID NO: 125).

1 ATGCAAATAG AGCTCTCCAC CTGCTCTTT CTGTGCSTT
TGCGATTCTG

51 CTTTAGTGCC ACCAGAAGAT ACTACCTGGG TGCAGTGGAA CTGTCATGGG
101 АСТАТАТGCA AAGTGATCTC GGTGAGCTGC CTGTGGACGC AAGATTTCTT
151 CCTAGAGTGC CAAAATCTTT TCCATTCAAC ACCTCAGTCG TGТАСААААА
201 GACTCTGTTT GTAGAATTCA CGGATCACCT TTTCAACATC GCTAAGCCAA
251 GGCCACCCTG GATGGGTCTG CTAGGTCCTA CCATCCAGGC TGAGGTTTAT
301 GATACAGTGG TCATTACACT TAAGAACATG GCTTCCCATC CTGTCAGTCT
351 TCATGCTGTT GGTGTATCCT ACTGGAAAAGC TTCTGAGGGA GCTGAATATG
401 ATGATCAGAC CAGTCAAAGG GAGAAAGAAG ATGATAAAGT CTCCCTGGT
451 GGAAGCCATA CATATGTCTG GCAGGTCCTG AAAGAGAATG GTCCAATGGC
501 CTCTGACCCA CTGTGCCTTA CCTACTCATA TCTTTCTCAT GTGGACCTGG
551 TAAAAGACTT GAATTCAGGC CTCATTGGAG CCCTACTAGT ATGTAGAGAA
601 GGGAGTCTGG CCAAGGAAA GACACAGACC TTGCACAAAT TTATACTACT
651 TTTTGCTGTA TTTGATGAAG GGAAAAGTTG GCACTCAGAA ACAAAGAАСТ
701 CCTTGATGCA GGATAGGGAT GCTGCATCTG CTCGGGCCTG GCCTAAAATG
751 CACACAGTCA ATGGTTATGT AAACAGGTCT CTGCCAGGTC TGATTGGATG
801 CCACAGGAAA TCAGTCTATT GGCATGTGAT TGGAATGGGC ACCACTCCTG
851 AAGTGCАСТC ААТАТТCCTC GAAGGTCACA CАТТТCCTGT GAGGAACCAT
901 CGCCAGGCGT CTTGGAAAT CTCGCCAATA АСТТТCCTTA CTGCTCAAAC
951 АСТТТGATG GACCTTGAC AGTTTCTACT GTTTTGTCAT ATCTTCTCCC
1001 ACCAАСATGA TGGCATGGAA GCTTATGTCA AAGTAGACAG CTGTCCAGAG
1051 GAACCCCAAC TACGAATGAA AAATAATGAA GAAGCGGAAG
АСТАТGATGA

1101 TGATCTTACT GATTCTGAAA TGGATGTGGT CAGGTTTGAT GATGACAАСТ
1151 СТСТТCCTT TATCCAAATT CGCTCAGTTG CCAAGAAGCA TCCTAAAАСТ
1201 TGGGTACATT ACATTGCTGC TGAAGAGGAG GACTGGGACT ATGCTCCCTT
1251 AGTCCTCGCC CCCGATGACA GAAGTTATAA AAGTCAATAT TTGAACAATG
1301 GCCCTCAGCG GATTGGTAGG AAGTACAAA AAGTCCGATT TATGGCАТАС
1351 ACAGATGAAA CCTTTAAGAC TCGTGAAGCT ATTCAGCATG AATCAGGAAT
1401 CTGGGACCT TACTTTATG GGAAGTTGG AGACACACTG TTGATTATAT
1451 TTAAGAATCA AGCAAGCAGA CCATATAACA TCTACCCTCA CGGAATCACT

1501 GATGTCCGTC CTTTGTATTC AAGGAGATTA CCAAAAGGTG TAAAAACATTT
 1551 GAAGGATTTT CCAATTCTGC CAGGAGAAAT ATTCAAATAT AAATGGACAG
 1601 TGACTGTAGA AGATGGGCCA ACTAAATCAG ATCCTCGGTG CCTGACCCGC
 1651 TATTACTCTA GTTTCGTTAA TATGGAGAGA GATCTAGCTT CAGGACTCAT
 1701 TGGCCCTCTC CTCATCTGCT ACAAAGAATC TGTAGATCAA AGAGGAAACC
 1751 AGATAATGTC AGACAAGAGG AATGTCATCC TGTTTTCTGT ATTTGATGAG
 1801 AACCGAAGCT GGTACCTCAC AGAGAATATA CAACGCTTC TCCCAATCC
 1851 AGCTGGAGTG CAGCTTGAGG ATCCAGAGTT CCAAGCCTCC AACATCATGC
 1901 ACAGCATCAA TGGCTATGTT TTTGATAGTT TGCAGTTGTC AGTTTGTTTG
 1951 CATGAGGTGG CATACTGGTA CATTCTAAGC ATTGGAGCAC AGACTGACTT
 2001 CCTTCTGTC TTCTTCTCTG GATATACCTT CAAACACAAA ATGGTCTATG
 2051 AAGACACACT CACCCTATTC CCATTCTCAG GAGAACTGT CTCATGTGC
 2101 ATGGAAAACC CAGGTCTATG GATTCTGGGG TGCCACAAC T CAGACTTTTCG
 2151 GAACAGAGGC ATGACCGCCT TACTGAAGGT TTCTAGTTGT GACAAGAACA
 2201 CTGGTGATTA TTACGAGGAC AGTTATGAAG ATATTCAGC A TACTTGCTG
 2251 AGTAAAAACA ATGCCATTGA ACCAAGAAGC TTCTCTCAA ACCCACCAGT
 2301 CTTGAAACGC CATCAACGGG AAATAACTCG TACTACTCTT CAGTCAGATC
 2351 AAGAGGAAAT TGACTATGAT GATACCATAT CAGTTGAAAT GAAGAAGGAA
 2401 GATTTTGACA TTTATGATGA GGATGAAAAT CAGAGCCCC GCAGCTTCA
 2451 AAAGAAAACA CGACACTATT TTATTGCTGC AGTGGAGAGG CTCTGGGATT
 2501 ATGGGATGAG TAGCTCCCCA CATGTTCTAA GAAACAGGGC TCAGAGTGGC
 2551 AGTGTCCCTC AGTTCAAGAA AGTTGTTTT CAGGAATTTA CTGATGGCTC
 2601 CTTTACTCAG CCCTTATACC GTGGAGAACT AAATGAAAT TTGGGACTCC
 2651 TGGGGCCATA TATAAGAGCA GAAGTTGAAG ATAATATCAT GGTAACTTTC
 2701 AGAAATCAGG CCTCTCGTCC CTATTCCTTC TATTCTAGCC TTATTCTTA
 2751 TGAGGAAGAT CAGAGGCAAG GAGCAGAACC TAGAAAAAAC
 TTTGTCAAGC
 2801 CTAATGAAAC CAAAACCTTAC TTTTGAAAAG TGCAACATCA TATGGCACCC
 2851 ACTAAAGATG AGTTTGACTG CAAAGCCTGG GCTTATTCT CTGATGTTGA
 2901 CCTGGA AAAA GATGTGCACT CAGGCCTGAT TGGACCCCTT CTGGTCTGCC
 2951 AACTAACAC ACTGAACCCT GCTCATGGGA GACAAGTGAC AGTACAGGAA
 3001 TTTGCTCTGT TTTTCACCAT CTTTGATGAG ACCAAAAGCT GGTACTTCAC
 3051 TGAAAATATG GAAAGAACT GCAGGGCTCC CTGCAATATC CAGATGGAAG
 3101 ATCCCAC TTT TAAAGAGAAT TATCGCTTCC ATGCAATCAA TGGCTACATA
 3151 ATGGATACAC TACCTGGCTT AGTAATGGCT CAGGATCAAA GGATTGATG
 3201 GTATCTGCTC AGCATGGGCA GCAATGAAA CATCCATTCT ATTCATTCA
 3251 GTGGACATGT GTTCACTGTA CGAAAAAAG AGGAGTATAA AATGGCACTG
 3301 TACAATCTCT ATCCAGGTGT TTTGAGACA GTGGAAATGT TACCATCCAA
 3351 AGCTGGAATT TGGCGGGTGG AATGCCTTAT TGGCGAGCAT CTACATGCTG
 3401 GGATGAGCAC ACTTTTTCTG GTGTACAGCA ATAAGTGTC GACTCCCTG
 3451 GGAATGGCTT CTGGACACAT TAGAGATTTT CAGATTACAG CTCAGGACA
 3501 ATATGGACAG TGGGCCCAA AGCTGGCCAG ACTTCATTAT TCCGGATCAA
 3551 TCAATGCCTG GAGCACC AAG GAGCCCTTT CTTGGATCAA GGTGGATCTG
 3601 TTGGCACCAA TGATTATCA CGGCATCAAG ACCCAGGGTG CCCGTCAGAA
 3651 GTTCTCCAGC CTCTACATCT CTCAGTTTAT CATCATGTAT AGTCTTGATG
 3701 GGAAGAAGTG GCAGACTTAT CGAGGAAATT CCACTGGAAC CTTAATGGTC

3751 TTCTTTGGCA ATGTGGATTC ATCTGGGATA AAACACAATA TTTTAAACCC
 3801 TCCAATTATT GCTCGATACA TCCGTTTGCA CCCAACTCAT TATAGCATTG
 3851 GCAGCACTCT TCGCATGGAG TTGATGGGCT GTGATTTAAA TAGTTGCAGC
 3901 ATGCCATTGG GAATGGAGAG TAAAGCAATA TCAGATGCAC AGATTACTGC
 3951 TTCATCCTAC TTTACCAATA TGTTTGCCAC CTGGTCTCCT TCAAAAGCTC
 4001 GACTTCACCT CCAAGGGAGG AGTAATGCCT GGAGACCTCA GGTGAATAAT
 4051 CCAAAAGAGT GGCTGCAAGT GGAAGTCCAG AAGACAATGA
 AAGTCACAGG

4101 AGTAACTACT CAGGGAGTAA AATCTCTGCT TACCAGCATG TATGTGAAGG
 4151 AGTTCCCTCAT CTCCAGCAGT CAAGATGGCC ATCAGTGGAC TCTCTTTTTT
 4201 CAGAATGGCA AAGTAAAGGT TTTTCAGGGA AATCAAGACT CCTTCACACC
 4251 TGTGGTGAAC TCTCTAGACC CACCGTTACT GACTCGCTAC CTTCGAATTC
 4301 ACCCCCAGAG TTGGGTGCAC CAGATTGCC TGAGGATGGA GGTTCCTGGGC
 4351 TGCGAGGCAC AGGACCTCTA CGACAAAAC CACACATGCC CACCGTGCCC
 4401 AGCTCCAGAA CTCTGGGCG GACCGTCAGT CTCTCTTTC CCCCCAAAAC
 4451 CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC CTGAGGTAC ATGCGTGGTG
 4501 GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC AAGTTCAACT GGTACGTGGA
 4551 CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG
 GAGCAGTACA

4601 ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCTCA CCGTCTGCA CCAGGACTGG
 4651 CTGAATGGCA AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC
 4701 CCCCATCGAG AAAACCATCT CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC
 4751 AGGTGTACAC CCTGCCCCA TCCCGGATG AGCTGACCAA GAACCAGGTC
 4801 AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA TCGCCGTGGA
 4851 GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC
 ACGCCTCCCC

4901 TGTTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC
 4951 AAGAGCAGGT GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA
 5001 GGCTCTGCAC AACCACTACA CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA
 5051 AATGA

Белковая последовательность pSYNFVIII 010 (двучепочечный FVIII_{Fc})
 (SEQ ID NO: 126).

1 MQIELSTCFF LLLRFCFSA TRRYYLGA VE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
 51 PRVPKSEFPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
 101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKA SEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
 151 GSHTYVWQVL KENGPMSADP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 251 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TPPEVHSIFL EGHFTFLVRNH
 301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
 351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
 401 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFEMAY
 451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR PYNIPHGIT
 501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR

551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 601 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFM S
 701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDY YED SYEDISAYLL
 751 SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQREITR TTL QSDQEEIDYD DTISVEMKKE
 801 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLNRNAQSG
 851 SVPQFKK VVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
 901 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEP RKN FVKPNETKTY FWKVQH HMAP
 951 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
 1001 FALFFTIFDE TKS WYFTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
 1051 MDTLPGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYK MAL
 1101 YNLYPGVFET VEMLP SKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
 1151 GMASGHIRDF QITASGQYQG WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
 1201 LAPMIIHG I K TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
 1251 FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHP TH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
 1301 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
 1351 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVT T QGVKSLLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
 1401 QNGKVKVFQ G NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRHPQSWVH QIALRMEVLG
 1451 CEAQDLYDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
 1501 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
 1551 LNGKEYKCKV SNKALPAIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
 1601 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDS DGS FFLYSKLTVD
 1651 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

Пример 14. Новый класс молекул фактора VIII свертывания крови с более чем трехкратным увеличением периода полужизни у мышей с гемофилией А.

Разработан новый класс молекул FVIII, содержащих два полипептида, один из которых состоит из одиночной цепи FVIII с удаленным В-доменом (BDD) и вставкой XTEN в одном или нескольких положениях в пределах последовательности FVIII, а второй состоит из области D'D3 VWF. Кроме того, каждый полипептид рекомбинантно объединен с областью Fc IgG1, что обеспечивает правильное выравнивание области D'D3 для связывания молекулы FVIII. Полученные варианты FVIII экспрессировали в клетках HEK293 посредством временной трансфекции и очищали от кондиционированной среды. Активность FVIII оценивали путем хромогенного анализа FVIII, оценку фармакокинетических свойств выполняли на мышах с нокаутом FVIII (HemA) и двойным нокаутом (DKO) FVIII/VWF.

Внедрение XTEN и области D'D3 VWF в rFVIII привело к разобщению клиренса гибридных белков и эндогенного VWF при увеличении их периода полужизни в кровотоке. FVIII в указанной гибридной конфигурации полностью экранировался от взаимодействия с VWF согласно измерению с помощью интерферометрии в биологическом слое (Octet). В соответствии с этим обнаружено, что их фармакокинетические профили у мышей HemA и DKO были идентичны, что указывает на эффективное разобщение скорости их клиренса у мышей и VWF. Оптимизация длины XTEN и положений для вставки XTEN позволила выявить подмножество белков, которые превысили ограничение VWF (16 ч), достигая периода полужизни в кровотоке мышей HemA до 30 ч, что представляет собой 4-кратное улучшение по сравнению с BDD-FVIII. Важно отметить, что эти белки поддерживали свою функциональность, согласно хромогенному анализу FVIII. Зависимость от VWF обуславливает фундаментальное ограничение периода полужизни терапевтического FVIII. Разобщение FVIII и путей клиренса VWF при увеличении периода полужизни за счет присоединения области D'D3 VWF и XTEN позволило получить новые молекулы FVIII с 4-кратно увеличенным периодом полужизни. Настоящий документ является первым сообщением о рекомбинантном FVIII, превысившем ограничение периода полужизни, наблюдаемое при попытках промышленной разработки FVIII длительного действия, что потенциально представляет собой значительное усовершенствование профилактического лечения гемофилии А.

Белковые последовательности конструкторов FVIII-XTEN-Fc и VWF-Fc
 Белковая последовательность FVIII 195 (двучепочечный FVIII-Fc с двумя 144
 AE XTEN в области аминокислот 1656 и 1900) (SEQ ID NO: 105).

1 MQIELSTCF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL
 GELPVDARFP

51 PRVPKSFPFN TSVVYKKTFL VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
 101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
 151 GSHTYVWQVL KENGPMA SDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 251 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
 301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
 351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
 401 WVHYIAEEEE DWDYAPLVA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIFKNQASR PYNIPHGIT
 501 DVRLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
 551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 601 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFM S
 701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDY YED SYEDISAYLL
 751 SKNNAIEPRS FSQNPV LKR HQREITR TTL QGAPGTPGSG TASSSPGASP
 801 GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPSTSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
 851 TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPSTSTG SPGSSPSGA
 901 TGSPGSSTPS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SSDQEEIDYD DTISVEMKKE
 951 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLNRNAQSG
 1001 SVPQFKKVVVF QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
 1051 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY FWKVQH HMAP
 1101 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNLNP AHGRQVTVQE
 1151 FALFFTIFDE TKS WYFTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG SEPATSGSET
 1201 PGTSESATPE SGP GSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG
 1251 TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGSP TSTEEGSPAG SPTSTEEGTS
 1301 ESATPESGPG TSTEPSEGA PGASSAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
 1351 MDTLPGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYK MAL
 1401 YNLYPGVFET VEMLP SKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
 1451 GMASGHIRDF QITASGQYQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
 1501 LAPMIIHG I K TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
 1551 FFGNV DSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
 1601 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
 1651 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVT T QGVKSLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
 1701 QNGKVKVFQ G NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
 1751 CEAQDLYDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
 1801 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNATKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
 1851 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
 1901 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSG S FFLYSKLTVD
 1951 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

Белковая последовательность FVIII 196 (двучечный FVIIIc с тремя 144 АЕ ХТЕН в области аминокислот 26, 1656 и 1900) (SEQ ID NO: 106).

1 MQIELSTCF LCLLRFCSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL
 GELPVGAPGS
 51 SPSASTGTGP GSSPSASTGT GPGASPGTSS TGSPGASPGT SSTGSPGSST
 101 PSGATGSPGS SPSASTGTGP GASPGTSSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
 151 TASSSPGSST PSGATGSPGS STPSGATGSP GASPGTSSTG SPASSDARFP
 201 PRVPKSFPFN TSVVYKKTFL VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
 251 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
 301 GSHTYVWQVL KENGPMA SDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 351 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 401 HTVNGYVNRSLPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHFTLVRNH
 451 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
 501 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
 551 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 601 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIFKNQASR PYNIPHGIT
 651 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
 701 YYSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 751 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 801 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS
 851 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDY YED SYEDISAYLL
 901 SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQREITR TTL QGAPGTPGSG TASSSPGASP
 951 GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
 1001 TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPGTSSTG SPGSSTPSGA
 1051 TGSPGSSTPS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SSDQEEIDYD DTISVEMKKE
 1101 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLRNRAQSG
 1151 SVPQFKKVV FQEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
 1201 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEP RKN FVKPNETKTY FWKVQH HMAP
 1251 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
 1301 FALFFTIFDE TKS WYFTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG SEPATSGSET
 1351 PGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG
 1401 TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGSP TSTEEGSPAG SPTSTEEGTS
 1451 ESATPESGPG TSTEPSEGSA PGASSAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
 1501 MDTLPGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYK MAL
 1551 YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
 1601 GMASGHIRDF QITASGQY GQ WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
 1651 LAPMIIHG IKTQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
 1701 FFGNVDS SGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
 1751 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
 1801 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
 1851 QNGKVKVFGQ NQDSFTPVVN SLDPPLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
 1901 CEAQDLYDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
 1951 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
 2001 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
 2051 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDS DGS FFLYSKLTVD
 2101 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

Белковая последовательность FVIII 199 (одноцепочечный FVIIIc с тремя 144 AE XTEN в области аминокислот 1656 и 1900) (SEQ ID NO: 107).

1 MQIELSTCF LCLLRFCSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL
 GELPVDARFP

51 PRVPKSF PFN TSVVYKKT LF VFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
 101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKA SEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
 151 GSHTYVWQVL KENGP MASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 251 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHTFLVRNH
 301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
 351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
 401 WVHYIAAEEE DWDYAPLVA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGD TL LIIFKNQASR PYNIPHGIT
 501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
 551 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 601 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFM S
 701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDY YED SYEDISAYLL
 751 SKNNAIEPRS FSQNPV LKR HQAEITR TTL QGAPGTPGSG TASSSPGASP
 801 GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASP GTSSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
 851 TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASP GTSSTG SPGSSTPSGA
 901 TGSPGSSTPS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SSDQEEIDYD DTISVEMKKE
 951 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLNRNAQSG
 1001 SVPQFKKVV FQEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
 1051 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEP RKN FVKPNETKY FWKVQH HMAP
 1101 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSG LIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
 1151 FALFFTIFDE TKS WYFTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG SEPATSGSET
 1201 PGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG
 1251 TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGSP TSTEEGSPAG SPTSTEEGTS
 1301 ESATPESGPG TSTEPSEGS A PGASSAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
 1351 MDTL PGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL
 1401 YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
 1451 GMASGHIRDF QITASGQYQG WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
 1501 LAPMIIHG IKTQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
 1551 FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHP TH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
 1601 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
 1651 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVT T QGVKSLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLF
 1701 QNGKVKVFQ G NQDSFTPVVN SLDPPLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
 1751 CEAQDLYDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
 1801 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
 1851 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
 1901 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDS DGS FFLYSKLTVD
 1951 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

Белковая последовательность FVIII 201 (одноцепочечный FVIII_с с тремя 144 АЕ ХТЕН в области аминокислот 26, 1656 и 1900) (SEQ ID NO: 108).

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL GELPVGAPGS
 51 SPSASTGTGP GSSPSASTGT GPGASPGTSS TGSPGASPGT SSTGSPGSST
 101 PSGATGSPGS SPSASTGTGP GASPSTSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
 151 TASSSPGSST PSGATGSPGS STPSGATGSP GASPSTSTG SPASSDARFP
 201 PRVPKSPFPN TSVVYKKTLE VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
 251 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
 301 GSHTYVWQVL KENGPMA SDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 351 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 401 HTVNGYVNRSLPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TPPEVHSIFL EGHFTLVRNH
 451 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
 501 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
 551 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 601 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDLE LIIFKNQASR PYNIPHGIT
 651 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
 701 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 751 NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 801 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS
 851 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYDED SYEDISAYLL
 901 SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQAEITRITL QGAPGTPGSG TASSSPGASP
 951 GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPSTSTG SPGSSPSAST GTGPGTPGSG
 1001 TASSSPGASP GTSSTGSPGA SPGTSSTGSP GASPSTSTG SPGSSTPSGA
 1051 TGSPGSSTPS GATGSPGASP GTSSTGSPAS SSDQEEIDYD DTISVEMKKE
 1101 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLNRNAQSG
 1151 SVPQFKKVVV QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
 1201 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY FWKVQHHPMAP
 1251 TKDEFDCKAW AYFSDVDLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
 1301 FALFFTIFDE TKSIFYFTENM ERNCRGAPTS ESATPESGPG SEPATSGSET
 1351 PGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG
 1401 TSESATPESG PGSPAGSPTS TEEGSPAGSP TSTEESGSPAG SPTSTEEGTS
 1451 ESATPESGPG TSTEPSEGS PGASSAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
 1501 MDLPLGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL
 1551 YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
 1601 GMASGHIRDF QITASGQYQG WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
 1651 LAPMIIHGK TQGARQKFSS LYISQFIIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
 1701 FFGNVDSGGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
 1751 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
 1801 PKEWLQVDFQ KTMKVTGVTT QGVKSLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
 1851 QNGKVKVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
 1901 CEAQDLYDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
 1951 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRNV SVLTVLHQDW
 2001 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
 2051 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGGS FFLYSKLTVD
 2101 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

Белковая последовательность FVIII203 (одноцепочечный FVIII_{FC} с двумя АЕ ХТЕН; одним 288АЕ ХТЕН в В-домене и одним 144 АЕ ХТЕН в области аминокислоты 1900) (SEQ ID NO: 109).

1 MQIELSTCFF LCLLRFCSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
 51 PRVPKSFPFN TSVVYKKTFL VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
 101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
 151 GSHTYVWQVL KENGPASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 251 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TPPEVHSIFL EGHTFLVRNH
 301 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
 351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
 401 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 451 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDIT LIIFKNQASR PYNIPHGIT
 501 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
 551 YYSSFNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 601 NRSWYLTEI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 651 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS
 701 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
 751 SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET PGTSESATPE
 801 SGPSEPATPE GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG SPAGSPTSTE
 851 EGTSESATPE SGPSEPATPE GSETPGTSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG
 901 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGTS
 951 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP TSTEEGTSTE
 1001 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE SGPSTSTEPS
 1051 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
 1101 EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVPQFK
 1151 KVVVFQFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
 1201 PYSFYSSLIS YEEDQRQGAE PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
 1251 CKAWAYFSDV DLEKDVHSGI IGPLLVCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT
 1301 IFDETKSWYF TENMERNCRG APTSESATPE SGPSEPATPE GSETPGTSES
 1351 ATPESGPGSE PATSGSETPG TSESATPESG PGTSTEPSEG SAPGTSESAT
 1401 PESGPGSPAG SPTSTEEGSP AGSPTSTEEG SPAGSPTSTE EGTSESATPE
 1451 SGPSTSTEPS EGSAPGASSA PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
 1501 LVMAQDQIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
 1551 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC QTPLGMASGH
 1601 IRDFQITASG YQGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
 1651 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
 1701 SSGIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL NSCSMPLGME
 1751 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
 1801 VDFQKTMKVT GVTTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK
 1851 VFQGNQDSFT PVVNSLDPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL
 1901 YDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHS
 1951 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
 2001 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELTA KNQVSLTCLV
 2051 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
 2101 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*

Белковая последовательность FVIII204 (одноцепочечный FVIII_{Fc} с двумя АЕ ХТЕН; одним 288АЕ ХТЕН в В-домене и одним 144 АЕ ХТЕН в области аминокислоты 403) (SEQ ID NO: 110).

1 MQIELSTCCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQSDL GELPVDARFP
 51 PRVPSFPPFN TSVVYKKTFL VFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
 101 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
 151 GSHTYVWQVL KENGPMSADP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 201 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 251 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TPPEVHSIFL EIGHTFLVRNH
 301 RQASLEISPI TFLTAQTLML DLGQFLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
 351 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHKPKT
 401 WVHYIAAEED DWDYAPLVA PDGAPTSTEP SEGSAPGSPA GSPTSTEEGT
 451 STEPSEGSAP GTSTEPSEGS APGTSESATP ESGPGTSTEP SEGSAPGTSE
 501 SATPESGPGS EPATSGSETP GTSTEPSEGS APGTSTEPSE GSAPGTSESA
 551 TPESGPGTSE SATPESGPGA SDRSYKSYQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 601 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR PYNIPHGIT
 651 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
 701 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 751 NRSWYLTENI QRFLPNAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 801 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS
 851 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
 901 SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET PGTSESATPE
 951 SGPSEPATG GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG SPAGSPTSTE
 1001 EGTSESATPE SGPSEPATG GSETPGTSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG
 1051 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGTS
 1101 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP TSTEEGTSTE
 1151 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE SGPSTEPS
 1201 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
 1251 EDENQSPRSF QKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVQFK
 1301 KVVVFQFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
 1351 PYSFYSSLIS YEEDQRQGAE PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
 1401 CKAWAYFSDV DLEKDVHSGI IGPLLVCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT
 1451 IFDETKSWYF TENMERN CRA PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
 1501 LVMAQDQIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
 1551 VFETVEMLPK KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC QTPLGMASGH
 1601 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
 1651 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
 1701 SSGIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL NSCSMPLGME
 1751 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
 1801 VDFQKTMKVT GVTQGVKSL L TSMYVKEFL ISSQDGHQW TLFFQNGKVK
 1851 VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL
 1901 YDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHS
 1951 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
 2001 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPVY TLPPSRDEL TKNQVSLTCLV
 2051 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
 2101 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*

Белковая последовательность FVIII 205 (одноцепочечного FVIII_{Fc} с двумя АЕ ХТЕН; одним 288АЕ ХТЕН в В-домене и одним 144 АЕ ХТЕН в области аминокислоты 18) (SEQ ID NO: 111).

1 MQLSTCFE LCLLRFCSA TRRYYLGAVE LSWDYMQGAP
TSESATPESG
51 PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
101 TSTEPSEGSА PGSPAGSPTS TEEGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS
151 ESATPESGPG SPAGSPTSTE EGSPAGSPTS TEEGASSSDL GELPVDARFP
201 PRVPKSFPFN TSVVYKKTFL VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
251 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
301 GSHTYVWQVL KENGPМASDP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
351 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
401 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TPPEVHSIFL EGHTFLVRNH
451 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
501 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVREFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
551 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
601 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDТL LIFKNQASR PYNIPHGIT
651 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
701 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
751 NRSWYLTENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
801 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVYEDTLTLF PFSGETVFMS
851 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
901 SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET PGTSESATPE
951 SGPSEPATSGS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG SPAGSPTSTE
1001 EGTSESATPE SGPSEPATSGS GSETPGTSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG
1051 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGTS
1101 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP TSTEEGTSTE
1151 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE SGPSTEPS
1201 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
1251 EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVPQFK
1301 KVVVFQFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
1351 PYSFYSSLIS YEEDQRQGAЕ PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
1401 CKAWAYFSDV DLEKDVHSGL IGPLLVCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT
1451 IFDETKSWYF TENMERNCRA PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
1501 LVMAQDQIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
1551 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC QTPLGMASGH
1601 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
1651 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
1701 SSGIKHNIFN PPIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL NSCSMPLGME
1751 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
1801 VDFQKTMKVT GVTTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFQNGKVK
1851 VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL
1901 YDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
1951 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
2001 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELТ KNQVSLTCLV

301 GSHTYVWQVL KENGPMSADP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 351 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 401 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TPPEVHSIFL EIGHTFLVRNH
 451 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
 501 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
 551 WVHYIAAEEE DWDYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 601 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR PYNIYPHGIT
 651 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
 701 YYSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 751 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 801 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MUYEDTLTLF PFSGETVFM5
 851 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
 901 SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET PGTSESATPE
 951 SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG SPAGSPTSTE
 1001 EGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG
 1051 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGTS
 1101 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP TSTEEGTSTE
 1151 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE SGPSTSTEPS
 1201 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
 1251 EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVPQFK
 1301 KVVVFQEF TDG SFTQPLYRGE LNEHLGLLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
 1351 PYSFYSSLIS YEEDQRQGAE PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
 1401 CKAWAYFSDV DLEKDVHSGL IGPLLVCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT
 1451 IFDETKSWYF TENMERN CRA PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
 1501 LVMAQDQRIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
 1551 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC QTPLGMASGH
 1601 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
 1651 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
 1701 SSGIKHNIFN PPIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL NSCSMPLGME
 1751 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
 1801 VDFQKTMKVT GVTTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK
 1851 VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQDL
 1901 YDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
 1951 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
 2001 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPVY TLPPSRDEL TKNQVSLTCLV
 2051 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
 2101 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*

Белковая последовательность pSYN FVIII 266 (FVIII Fc с 42 AE-XTEN в области аминокислоты 18 и 288 AE XTEN в В-доме) SEQ ID NO: 112.

1 MQIELSTCFF LCLLRFCFSA TRRYYLGAWE LSWDYMQGAP GSPAGSPTST
51 EEGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPASSS DLGELPVDAR FPPRVKPSFP
101 FNTSVVYKKT LFVEFTDHLF NIAKPRPPWM GLLGPTIQAE VYDVTVITLK
151 NMASHPVSLH AVGVSYWKAS EGAEYDDQTS QREKEDDKVF PGGSHTYVWQ
201 VLKENGPMAS DPLCLTYSYL SHVDLVKDLN SGLIGALLVC REGSLAKEKT
251 QTLHKFILLF AVFDEGKSWH SETKNSLMQD RDAASARAWP KMHTVNGYVN
301 RSLPGLIGCH RKSVMYWHVIG MGTTPPEVHSI FLEGHTFLVR NHRQASLEIS
351 PITFLTAQTL LMDLGQFLLF CHISSHQHDG MEAYVKVDSC PEEPQLRMKN
401 NEEAEDYDDD LTDSEMDVVR FDDDNPSFI QIRSVAKKHP KTWVHYIAAE
451 EEDWDYAPLV LAPDDRSYKS QYLNNGPQRI GRKYKKVRFM AYDTEFKTR
501 EAIQHESGIL GPLLYGEVGD TLLIIFKNQA SRPYNIYPHG ITDVRPLYSR
551 RLPKGVKHLK DFPILPGEIF KYKWTVTVED GPTKSDPRCL TRYSSVFNM
601 ERDLASGLIG PLLICYKESV DQRGNQIMSD KRNVLFSVF DENRSWYLTE
651 NIQRFLPNPA GVQLEDPEFQ ASNIMHSING YVFDSLQLSV CLHEVAYWYI
701 LSIGAQTDFL SVFFSGYTFK HKMVYEDTLT LFPFSGETVF MSMENPGLWI
751 LGCHNSDFRN RGMTALLKVS SCDKNTGDYY EDSYEDISAY LLSKNAIEP
801 RSFSQNGAPG TSESATPESG PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA
851 TSGSETPGTS ESATPESGPG TSTEPSEGS A PGSPAGSPTS TEEGTSESAT
901 PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG SPAGSPTSTE EGSPAGSPTS
951 TEEGTSTEPS EGSAPGTSES ATPESGPGTS ESATPESGPG TSESATPESG
1001 PGSEPATSGS ETPGSEPATSGS GSETPGSPAG SPTSTEEGTS TEPSEGSAPG
1051 TSTEPSEGS A PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGTSTE PSEGSAPASS
1101 PPVLKRHQAE ITRTTLQSDQ EEIDYDDTIS VEMKKEDFDI YDEDENQSPR
1151 SFQKTRHYF IAAVERLWDY GMSSSPHVLR NRAQSGSVPQ FKKVVFQEFT
1201 DGSFTQPLYR GELNEHLGLL GPYIRAEVED NIMVTFRNQA SRPYSFYSSL
1251 ISYEEDQRQG AEPRKNFVKP NETKTYFWKV QHHMAPTKDE FDCKAWAYFS
1301 DVDLEKDVHS GLIGPLLVCH TNTLNPAHGR QVTVQEFALF FTIFDETKSW
1351 YFTENMERNR RAPCNIQMED PTFKENYRFH AINGYIMDTL PGLVMAQDQR
1401 IRWYLLSMGS NENIHSIHFS GHVFTVRKKE EYKMALYNLY PGVFETVEML
1451 PSKAGIWRVE CLIGEHLHAG MSTLFLVYSN KCQTPLGMAS GHIRDFQITA
1501 SGQYQGWAPK LARLHYSYGI NAWSTKEPFS WIKVDLLAPM IHHGIKTQGA
1551 RQKFSSLYIS QFIMYSLDG KKWQTYRGNS TGTLMVFFGN VDSSGIKHNI
1601 FNPPIIARYI RLHPHTHSR STLRMELMGC DLNCSMPLG MESKAISDAQ
1651 ITASSYFTNM FATWSPSKAR LHLQGRSNAW RPQVNNPKWE LQVDFQKTMK
1701 VTGVTQGVK SLLTSMYVKE FLISSQDGH QWTLFFQNGK VKVFQGNQDS
1751 FTPVVNSLDP PLLTRYLRH PQSWVHQIAL RMEVLGCEAQ DLYDKTHTCP
1801 PCPAPELLGG PSVFLFPPK KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW
1851 YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA
1901 LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI
1951 AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFCVSV
2001 MHEALHNHYT QKSLSLSPGK *

Белковая последовательность pSYN FVIII 267 (FVIII Fc с 72 AE-XTEN в области аминокислоты 18 и 288 AE XTEN в В-домене) SEQ ID NO: 113.

1 MQIELSTCF LCLLRFCSA TRRYYLGAWE LSWDYMQGAP TSESATPESG
 51 PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
 101 TSTEPSEGSA PGASSSDLGE LPVDARFPPR VPKSFPFNTS VVYKKTFLVE
 151 FTDHLFNIAK PRPPWMGLLG PTIQAEVYDT VVITLKNMAS HPVSLHAVGV
 201 SYWKASEGAE YDDQTSQREK EDDKVFPGGS HTYVWQVLKE NGPMASDPLC
 251 LTYSYLSHVD LVKDLNSGLI GALLVCREGS LAKEKTQTLH KFILLFAVFD
 301 EGKSWHSETK NSLMQDRDAA SARAWPKMHT VNGYVNRSLP GLIGCHRKSV
 351 YWHVIGMGTT PEVHSIFLEG HTFLVRNHRQ ASLEISPITF LTAQTLLMDL
 401 GQFLLFCHIS SHQHDGMEAY VKVDSCPEEP QLRMKNNEEA EDYDDDLTDS
 451 EMDVVRFDDD NSPSFIQIRS VAKKHPKTWV HYIAAEEEDW DYAPLV LAPD
 501 DRSYKSQYLN NGPQRIGRKY KKVRFMAYTD ETFKTREAIQ HESGILGPLL
 551 YGEVGD TLLI IFKNQASRPY NIYPHGITDV RPLYSRRLPK GVKHLKDFPI
 601 LPGEIFKYKW TVTVEDGPTK SDPRCLTRY Y SSFVNMERDL ASGLIGPLLI
 651 CYKESVDQRG NQIMSDKRN V ILFSVFDENR SWYL TENIQR FLPNPAGVQL
 701 EDPEFQASNI MHSINGYVFD SLQLSVCLHE VAYWYILSIG AQTDFLSVFF
 751 SGYTFKHKMV YEDTLTLFPF SGETVFMSME NPGLWILGCH NSDFRNRGMT
 801 ALLKVSSCDK NTGDY YEDSY EDISAYLLSK NNAIEPRSFS QNGAPGTSES
 851 ATPESGPGSE PATSGSETPG TSESATPESG PGSEPATSGS ETPGTSESAT
 901 PESGPGTSTE PSEGSAPGSP AGSPTSTEEG TSESATPESG PGSEPATSGS
 951 ETPGTSESAT PESGPGSPAG SPTSTEEGSP AGSPTSTEEG TSTEPSEGSA
 1001 PGTSESATPE SGPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGSE PATSGSETPG
 1051 SEPATSGSET PGSPAGSPTS TEEGTSTEPS EGSAPGTSTE PSEGSAPGSE
 1101 PATSGSETPG TSESATPESG PGTSTEPSEG SAPASSPPVL KRHQAEITRT
 1151 TLQSDQEEID YDDTISVEMK KEDFDIYDED ENQSPRSFQK KTRHYFIAAV
 1201 ERLWDYGMSS SPHVLRNRAQ SGSVPQFKK V VFQEFTDGSF TQPLYRGELN
 1251 EHLGLLGPYI RAEVEDNIMV TFRNQASRPY SFYSSLISYE EDQRQGAEP R
 1301 KNFVKPNETK TYFWKVQH HM APTKDEFDCK AWAYFSDVDL EKDVHSGLIG
 1351 PLLVCHTNL NPAHGRQVTV QEFALFFTIF DETKSWYFTE NMERNCRAPC
 1401 NIQMEDPTFK ENYRFHAING YIMDTLPGLV MAQDQRIRWY LLSMGSNENI
 1451 HSIHFSGHVF TVRKKEEYKM ALYNLYPGVF ETVEMLPSKA GIWRVECLIG
 1501 EHLHAGMSTL FLVYSNKCQT PLGMASGHIR DFQITASGQY GQWAPKLARL
 1551 HYSGSINAW S TKEPFSWIKV DLLAPMIIHG IKTQGARQKF SSLYISQFII
 1601 MYSLDGKKWQ TYRGNSTGTL MVFFGNVDSS GIKHNIFNPP IIARYIRLHP
 1651 THYSIRSTLR MELMGCDLNS CSMP LGMESK AISDAQITAS SYFTNM FATW
 1701 SPSKARLHLQ GRSNAWRPQV NNPKEWLQVD FQKTMKVTGV TTQGVKSLLT
 1751 SMYVKEFLIS SSQDGHQWTL FFQNGKVKVF QGNQDSFTP V NSLDPPLLT
 1801 RYLRIHPQSW VHQIALRMEV LGCEAQDLYD KTHTCPPCPA PELLGGPSVF
 1851 LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP
 1901 REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVS NKALPAP IEKTISKAKG
 1951 QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQGPENNY
 2001 KTTTPVLDSG GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
 2051 SLSPGK*

Белковая последовательность pSYN FVIII 268 (FVIII Fc с 144 AE-XTEN в области аминокислоты 18) SEQ ID NO: 114.

1 MQIELSTCFF LCLLRFCSA TRRYYLGAWE LSWDYMQGAP TSESATPESG
 51 PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
 101 TSTEPSEGS PGSPAGSPTS TEEGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS
 151 ESATPESGPG SPAGSPTSTE EGSPAGSPTS TEEGASSSDL GELPVDARFP
 201 PRVPKSPFN TSVVYKTLF VFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
 251 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
 301 GSHTYVWQVL KENGPMSADP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 351 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 401 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EIGHTFLVRNH
 451 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCEP
 501 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
 551 WVHYIAAEEE DWYAPLVLA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 601 TDETFKTREA IQHESGILGP LLYGEVGDTL LIIFKNQASR PYNIPHGIT
 651 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
 701 YYSSFVNMR DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE
 751 NRSWYLTEI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 801 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MUYEDTLTLF PFSGETVFMS
 851 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
 901 SKNNAIEPRS FSQNPPVLKR HQAEITRRTL QSDQEEIDYD DTISVEMKKE
 951 DFDIYDEDEN QSPRSFQKKT RHYFIAAVER LWDYGMSSSP HVLNRNAQSG
 1001 SVPQFKKVVV QEFTDGSFTQ PLYRGELNEH LGLLGPYIRA EVEDNIMVTF
 1051 RNQASRPYSF YSSLISYEED QRQGAEPKRN FVKPNETKTY FWKVQHMAP
 1101 TKDEFDCKAW AYFSDVLEK DVHSGLIGPL LVCHTNTLNP AHGRQVTVQE
 1151 FALFFTIFDE TKSUYFTENM ERNCRAPCNI QMEDPTFKEN YRFHAINGYI
 1201 MDTLPGLVMA QDQRIRWYLL SMGSNENIHS IHFSGHVFTV RKKEEYKMAL
 1251 YNLYPGVFET VEMLPSKAGI WRVECLIGEH LHAGMSTLFL VYSNKCQTPL
 1301 GMASGHIRDF QITASGQYQG WAPKLARLHY SGSINAWSTK EPFSWIKVDL
 1351 LAPMIIHGK TQGARQKFSS LYISQFIMY SLDGKKWQTY RGNSTGTLMV
 1401 FFGNVDSSGI KHNIFNPPII ARYIRLHPTH YSIRSTLRME LMGCDLNSCS
 1451 MPLGMESKAI SDAQITASSY FTNMFATWSP SKARLHLQGR SNAWRPQVNN
 1501 PKEWLQVDFQ KTMKVTVGTT QGVKSLTSM YVKEFLISS QDGHQWTLFF
 1551 QNGKVKVFQG NQDSFTPVVN SLDPPLLTRY LRIHPQSWVH QIALRMEVLG
 1601 CEAQDLYDKT HTCPCPAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV
 1651 VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW
 1701 LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV
 1751 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS FFLYSKLTVD
 1801 KSRWQQGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPGK*

Белковая последовательность pSYN FVIII 269 (FVIII Fc с 72 AE-XTEN в области аминокислоты 18) SEQ ID NO: 115.

1 MQIELSTCFF LCLLRFCSA TRRYYLGAWE LSWDYMQGAP TSESATPESG
 51 PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
 101 TSTEPSEGS PGASSSDLGE LPVDARFPPR VPKSFPNTS VVYKTLFVE
 151 FTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVYDT VVITLKNMAS HPVSLHAVGV
 201 SYWKASEGAE YDDQTSQREK EDDKVFPGGS HTYVWQVLKE NGPMASDPLC

251 LTYSYLSHVD LVKDLNSGLI GALLVCREGS LAKEKTQTLH KFILLFAVFD
 301 EGKSWHSETK NSLMQDRDAA SARAWPKMHT VNGYVNRSLP GLIGCHRKSV
 351 YWHVIGMGTT PEVHSIFLEG HTFLVRNHRQ ASLEISPITF LTAQTLLMDL
 401 GQFLLFCHIS SHQHDGMEAY VKVDSCPEEP QLRMKNNEEA EDYDDDLTDS
 451 EMDVVRFDLDD NSPSFIQIRS VAKKHPKTWV HYIAAEEEDW DYAPLVLPAD
 501 DRSYKSQYLN NGPQRIGRKY KKVRFMAYTD ETFKTREAIQ HESGILGPLL
 551 YGEVGDTHLL IFKNQASRPY NIYPHGITDV RPLYSRRLPK GVKHLKDFPI
 601 LPGEIFKYKW TVTVEDGPTK SDPRCLTRY Y SSFVNMERDL ASGLIGPLLI
 651 CYKESVDQRG NQIMSDKRN V ILFSVFDENR SWYL TENIQR FLPNPAGVQL
 701 EDPEFQASNI MHSINGYVFD SLQLSVCLHE VAYWYILSIG AQTDFLSVFF
 751 SGYTFKHKMV YEDTLTLFPF SGETVFMSME NPGLWILGCH NSDFRNRGMT
 801 ALLKVSSCDK NTGDY YEDSY EDISAYLLSK NNAIEPRSFS QNPPVLKRHQ
 851 AEITRTTLQS DQEEIDYDDT ISVEMKKEDF DIYDEDEDENQS PRSFQKTRH
 901 YFIAAVERLW DYGMSSSPHV LRNRAQSGSV PQFKKVVFQE FTDGSFTQPL
 951 YRGELNEHLG LLGPYIRAEV EDNIMVTFRN QASRPYSFYS SLISYEEDQR
 1001 QGAERKRFV KPNETKTYFW KVQHMAPTK DEFDCWAY FSDVDLEKDV
 1051 HSGLIGPLLV CHTNTLPAH GRQVTVQEFA LFFTIFDETK SWYFTENMER
 1101 NCRAPCNIQM EDPTFKENYR FHAINGYIMD TLPGLVMAQD QRIRWYLLSM
 1151 GSNENIHSIH FSGHVFTVRK KEEYKMALYN LYPGVFETVE MLPSKAGIWR
 1201 VECLIGEHLH AGMSTLFLVY SNKCQTPLGM ASGHIRDFQI TASGQYQWA
 1251 PKLARLHYSG SINAWSTKEP FSWIKVDLLA PMIIHGKIQ GARQKFSSLY
 1301 ISQFIIMYSL DGKKWQTYRG NSTGTLMVFF GNVDSGGIKH NIFNPIIAR
 1351 YIRLPHTHYS IRSTLRMELM GCDLNSCSMP LGMESKAISD AQITASSYFT
 1401 NMFATWSPSK ARLHLQGRSN AWRPQVNNPK EWLQVDFQKT MKVTGVTTQG
 1451 VKSLLTSMYV KEFLISSQD GHQWTLFFQN GKVKVFGQNG DSFTPVVNSL
 1501 DPPLLTRYLR IHPQSWVHQI ALRMEVLGCE AQDLYDKTHT CPPCPAPELL
 1551 GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH
 1601 NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT
 1651 ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG
 1701 QPENNYKTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH
 1751 YTQKSLSLSP GK*

Белковая последовательность pSYNFVIII 271 (FVIII Fc с 42 AE-XTEN в области аминокислоты 18) SEQ ID NO: 116.

1 MQIELSTCFF LCLLRFCSA TRRYLGAWE LSWDYMQGAP GSPAGSPTST
 51 EEGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPASSS DLGELPVDAR FPPRVPKSFP
 101 FNTSVVYKKT LFVEFTDHLF NIAKPRPPWM GLLGPTIQAE VYD TVVITLK
 151 NMASHPVS LH AVGVSYWKAS EGA EYDDQTS QREKEDDKVF PGGSHTYVWQ
 201 VLKENGPMAS DPLCLTYSYL SHVDLVKDLN SGLIGALLVC REGSLAKEKT
 251 QTLHKFILLF AVFDEGKSWH SETKNSLMQD RDAASARAWP KMHTVNGYVN
 301 RSLPGLIGCH RKS VYWHVIG MGTTP EVHSI FLEGHTFLVR NHRQASLEIS
 351 PITFLTAQTL LMDLGQFLF CHISSHQHDG MEAYVKVDSC PEEPQLRMKN
 401 NEEAEDYDDD LTDSEMDVVR FDDDNSPSFI QIRSVAKKHP KTWVHYIAAE
 451 EEDWDYAPLV LAPDDRSYKS QYLNNGPQRI GRKYK VRFM AYTDETFKTR
 501 EAIQHESGIL GPLLYGEVGD TLLIIFKNQA SRPYNIYPHG ITDVRPLYSR

551 RLPKGVKHLK DFPILPGEIF KYKWTVTVED GPTKSDPRCL TRYSSSFVNM
 601 ERDLASGLIG PLLICYKESV DQRGNQIMSD KRNVILFSVF DENRSWYLTE
 651 NIQRFLPNPA GVQLEDPEFQ ASNIMHSING YVFDSLQLSV CLHEVAYWYI
 701 LSIGAQTDFL SVFFSGYTFK HKMVYEDTLT LFPFSGETVF MSMENPGLWI
 751 LGCHNSDFRN RGMTALLKVS SCDKNTGDYY EDSYEDISAY LLSKNAIEP
 801 RSFSQNPPVL KRHQAEITRT TLQSDQEEID YDDTISVEMK KEDFDIYDED
 851 ENQSPRSFQK KTRHYFIAAV ERLWDYGMSS SPHVLRNRAQ SGSVPQFKKV
 901 VFQEFDTGSF TQPLYRGELN EHLGLLGPYI RAEVEDNIMV TFRNQASRPY
 951 SFYSSLISYE EDQRQGAEPK KNFVKPNETK TYFWKQHHM APTKDEFDCK
 1001 AWAYFSDVDL EKDVHSLGIG PLLVCHTNTL NPAHGRQVTV QEFALFFTIF
 1051 DETKSWYFTE NMERNCRAPC NIQMEDPTFK ENYRFHAING YIMDTLPGLV
 1101 MAQDQRIRWY LLSMGSNENI HSIHFSGHVF TVRKKEEYKM ALYNLYPGVF
 1151 ETVEMLPSKA GIWRVECLIG EHLHAGMSTL FLVYSNKCQT PLGMASGHIR
 1201 DFQITASQY QQWAPKLARL HYSGSINAW S TKEPFSWIKV DLLAPMIHIG
 1251 IKTQGARQKF SSLYISQFII MYSLDGKKWQ TYRGNSTGTL MVFFGNVDSS
 1301 GIKHNIFNPP IIARYIRLHP THYSIRSTLR MELMGCDLNS CSMPLGMESK
 1351 AISDAQITAS SYFTNMFATW SPSKARLHLQ GRSNAWRPQV NNPKEWLQVD
 1401 FQKTMKVTGV TTQGVKSLT SMYVKEFLIS SSQDGHQWTL FFQNGKVKVF
 1451 QGNQDSFTPV VNSLDPPLT RYLRIHPQSW VHQIALRMEV LGCEAQDLYD
 1501 KTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP
 1551 EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
 1601 KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG
 1651 FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSG GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN
 1701 VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK*

Белковая последовательность pSYN FVIII 272 (FVIII с 144 AE XTEN в области аминокислоты 18 и 244 AE XTEN в В-домене, без Fc) SEQ ID NO: 117.

1 MQIELSTCFF LCLLRFCSA TRRYYLGAWE LSWDYMGGAP TSESATPESG
 51 PGSEPATSGS ETPGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS ESATPESGPG
 101 TSTEPSEGS A PGSPAGSPTS TEEGTSESAT PESGPGSEPA TSGSETPGTS
 151 ESATPESGPG SPAGSPTSTE EGSPAGSPTS TEEGASSSDL GELPVDARFP
 201 PRVPKSFPPN TSVVYKKTFL VEFTDHLFNI AKPRPPWMGL LGPTIQAEVY
 251 DTVVITLKNM ASHPVSLHAV GVSYWKASEG AEYDDQTSQR EKEDDKVFPG
 301 GSHTYVWQVL KENGPMSADP LCLTYSYLSH VDLVKDLNSG LIGALLVCRE
 351 GSLAKEKTQT LHKFILLFAV FDEGKSWHSE TKNSLMQDRD AASARAWPKM
 401 HTVNGYVNRS LPGLIGCHRK SVYWHVIGMG TTPEVHSIFL EGHFTFLVRNH
 451 RQASLEISPI TFLTAQTLLM DLGQFLFCH ISSHQHDGME AYVKVDSCPE
 501 EPQLRMKNNE EAEDYDDDLT DSEMDVVRFD DDNSPSFIQI RSVAKKHPKT
 551 WVHYIAAEEE DWDYAPLVA PDDRSYKSQY LNNGPQRIGR KYKKVRFMAY
 601 TDETFTKREA IQHESGILGP LLYGEVGDIT LIIFKNQASR PYNIPPHGIT
 651 DVRPLYSRRL PKGVKHLKDF PILPGEIFKY KWTVTVEDGP TKSDPRCLTR
 701 YSSSFVNMER DLASGLIGPL LICYKESVDQ RGNQIMSDKR NVILFSVFDE

751 NRSWYL TENI QRFLPNPAGV QLEDPEFQAS NIMHSINGYV FDSLQLSVCL
 801 HEVAYWYILS IGAQTDFLSV FFSGYTFKHK MVEDTLTLF PFSGETVFMS
 851 MENPGLWILG CHNSDFRNRG MTALLKVSSC DKNTGDYED SYEDISAYLL
 901 SKNNAIEPRS FSQNGAPGTS ESATPESGPG SEPATSGSET PGTSESATPE
 951 SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGTS TEPSEGSAPG SPAGSPTSTE
 1001 EGTSESATPE SGPGSEPATS GSETPGTSES ATPESGPGSP AGSPTSTEEG
 1051 SPAGSPTSTE EGTSTEPSEG SAPGTSESAT PESGPGTSES ATPESGPGTS
 1101 ESATPESGPG SEPATSGSET PGSEPATSGS ETPGSPAGSP TSTEEGTSTE
 1151 PSEGSAPGTS TEPSEGSAPG SEPATSGSET PGTSESATPE SGPGTSTEPS
 1201 EGSAPASSPP VLKRHQAEIT RTTLQSDQEE IDYDDTISVE MKKEDFDIYD
 1251 EDENQSPRSF QKKTRHYFIA AVERLWDYGM SSSPHVLRNR AQSGSVQPKF
 1301 KVVVFQFTDG SFTQPLYRGE LNEHLGGLGP YIRAEVEDNI MVTFRNQASR
 1351 PYSFYSSLIS YEEDQRQGA PRKNFVKPNE TKTYFWKVQH HMAPTKDEFD
 1401 CKAWAYFSDV DLEKDVHSGI IGPLLCHTN TLNPAHGRQV TVQEFALFFT
 1451 IFDETKSWYF TENMERN CRA PCNIQMEDPT FKENYRFHAI NGYIMDTLPG
 1501 LVMAQDQRIR WYLLSMGSNE NIHSIHFSGH VFTVRKKEEY KMALYNLYPG
 1551 VFETVEMLPS KAGIWRVECL IGEHLHAGMS TLFLVYSNKC QTPLGMASGH
 1601 IRDFQITASG QYGQWAPKLA RLHYSGSINA WSTKEPFSWI KVDLLAPMII
 1651 HGIKTQGARQ KFSSLYISQF IIMYSLDGKK WQTYRGNSTG TLMVFFGNVD
 1701 SSGIKHNIFN PPIIARYIRL HPTHYSIRST LRMELMGCDL NSCSMPLGME
 1751 SKAISDAQIT ASSYFTNMFA TWSPSKARLH LQGRSNAWRP QVNNPKEWLQ
 1801 VDFQKTMKVT GVTTQGVKSL LTSMYVKEFL ISSSQDGHQW TLFFQNGKVK
 1851 VFQGNQDSFT PVVNSLDPPL LTRYLRIHPQ SWVHQIALRM EVLGCEAQLD
 1901 Y*

Белковая последовательность pSYN VWF 031 (VWF D1D2D'D3-тромбин-расщепляемый GS линкер длиной 48 АК-Fc) SEQ ID NO: 118.

1 MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFNVTDFGSM
 51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVLSVYLGE FFDIHLFVNG
 101 TVTQGDQ RVS MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL
 151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
 201 ERASPPSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
 251 EKTLCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWDHSA CSPVCPAGME
 301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLEDEG LCVESTTEPC
 351 VHS GKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD
 401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIETV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
 451 LHNSLVK LKH GAGVAMDGQD IQLPLLKGD L RIQHTVTASV RLSYGEDLQM
 501 DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
 551 NAWKLHGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
 601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCCL
 651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLT CR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
 701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD

751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
 801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
 851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ YVLVQDYCGS
 901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTLVE GGEIELFDGE VNVKRPMKDE
 951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
 1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI
 1051 MKQTMVDSSC RILTSDVFQD CNKLVDPPEY LDVCIYDTCS CESIGDCAAF
 1101 CDTIAAYAHV CAQHGKVVTW RTATLCPQSC EERNLRENGY EAEWRYNSCA
 1151 PACQVTCQHP EPLACPVCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
 1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGGGGSGGG
 1251 GSGGGSGGG GSGGGSGGG GSVLPRGSGG GSGGGGSDK THTCPPCPAP
 1301 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV
 1351 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKALPAPI
 1401 EKTISKAKGQ PREPQVYTLPSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
 1451 SNGQPENNYK TTPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
 1501 HNHYTQKSLS LSPGK*

Белковая последовательность pSYN VWF 034 (VWF D1D2'D3-288AE XTEN-тромбин-расщепляемый GS линкер длиной 35 АК-Fc) SEQ ID NO: 119.

1 MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFVNTFDGSM
 51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVLSVYLGE FFDIHLFVNG
 101 TVTQGDQRVS MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSNGFQVLL
 151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
 201 ERASPPSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
 251 EKTLCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWTDHSA CSPVCPAGME
 301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTECPC
 351 VHSBKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD
 401 NRYFTFSGIC QYLLARDCQD HSFSIVIEV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
 451 LHNSLVKLVK GAGVAMDGQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQM
 501 DWDGRGRLLV KLSPVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
 551 NAWKLVHGDQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
 601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCEL
 651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
 701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGMHCTM SGVPGSLLPD
 751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
 801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
 851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ YVLVQDYCGS
 901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTLVE GGEIELFDGE VNVKRPMKDE
 951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
 1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI
 1051 MKQTMVDSSC RILTSDVFQD CNKLVDPPEY LDVCIYDTCS CESIGDCAAF
 1101 CDTIAAYAHV CAQHGKVVTW RTATLCPQSC EERNLRENGY EAEWRYNSCA
 1151 PACQVTCQHP EPLACPVCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
 1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGTSESATP
 1251 ESGPGSEPAT SGSETPGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP GTSESATPES

1301 GPGTSTEPSE GSAPGSPAGS PTSTEEGTSE SATPESGPGS EPATSGSETP
 1351 GTSESATPES GPGSPAGSPT STEEGSPAGS PTSTEEGTST EPSEGSAPGT
 1401 SESATPESGP GTSESATPES GPGTSESATP ESGPGSEPAT SGSETPGSEP
 1451 ATSGSETPGS PAGESPTSTEE GTSTEPSEGS APGTSTEPSE GSAPGSEPAT
 1501 SGSETPGTSE SATPESGPGT STEPSEGSAP DIGGGGGSGG GGSLVPRGSG
 1551 GDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
 1601 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
 1651 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLV
 1701 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
 1751 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*
 Белковая последовательность рSYN VWF 036 (VWF D1D2D'D-тромбин-
 расщепляемый GS линкер длиной 98 АК-Fc) SEQ ID NO: 120.
 1 MIPARFAGVL LALALILPGT LCAEGTRGRS STARCSLFGS DFVNTFDGSM
 51 YSFAGYCSYL LAGGCQKRSF SIIGDFQNGK RVLSVYVLGE FFDIHLFVNG
 101 TVTQGDQRVS MPYASKGLYL ETEAGYYKLS GEAYGFVARI DGSGNFQVLL
 151 SDRYFNKTCG LCGNFNIFAE DDFMTQEGTL TSDPYDFANS WALSSGEQWC
 201 ERASPPSSSC NISSGEMQKG LWEQCQLLKS TSVFARCHPL VDPEPFVALC
 251 EKTLCCECAGG LECACPALLE YARTCAQEGM VLYGWTDHSA CSPVCPAGME
 301 YRQCVSPCAR TCQSLHINEM CQERCVDGCS CPEGQLLDEG LCVESTCEPC
 351 VHSGKRYPPG TSLSRDCNTC ICRNSQWICS NEECPGECLV TGQSHFKSFD
 401 NRYFTFGSIC QYLLARDCQD HSFIVIVTV QCADDRDAVC TRSVTVRLPG
 451 LHNSLVKLVK GAGVAMDGQD IQLPLLKGD LRIQHTVTASV RLSYGEDLQM
 501 DWDGRGRLLV KLSVYAGKT CGLCGNYNGN QGDDFLTPSG LAEPRVEDFG
 551 NAWKLVHGDCQ DLQKQHS DPC ALNPRMTRFS EEACAVLTSP TFEACHRAVS
 601 PLPYLRNCRY DVCSCSDGRE CLCGALASYA AACAGRGVRV AWREPGRCCL
 651 NCPKGQVYLQ CGTPCNLTCR SLSYPDEECN EACLEGCFCP PGLYMDERGD
 701 CVPKAQCPCY YDGEIFQPED IFSDHHTMCY CEDGFMHCTM SGVPGSLLPD
 751 AVLSSPLSHR SKRSLSCRPP MVKLVCPADN LRAEGLECTK TCQNYDLECM
 801 SMGCVSGCLC PPGMVRHENR CVALERCPCF HQGKEYAPGE TVKIGCNTCV
 851 CRDRKWNCTD HVCDATCSTI GMAHYLTFDG LKYLFPGECQ YVLVQDYCGS
 901 NPGTFRILVG NKGCSHPSVK CKKRVTILVE GGEIELFDGE VNVKRPMKDE
 951 THFEVVESGR YIILLGKAL SVVWDRHLSI SVVLKQTYQE KVCGLCGNFD
 1001 GIQNNDLTSS NLQVEEDPVD FGNSWKVSSQ CADTRKVPLD SSPATCHNNI
 1051 MKQTMVDSSC RILTSDVFQD CNKLVDPPEY LDVCIYDTCS CESIGDCAAF
 1101 CDTIAAYAHV CAQHGVVVTW RTATLCPQSC EERNLRENGY EAEWRYNSCA
 1151 PACQVTCQHP EPLACPVQCV EGCHAHCPPG KILDELLQTC VDPEDCPVCE
 1201 VAGRRFASGK KVTLNPSDPE HCQICHCDVV NLTCEACQEP ISGGGGSGGG
 1251 GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG
 1301 GSGGGGSGGG GSGGGGSGGG GSLVPRGSGG GGSGGGGSDK THTCPPCPAP
 1351 ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VKFNWYVDGV
 1401 EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI
 1451 EKTISKAKGQ PREPVYTLPSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
 1501 SNGQPENNYK TTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL
 1551 HNHYTQKSLS LSPGK*

Белковая последовательность pSYN Fc-015 (Fc-домен IgG) SEQ ID NO: 121.
 1 METDTLLLWV LLLWVPGSTG DKTHTCPSP APELLGGPSV FLFPPKPKDT
 51 LMISRPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY
 101 RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 151 LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS
 201 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK*

Пример 15.

Гетеродимеры FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc сохраняли нормальную FVIII-специфическую активность по сравнению с BDD-FVIII дикого типа. Определили FVIII-специфическую активность гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc. Гетеродимеры очищали с помощью двухэтапного хроматографического процесса. Использовали анионообменную смолу для слабых анионов, а затем аффинную хроматографию. Конечный очищенный продукт обладал приемлемой чистотой согласно эксклюзионной ВЭЖХ. Удельная активность была сопоставима с активностью FVIII с удаленным В-доменом (BDD-FVIII) согласно измерению с помощью хромогенного анализа FVIII и концентрации A280. Данные представлены в табл. 26. Все протестированные молекулы продемонстрировали FVIII-специфическую активность, сопоставимую с активностью BDD-FVIII. Чистоту и присутствие каждого фрагмента указанных молекул подтверждали с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ и вестерн-блоттинга.

Таблица 26

FVIII-специфическая активность гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc

Конструкт	FVIII 207 scBDDFVIII	FVIII-66 dcBDD FVIII)	FVIII 155 / vWF31	FVIII 155 / vWF39	FVIII 169 / vWF31	FVIII 205 / vWF31	FVIII 169 / vWF34
Измеренная удельная активность (МЕ/нмоль)	1473	1592	1534	1796	1511	1345	1505

Сравнивали периоды полужизни rFVIII-XTEN/D'D3 и BDD-FVIII у мышей HemA (фиг. 15; табл. 27). Как показано на фиг. 15, rFVIII-XTEN/D'D3 достигал периода полужизни, четырехкратно превышающего период полужизни, достигнутый BDD-FVIII.

Таблица 27

rFVIII-XTEN/D'D3 и BDD-FVIII у мышей HemA

Обработка	5-минутное восстановление (%)	HL (ч)	MRT (ч)	Cl (мл/ч/кг)	Vss (мл/кг)	ППК D (ч*кг*мМЕ/ мл*мМЕ)
BDD-FVIII	89	7,6	11	4,5	49,2	0,22
rFVIII-Fc	78	16	20	2,9	57,8	0,35
rFVIII- XTEN/D'D3	86	30	36	1,8	63,4	0,57

Пример 16. Эффективность гетеродимера FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc (активность FVIII) при гемостазе согласно измерению с помощью одноэтапного анализа аЧТВ.

Эффективность гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc при гемостазе оценивали по их FVIII-специфической аЧТВ-активности; сводные данные представлены в табл. 28. Как продемонстрировано в табл. 28, хотя добавление фрагмента D'D3 VWF и внедрение XTEN в пределах доменов FVIII снижало FVIII-специфическую аЧТВ-активность гетеродимеров (согласно данным FVIII155/VWF031 и данным FVIII205/VWF031), вставки XTEN в области В-домена FVIII или С-конца фрагмента D'D3 VWF не оказывали негативного влияния на аFVIII-специфическую аЧТВ-активность (согласно данным FVIII169/VWF031 и данным FVIII169/VWF034). По сравнению с двуцепочечным BDD-FVIII (dcBDD-FVIII), FVIII155/VWF031, FVIII169/VWF031, FVIII169/VWF034 и VWF205/VWF031 демонстрировали снижение удельной аЧТВ-активности в 2,5, 2,8, 2,6 и 5,5 раза соответственно.

Таблица 28

FVIII-специфическая аЧТВ-активность гетеродимеров FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc

Конструкт	FVIII 207 scBDD- FVIII	FVIII-66 dcBDD- FVIII	FVIII 155 / VWF31	FVIII 169 / VWF31	FVIII 205 / VWF31	FVIII 169 / VWF34
Измеренная удельная аЧТВ- активность (МЕ/нмоль)	818 ± 153	1188 ± 213	448 ± 111	416 ± 70	214 ± 38	436 ± 189

FVIII-специфический анализ аЧТВ.

Варианты FVIII разбавляли буфером для определения аЧТВ (0,15 М NaCl, 0,05 М трис-HCl, 1%

БСА, рН 7,4) в линейном аналитическом диапазоне (200-1,6 мЕ/мл). 50 мкл разбавленных образцов или стандартов последовательно смешивали с 50 мкл наивной объединенной плазмы человека с НемА при 37°C, 50 мкл аЧТВ-реагента (ACTIN® FSL-активированного цефалопластинного реагента - Dade Behring, регистрационный номер В4219-2) при 37°C и инкубировали при 37°C в течение 4 мин. Для запуска реакций свертывания к реакционной смеси добавляли 50 мкл 20 мМ CaCl₂ (Dade Behring [регистрационный номер ORFO37]). На основании времени свертывания каждого образца (продолжительность времени от добавления CaCl₂ до начала образования тромба) рассчитывали аЧТВ-активность по сравнению со стандартом, полученным с использованием концентрата 8-го международного стандарта FVIII. Удельную аЧТВ-активность рассчитывали в зависимости от концентрации белка каждой молекулы, которую измеряли по OD280.

Пример 17. Эффективность гетеродимера FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc гетеродимера *in vivo* в модели кровотечения при обрезке хвоста мышей НемА.

Для дальнейшей оценки эффективности гетеродимеров при гемостазе оценивали острую эффективность FVIII169/VWF034 и FVIII205/VWF031 по сравнению с BDD-FVIII в модели кровотечения при обрезке хвоста мышей НемА. Мышей НемА обрабатывали посредством разовой в/в инъекции BDD-FVIII в дозе 200, 65 и 20 МЕ/кг для определения контрольного уровня кровопотери после обрезки хвоста. Кровопотерю у мышей, получавших 200 МЕ/кг FVIII169/VWF034 или FVIII205/VWF031, сравнивали с кровопотерей у контрольной группы мышей, получавших BDD-FVIII, для оценки их эффективности при гемостазе. Животных, получавших носитель, использовали для определения исходной кровопотери в данной модели. Как показано на фиг. 16, во всех группах, получавших FVIII, наблюдалось значительное снижение кровопотери по сравнению с животными, получавшими носитель ($p < 0,05$). Как FVIII169/VWF034, так и FVIII205/VWF031 являлись эффективными в модели обрезки хвоста мышей НемА. По сравнению с BDD-FVIII, наблюдали приблизительно 3-кратное снижение эффективности для FVIII169/VWF034 согласно аналогичному снижению кровопотери, достигаемому за счет 65 МЕ/кг BDD-FVIII и 200 МЕ/кг FVIII169/VWF034. Как и для FVIII205/VWF034, наблюдали 10-кратное снижение эффективности согласно аналогичному снижению кровопотери, достигаемому за счет 20 МЕ/кг BDD-FVIII и 200 МЕ/кг FVIII205/VWF031. Даже несмотря на аналогичную удельную хромогенную FVIII-активность FVIII169/VWF034 и FVIII205/VWF031 по сравнению с гBDD-FVIII их аЧТВ-активность FVIII и эффективность *in vivo* снижались вследствие модификации молекул. Указанные данные показывают, что аЧТВ-активность молекул FVIII представляет собой более точный прогностический показатель их эффективности при гемостазе *in vivo*, чем хромогенная FVIII-активность.

Модель кровотечения при обрезке хвоста мышей НемА.

В данном исследовании использовали самцов мышей НемА в возрасте 8-10 недель. Перед обрезкой хвоста мышей анестезировали с помощью смеси 50 мг/кг кетамина/0,5 мг/кг дексмететомидина и помещали на грелку-подушку при 37°C для поддержания температуры тела. Затем хвосты мышей погружали в воду, нагретую до 37°C, на 10 мин для расширения боковой вены. После расширения вены вводили инъекцию гFVIII или раствора носителя в хвостовую вену и через 5 мин отрезали дистальные 1 см хвоста скальпелем № 11 с прямым краем. Пролитую кровь собирали в 13 мл физиологического раствора, нагретого до 37°C в течение 30 мин, и подвергали анестезированных мышей эвтаназии путем двусторонней торакотомии. Кровопотерю (в граммах) количественно определяли гравиметрически по изменению массы пробирки для отбора крови до и после отбора крови, а затем переводили в миллилитры (мл) объема кровопотери (1 г изменения массы=1 мл кровопотери).

Приведенное выше описание конкретных вариантов реализации настолько полно раскрывает общий характер изобретения, что посторонние лица легко могут, применяя знания в данной области техники, модифицировать и/или адаптировать такие конкретные варианты реализации для различных областей применения без чрезмерного экспериментирования, не отходя от общей концепции настоящего изобретения. Следовательно, такие адаптации и модификации должны находиться в рамках описанных вариантов реализации, основываясь на информации и рекомендациях, представленных в настоящем документе. Следует понимать, что фразеология или терминология, приведенная в настоящем документе, предназначена для цели описания, а не для ограничения, поэтому специалист должен интерпретировать терминологию или фразеологию настоящего описания в свете указанной информации и рекомендаций.

Для специалистов в данной области техники после рассмотрения описания и вариантов реализации настоящего изобретения, описанных в настоящем документе, будут очевидны другие варианты реализации настоящего изобретения. Предполагается, что описание и примеры следует рассматривать лишь в качестве типичных образцов, а подлинные рамки и суть изобретения указаны в следующей формуле изобретения. Все патенты и публикации, цитируемые в настоящем документе, полностью включены в него посредством ссылок.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения заболевания или состояния, связанного с кровотечениями, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции, содер-

жащей

(a) химерный белок, содержащий

(i) фрагмент фактора фон Виллебранда (VWF), содержащий домен D' и домен D3 фактора фон Виллебранда,

(ii) первую удлиненную полипептидную последовательность XTEN, и

(iii) белок фактора VIII (FVIII); и

(b) фармацевтически приемлемый носитель;

при этом VWF фрагмент и первая последовательность XTEN связаны, причем VWF фрагмент или первая последовательность XTEN связана с белком FVIII; и причем

(a) VWF фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 100;

(b) белок FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6; или белок FVIII содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь белка FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 1-745 последовательности SEQ ID NO: 4, и легкая цепь белка FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 1649-2332 последовательности SEQ ID NO: 4; и

(c) первая последовательность XTEN содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 36; SEQ ID NO: 37; SEQ ID NO: 38; SEQ ID NO: 39; SEQ ID NO: 40; SEQ ID NO: 41; SEQ ID NO: 42; SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136 или SEQ ID NO: 137.

2. Способ по п.1, в котором химерный белок содержит

(a) единственную полипептидную цепь, содержащую VWF фрагмент, последовательность XTEN и белок FVIII; или

(b) две полипептидные цепи, содержащие первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, где первая полипептидная цепь содержит белок FVIII, а вторая полипептидная цепь содержит VWF фрагмент и последовательность XTEN.

3. Способ по п.1 или 2, в котором химерный белок дополнительно содержит (iv) константную область иммуноглобулина (Ig) или ее часть, связанную либо с VWF фрагментом, первой последовательностью XTEN, либо с белком FVIII или их любой комбинацией.

4. Способ лечения заболевания или состояния, связанного с кровотечениями, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок и фармацевтически приемлемый носитель, причем химерный белок содержит формулу, включающую

(a) V-X-FVIII,

(b) FVIII-X-V,

(c) V-X:FVIII,

(d) X-V:FVIII,

(e) FVII:IV-X,

(f) FVIII:X-V,

(g) V-L2-X-L1-F1:FVIII-L3-F2,

(h) V-L2-X-L1-F1:F2-L3-FVIII,

(i) F1-L1-X-L2-V:FVIII-L3-F2,

(j) F1-L1-X-L2-V:F2-L3-FVIII,

(k) V-L2-X-L1-F1-L4-FVIII-L3-F2,

(l) F2-L3-FVIII-L4-F1-L1-X-L2-V,

(m) FVIII-L3-F2-L4-V-L2-X-L1-F1, и

(n) F1-L1-X-L2-V-L4-F2-L3-FVIII,

где V содержит VWF фрагмент,

каждый из L1, L2 и L3 содержит линкер,

L4 представляет собой линкер,

FVIII содержит белок FVIII,

X содержит одну или более последовательностей XTEN,

F1 содержит константную область Ig или ее часть,

F2 содержит дополнительную константную область Ig или ее часть,

(-) представляет собой пептидную связь или одну или более аминокислот, и

(:) представляет собой ковалентную связь или нековалентную связь.

5. Способ по п.3 или 4, отличающийся тем, что константная область Ig или ее часть содержит первую область Fc, которая связана с последовательностью XTEN или VWF фрагментом.

6. Способ по п.5, отличающийся тем, что константная область Ig или ее часть связана с последовательностью XTEN линкером.

7. Способ по п.6, отличающийся тем, что указанный линкер включает расщепляемый линкер.
8. Способ по любому из пп.3-7, в котором химерный белок содержит также дополнительную константную область Ig или ее часть.
9. Способ по п.8, отличающийся тем, что дополнительная константная область Ig или ее часть содержит вторую область Fc.
10. Способ по п.9, отличающийся тем, что дополнительная константная область Ig или ее часть связана с белком FVIII.
11. Способ по п.9 или 10, отличающийся тем, что вторая область Fc дополнительно связана с VWF фрагментом линкером.
12. Способ по любому из пп.8-11, отличающийся тем, что дополнительная константная область Ig или ее часть связана с константной областью Ig или ее частью.
13. Способ по п.12, отличающийся тем, что дополнительная константная область Ig или ее часть связана с константной областью Ig или ее частью ковалентной связью.
14. Способ по п.13, отличающийся тем, что указанная ковалентная связь представляет собой дисульфидную связь.
15. Способ по любому из пп.1-14, отличающийся тем, что VWF фрагмент связан с белком FVIII нековалентной связью.
16. Способ по любому из пп.4-15, который также содержит вторую последовательность XTEN, соединенную с белком FVIII линкером на N-конце или C-конце белка FVIII или встроенную непосредственно ниже от одного или более сайтов встраивания в белке FVIII.
17. Способ лечения заболевания или состояния, связанного с кровотечениями, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок и фармацевтически приемлемый носитель, причем химерный белок содержит формулу, включающую
- (1) FVIII(X1)-L1-F1:V-L2-X2-L3-F2,
 - (2) FVIII(X1)-L1-F1:F2-L3-X2-L2-V,
 - (3) F1-L1-FVIII(X1):V-L2-X2-L3-F2,
 - (4) F1-L1-FVIII(X1):F2-L3-X2-L2-V,
 - (5) FVIII(X1)-L1-F1-L4-V-L2-X2-L3-F2,
 - (6) FVIII(X1)-L1-F1-L4-F2-L3-X2-L2-V,
 - (7) F1-L1-FVIII(X1)-L4-V-L2-X2-L3-F2, или
 - (8) F1-L1-FVIII(X1)-L4-F2-L3-X2-L2-V,
- где FVIII(X1) содержит белок FVIII и последовательность XTEN, при этом указанная последовательность XTEN связана с N-концом или C-концом белка FVIII или встроена непосредственно ниже одной или более аминокислот ("один или более сайтов встраивания") в белке FVIII, каждый из L1, L2 и L3 представляет собой линкер, L4 представляет собой линкер, X2 содержит одну или более последовательностей XTEN, F1 содержит константную область Ig или ее часть, F2 содержит дополнительную константную область Ig или ее часть, и V содержит VWF фрагмент, (-) представляет собой пептидную связь или одну или более аминокислот, и (:) содержит ковалентную связь или нековалентную связь.
18. Способ по любому из пп.8-17, отличающийся тем, что константная область Ig или ее часть и дополнительная константная область Ig или ее часть являются одинаковыми или разными.
19. Способ лечения заболевания или состояния, связанного с кровотечениями, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок и фармацевтически приемлемый носитель, причем химерный белок содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, при этом указанная первая полипептидная цепь содержит белок FVIII и первую константную область Ig или ее часть и указанная вторая полипептидная цепь содержит VWF фрагмент, первую последовательность XTEN и вторую константную область Ig или ее часть; и причем
- (a) VWF фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 100;
 - (b) белок FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6; или белок FVIII содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь белка FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 1-740 последовательности SEQ ID NO: 4, и легкая цепь белка FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 1649-2332 последовательности SEQ ID NO: 4; и
 - (c) первая последовательность XTEN содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154,

SEQ ID NO: 155 или SEQ ID NO: 156.

20. Способ лечения заболевания или состояния, связанного с кровотечениями, у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок и фармацевтически приемлемый носитель, причем химерный белок содержит первую полипептидную цепь и вторую полипептидную цепь, при этом указанная первая полипептидная цепь содержит фрагмент VWF, первую последовательность XTEN, первую константную область Ig или ее часть и указанная вторая полипептидная цепь содержит белок FVIII, вторую последовательность XTEN и вторую константную область Ig или ее часть; и причем

(a) VWF фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 100;

(b) белок FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6; или белок FVIII содержит тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая цепь белка FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 1-740 последовательности SEQ ID NO: 4, и легкая цепь белка FVIII содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотам 1649-2332 последовательности SEQ ID NO: 4; и

(c) первая последовательность XTEN содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155 или SEQ ID NO: 156.

21. Способ по п.20, отличающийся тем, что вторая последовательность XTEN встроена в один или более сайтов встраивания в белке FVIII, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков в табл. 7, 8, 9 и 10.

22. Способ по любому из пп.1-21, отличающийся тем, что белок FVIII содержит домен В или его часть.

23. Способ по п.22, отличающийся тем, что белок FVIII представляет собой FVIII с делецией домена SQ В.

24. Способ по п.21, отличающийся тем, что белок FVIII

(i) содержит домен В или его часть; или

(ii) белок FVIII представляет собой FVIII с делецией домена SQ В,

причем вторая последовательность XTEN встроена в домен В или его часть.

25. Способ по любому из пп.1-24, отличающийся тем, что белок FVIII содержит одноцепочечный FVIII и указанный одноцепочечный FVIII содержит по меньшей мере одну замену аминокислоты в остатке, соответствующем остатку 1648, остатку 1645 или обоим в полноразмерном зрелом полипептиде FVIII (SEQ ID NO: 4), или остатку 754, остатку 751 или обоим в SQ BDD FVIII (SEQ ID NO: 6).

26. Способ по любому из пп.1-25, отличающийся тем, что VWF фрагмент содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотам с 764 по 1240 последовательности SEQ ID NO: 2.

27. Способ по п.26, отличающийся тем, что VWF фрагмент по существу состоит из или состоит из аминокислот с 764 по 1240 последовательности SEQ ID NO: 2.

28. Способ по любому из пп.1-27, отличающийся тем, что VWF фрагмент содержит замену остатка, соответствующего остатку 1099, остатку 1142 или как остатку 1099, так и остатку 1142 последовательности SEQ ID NO: 2, аминокислотой, отличной от цистеина.

29. Способ по любому из пп.1-28, отличающийся тем, что VWF фрагмент по существу состоит из или состоит из домена D' и домена D3 фактора фон Виллебранда или их фрагментов.

30. Способ по любому из пп.1-28, отличающийся тем, что VWF фрагмент не содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

(1) аминокислот 1241-2813 последовательности SEQ ID NO: 2,

(2) аминокислот 1270-2813 последовательности SEQ ID NO: 2,

(3) аминокислот 1271-2813 последовательности SEQ ID NO: 2,

(4) аминокислот 1272-2813 последовательности SEQ ID NO: 2,

(5) аминокислот 1273-2813 последовательности SEQ ID NO: 2,

(6) аминокислот 1274-2813 последовательности SEQ ID NO: 2, и

любых их комбинаций.

31. Способ по любому из пп.1-28, отличающийся тем, что VWF фрагмент не содержит аминокислоты 1274-2813 последовательности SEQ ID NO: 2.

32. Способ по любому из пп.1-31, отличающийся тем, что первая последовательность XTEN содержит по меньшей мере один мотив, выбранный из табл. 2А.

33. Способ по любому из пп.1-32, отличающийся тем, что первая последовательность XTEN содержит AE42, AE72, AE864, AE576, AE288, AE144, AG864, AG576, AG288 или AG144.

34. Способ по любому из пп.1-33, отличающийся тем, что заболевание или состояние, связанное с кровотечениями, представляет собой гемофилию А.

35. Способ лечения заболевания или состояния, связанного с кровотечениями, у субъекта, нуждаю-

шегося в этом, включающий введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей химерный белок и фармацевтически приемлемый носитель, причем химерный белок содержит

- (a) первый полипептид, содержащий
 - (i) фрагмент фактора фон Виллебранда (VWF), содержащий домен D' и домен D3 VWF,
 - (ii) первую последовательность XTEN, и
 - (iii) первую область Fc; и
- (b) второй полипептид, содержащий
 - (i) белок фактора VIII (FVIII), и
 - (ii) вторую область Fc,

причем VWF фрагмент и первая последовательность XTEN связаны пептидной связью, причем VWF фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 100,

причем полипептид FVIII содержит аминокислоты 1-745 и 1649-2332 полноразмерного зрелого фактора VIII человека (SEQ ID NO: 4), и

причем первая последовательность XTEN содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 131.

36. Способ по п.35, отличающийся тем, что первая область Fc связана со второй областью Fc ковалентной связью.

37. Способ по п.35 или 36, отличающийся тем, что первая область Fc связана с первой последовательностью XTEN линкером.

38. Способ по п.37, отличающийся тем, что указанный линкер включает расщепляемый тромбином линкер.

39. Способ по п.36, отличающийся тем, что указанная ковалентная связь представляет собой дисульфидную связь.

40. Способ по п.39, отличающийся тем, что первая область Fc ассоциирована со второй областью Fc двумя дисульфидными связями.

41. Способ по любому из пп.35-40, отличающийся тем, что второй полипептид дополнительно содержит вторую XTEN.

42. Способ по п.41, отличающийся тем, что вторая XTEN встроена непосредственно ниже одного или более сайтов встраивания в белке FVIII.

43. Способ по п.41 или 42, отличающийся тем, что вторая XTEN встроена в белке FVIII непосредственно ниже сайта встраивания, соответствующего остатку 745 полноразмерного зрелого фактора VIII человека (SEQ ID NO: 4).

44. Способ по любому из пп.41-43, отличающийся тем, что первая последовательность XTEN связана с С-концом VWF фрагмента и первая область Fc связана с С-концом первой последовательности XTEN расщепляемым тромбином линкером, причем вторая область Fc связана с С-концом белка FVIII.

45. Способ по пп.35-44, отличающийся тем, что первая область Fc и вторая область Fc являются идентичными.

46. Способ по любому из пп.35-45, отличающийся тем, что белок FVIII содержит домен В или его часть.

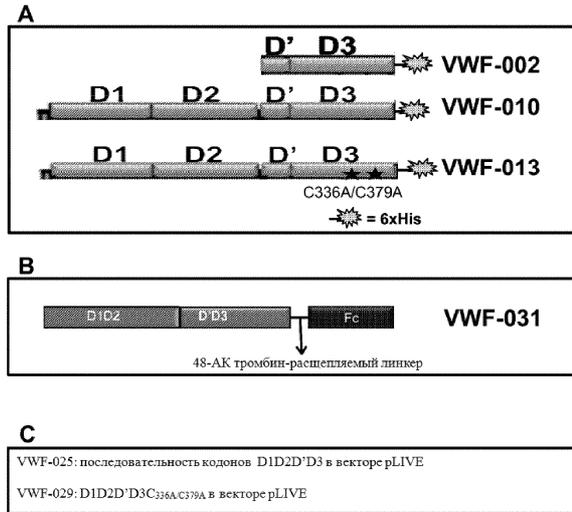
47. Способ по любому из пп.35-46, отличающийся тем, что VWF фрагмент содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична аминокислотам с 764 по 1240 последовательности SEQ ID NO: 2.

48. Способ по любому из пп.35-47, отличающийся тем, что VWF фрагмент содержит замену остатка, соответствующего остатку 1099, остатку 1142 или как остатку 1099, так и остатку 1142 аминокислотой последовательности SEQ ID NO: 2, отличной от цистеина.

49. Способ по любому из пп.35-48, отличающийся тем, что заболевание или состояние, связанное с кровотечениями, представляет собой гемофилию А.

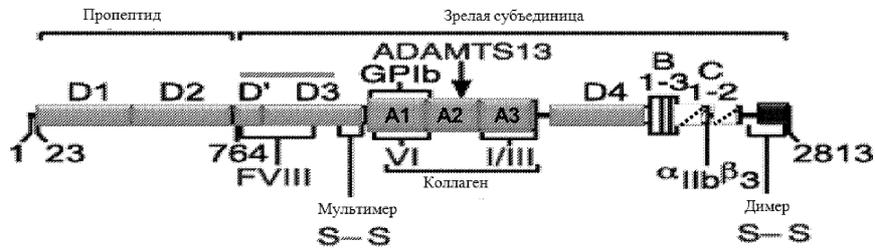
50. Способ по любому из пп.35-49, отличающийся тем, что композицию вводят путем внутривенного введения.

Различные конструкторы VWF



Фиг. 1А-1С

Фактор Виллебранда



➤ Белок с массой ~ 250 кДа, образует мультимеры (> 20 МДа) за счет дисульфидных связей

➤ Связан с FVIII (95-98%) в составе нековалентного комплекса

- Защищает FVIII от расщепления/активации протеазами
- Стабилизирует тяжелую и легкую цепь
- Предотвращает клиренс FVIII за счет рецепторов макрофагов

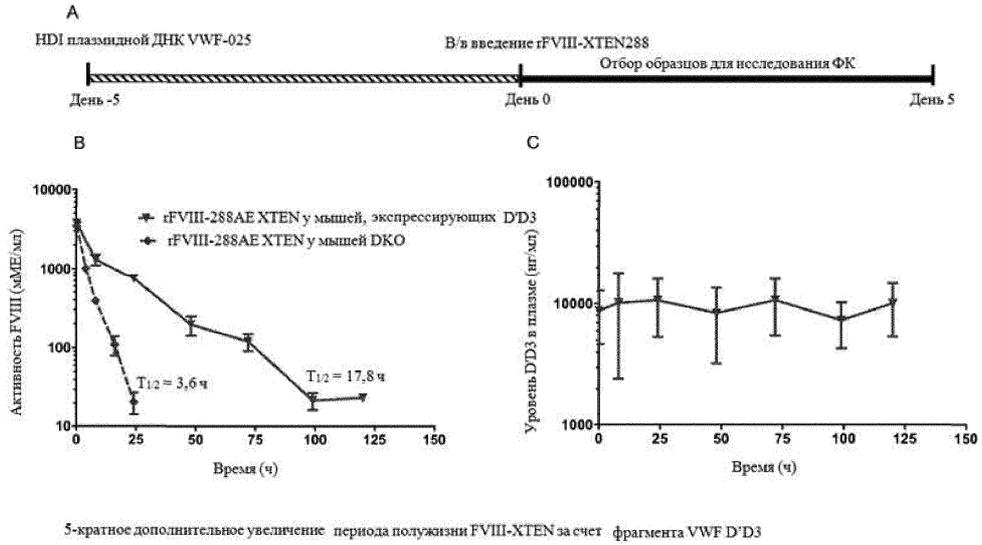
} Увеличивает период полужизни

- Клиренс комплекса FVIII-vWF за счет рецепторов vWF
- Предотвращает пиноцитоз и круговорот rFVIIIc?

} Ограничивает период полужизни

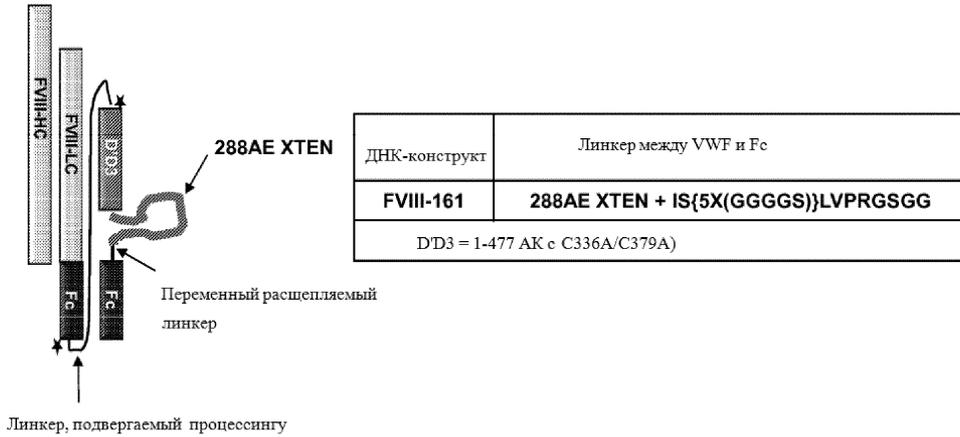
Фиг. 1D

ФК rFVIII XTEN у мышей, экспрессирующих VWF D'D3



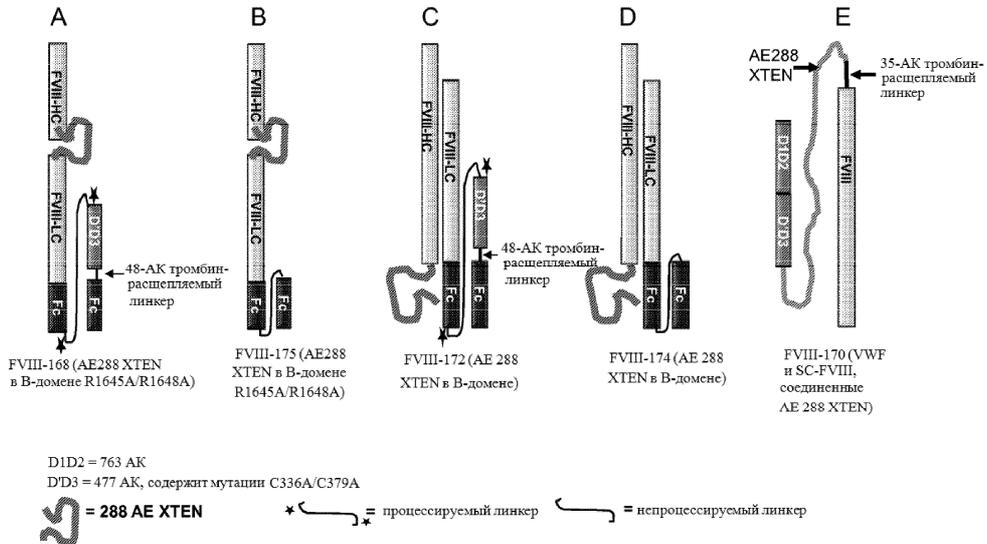
Фиг. 2

Конструкты гетеродимера FVIII_{FC}/VWF (переменный линкер)



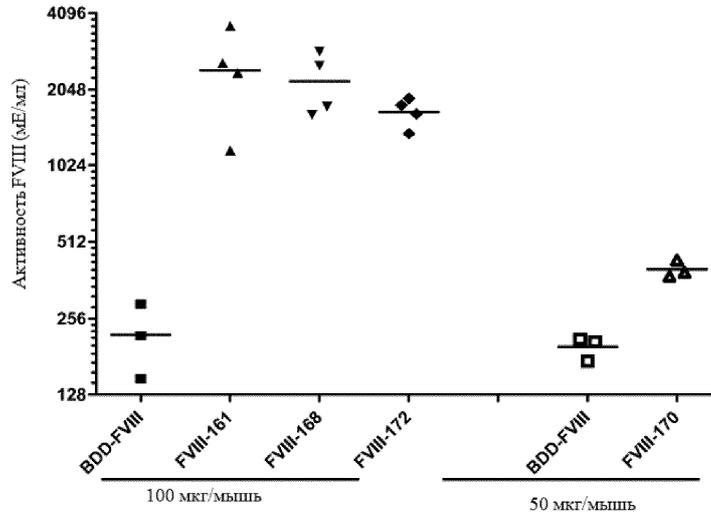
Фиг. 3

Конструкты FVIII/VWF с вставками XTEN



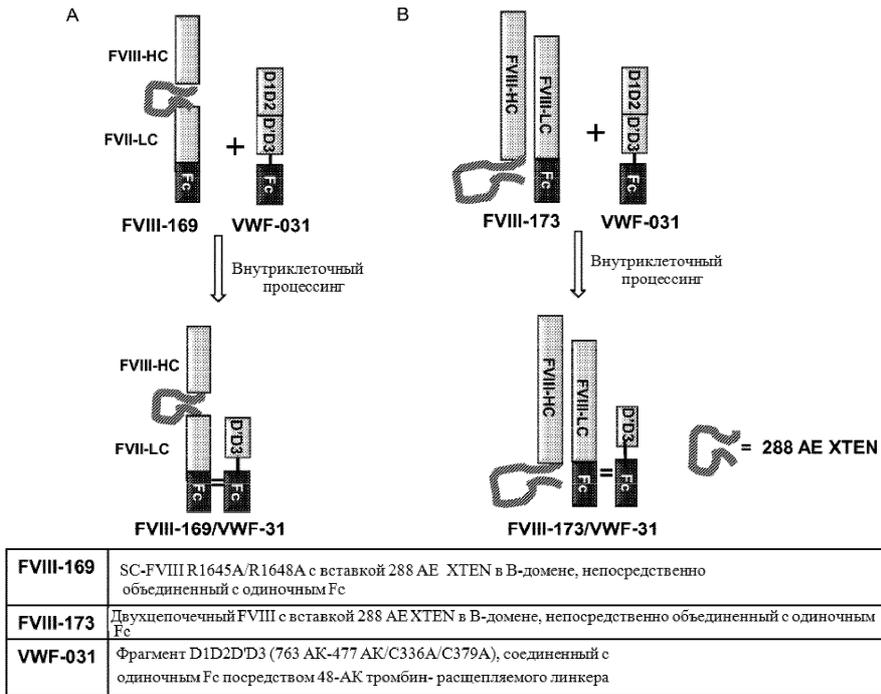
Фиг. 4

Вставка ХТЕН улучшает ФК гетеродимеров FVIII/VWF
Активность FVIII в плазме через 24 ч после НДИ у мышей ДКО



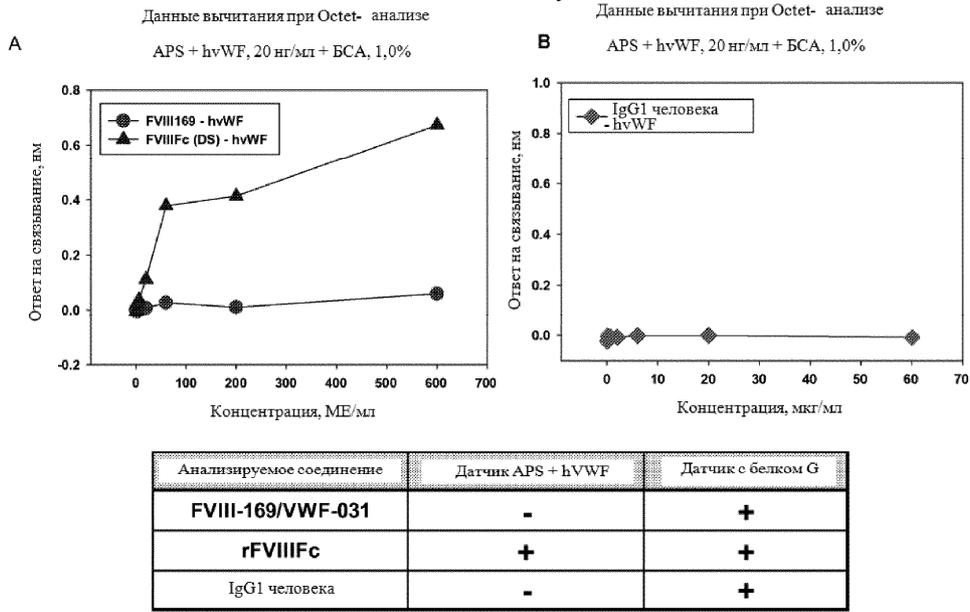
Фиг. 5

Конструкты FVIII (система совместной трансфекции)



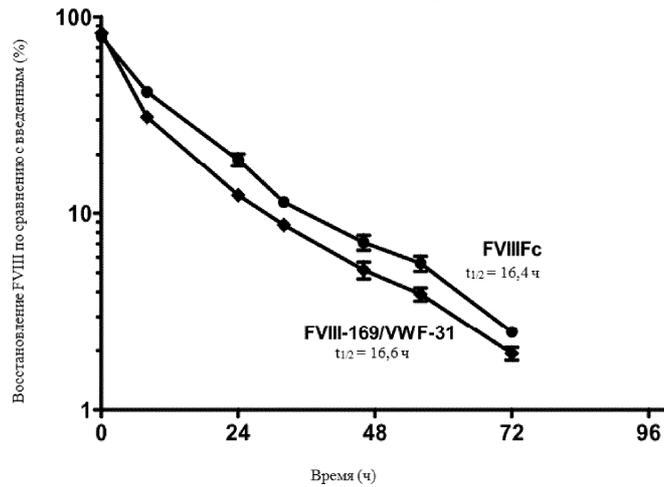
Фиг. 6

FVIII-169/VWF-31 не обладает обнаруживаемым связыванием по отношению к иммобилизованному hVWF



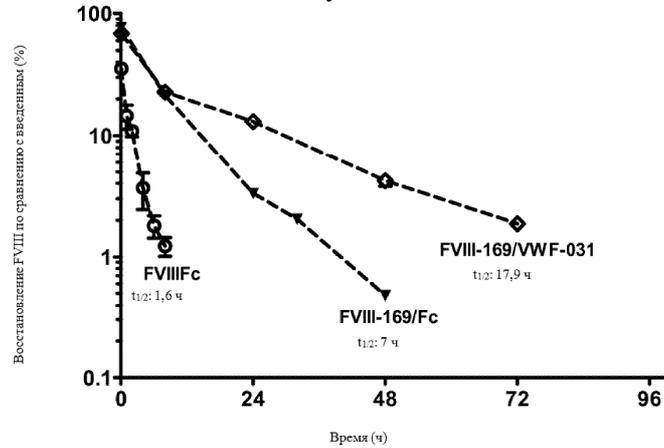
Фиг. 7

ФК FVIII-169/VWF-031 при НетА



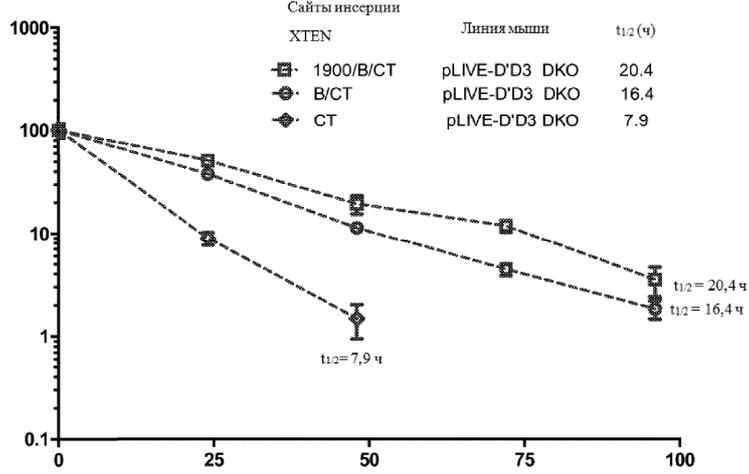
Фиг. 8А

ФК FVIII-169/VWF-031 у мышей FVIII/VWF ДКО



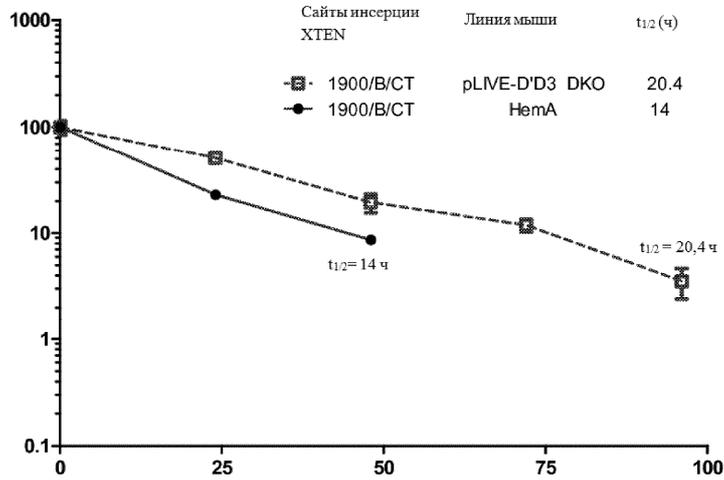
Фиг. 8В

Период полужизни вариантов FVIII-XTEN у мышей FVIII/VWF DKO, экспрессирующих D'D3



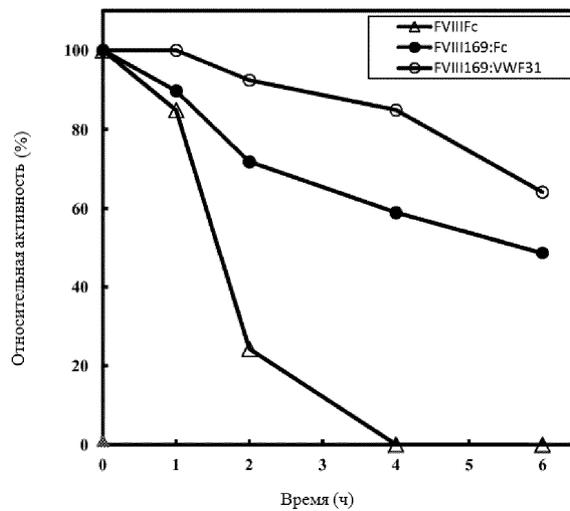
Фиг. 9А

ФК FVIII-XTEN с тремя вставками XTEN



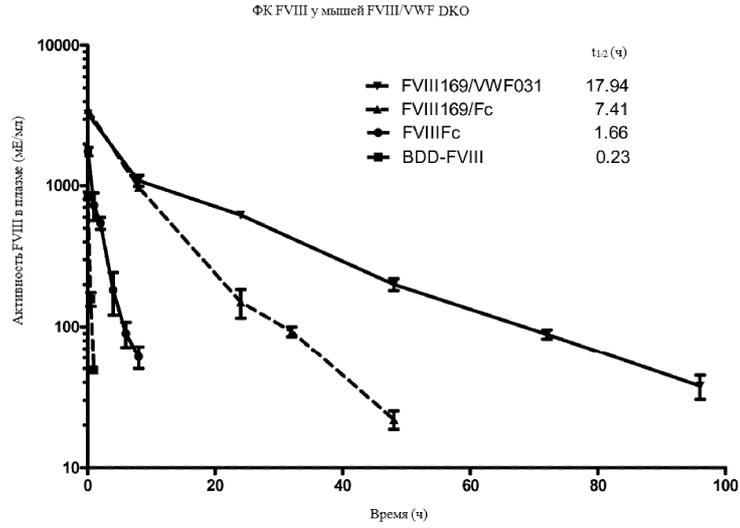
Фиг. 9В

Активность FVIII Fc в плазме мышей: DKO



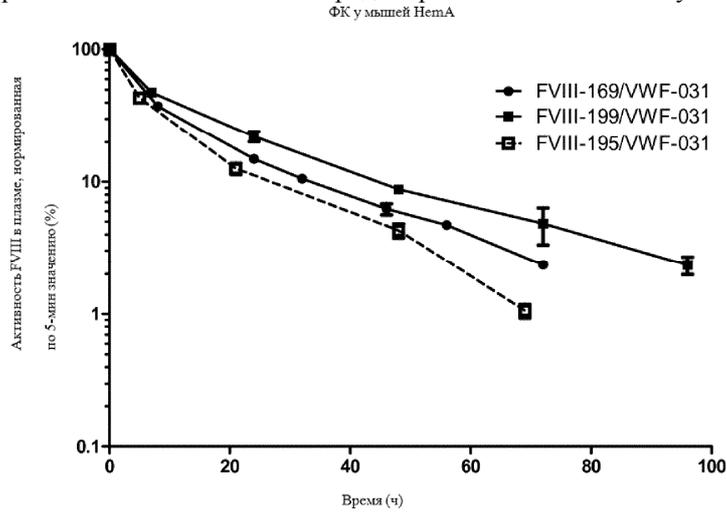
Фиг. 10

Аддитивное действие Fc, ХТЕМ и фрагмента VWF-D'D3 на увеличение периода полужизни FVIII



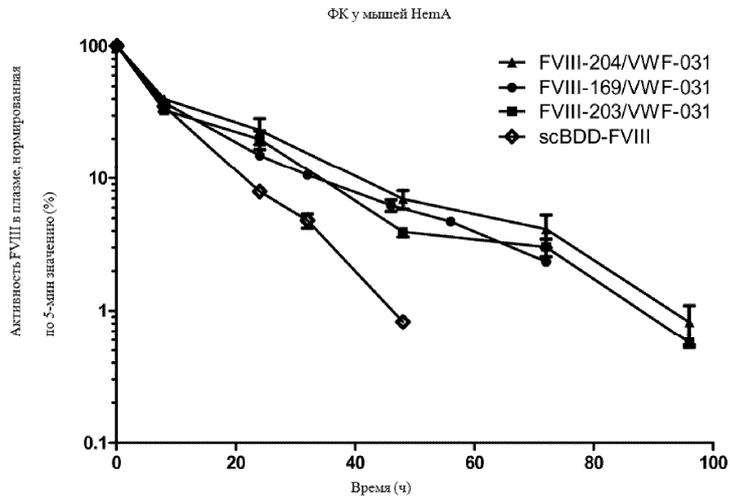
Фиг. 11

Влияние различных ХТЕН на ФК гетеродимера rFVIII-ХТЕН/VWF у мышей Нема



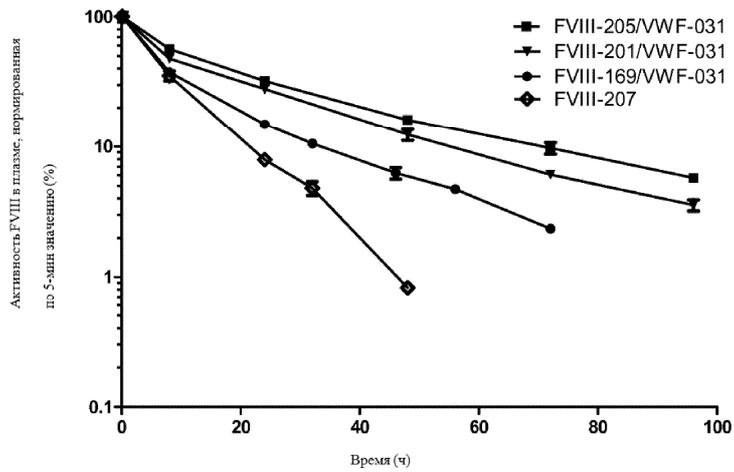
Фиг. 12А

Влияние различных ХТЕН на ФК гетеродимера rFVIII-ХТЕН/VWF у мышей Нема



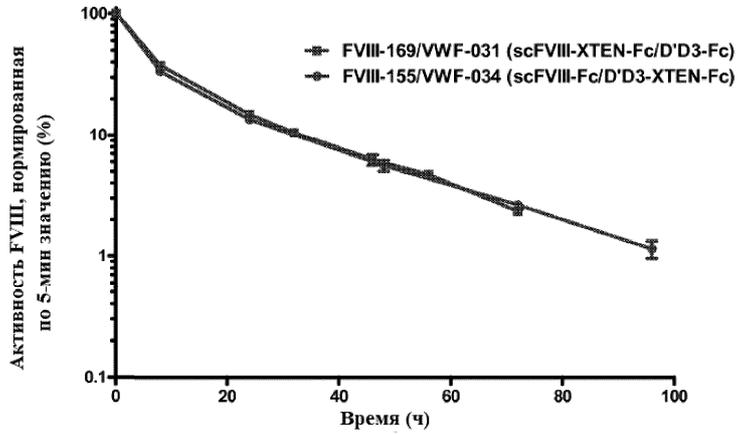
Фиг. 12В

Влияние различных XTEN на ФК гетеродимера rFVIII-XTEN/VWF у мышей Нема
ФК у мышей НемаА



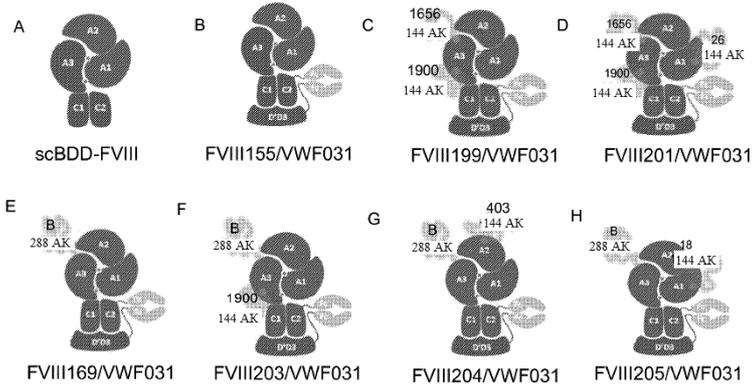
Фиг. 12С

ФК гетеродимера rFVIII-XTEN/VWF-XTEN у мышей FVIII/VWF DKO



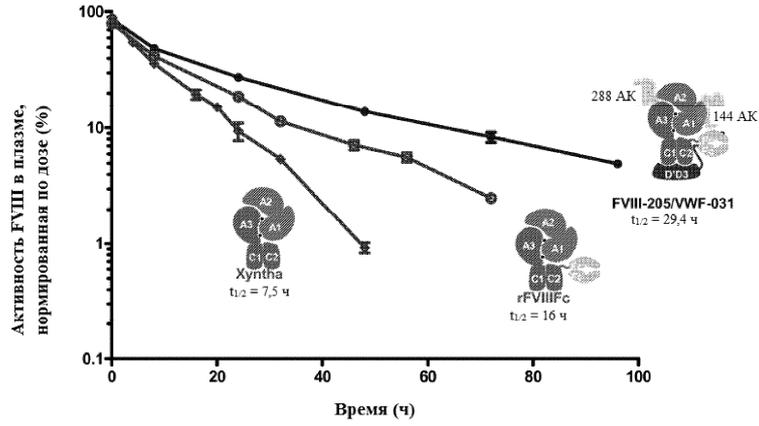
Фиг. 13

ФК гетеродимера rFVIII-XTEN/VWF у мышей НемаА



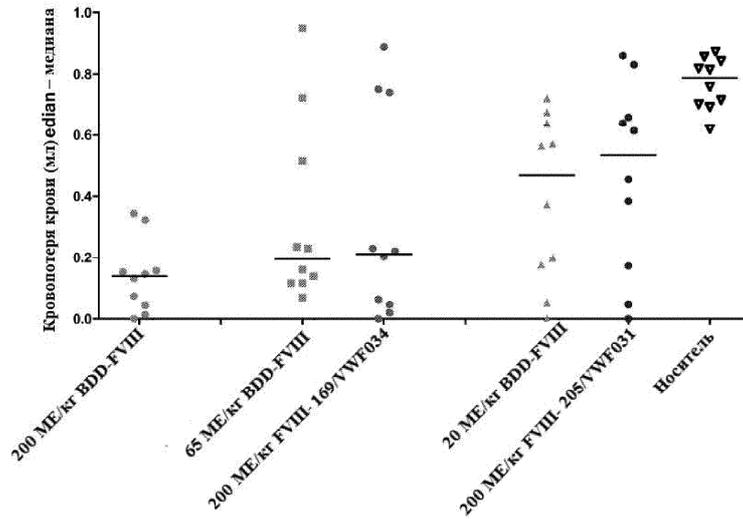
Фиг. 14

Увеличение периода полужизни у мышей Nema за счет rFVIII-XTEN/VWF



Фиг. 15

Острая эффективность гетеродимера FVIII-XTEN-Fc:VWF-Fc гетеродимера in vivo в модели кровотечения при обрезке хвоста мышей Nema



Фиг. 16

